

**Aus der Abteilung Innere Medizin II
der Medizinischen Universitätsklinik
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau**

Herstellung und Charakterisierung von zellpermeablem Interferon- α des Waldmurmeltieres (*Marmota monax*)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2009
von Armin Maximilian Peter Soave,
geboren in Wiesbaden

Dekan: Prof. Dr. Ch. Peters

1. Gutacher: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. H. E. Blum

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Hildt

Jahr der Promotion: 2009

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I.
Abkürzungen	II.
Abbildungen	III.
Tabellen	IV.
	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Zellpermeable Peptide	1
1.1.1 Membranen in der Organisation des Lebens	1
1.1.2 Zellpermeable Peptide	2
1.1.3 Einige zellpermeable Modellproteine	6
1.1.4 Das Translokationsmotiv (TLM)	8
1.2 Das Hepatitis B Virus (HBV) und die Hepatitis B	9
1.2.1 Aufbau und Molekularbiologie	9
1.2.2 Epidemiologie	11
1.2.3 Pathogenese	12
1.2.4 HBV-Lebenszyklus	12
1.2.5 Verlauf	14
1.2.6 Diagnostik	15
1.2.7 Symptomatik	16
1.2.8 Therapie	16
1.3 Interferone	17
1.3.1 Gene und Proteine der IFN-Familie	18
1.3.2 Regulation der IFN-Biosynthese	18
1.3.3 Induktion der Genexpression durch IFN	19
1.3.4 IFN-Wirkungen	21
1.3.5 Einsatz von IFN in der Medizin	23
1.3.6 Nebenwirkungen der IFN-Therapie	25
1.3.7 Allgemeine Problematik der IFN-Therapie	26
1.4 Ziele dieser Arbeit	28

2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Lösungen und Puffer	31
2.1.3 Proteaseinhibitoren	37
2.1.4 Kits	37
2.1.5 Enzyme	38
2.1.6 Größenstandards	38
2.1.7 Antikörper	38
2.1.8 Markierungen	40
2.1.9 Zellkultur	40
2.1.10 Verbrauchsgegenstände	41
2.1.11 Oligonukleotide	41
2.1.11.1 Oligonukleotide für Sequenzierungen	41
2.1.11.2 Oligonukleotide für das Subklonieren	42
2.1.11.3 Sonstige Oligonukleotide	42
2.1.12 Plasmide	43
2.1.12.1 Kommerziell erhältliche Plasmide	43
2.1.12.2 Hergestellte Plasmide	43
2.1.12.3 Sonstige Plasmide	43
2.1.13 Chemikalien	44
2.1.14 Viren	45
2.1.15 Tiere	45
2.2 Methoden	45
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1.1 Gewinnung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	45
2.2.1.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit rekombinanter DNA	45
2.2.1.3 Isolierung, Präparation und Konservierung von Plasmiden	46
2.2.1.4 Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA	46
2.2.1.5 Restriktionsenzymbehandlung	47
2.2.1.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	47
2.2.1.7 Ligation von DNA	47
2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese	48

2.2.1.9 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen	48
2.2.1.10 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen	48
2.2.1.11 Sequenzierungen und Sequenzanalyse	49
2.2.1.12 Northern Blot (NB)	49
2.2.1.13 RNA-Isolierung	50
2.2.1.14 DNase Verdau	51
2.2.1.15 PCR	51
2.2.1.16 Reverse-Transkriptase-PCR	51
2.2.1.17 Real-Time-PCR	52
2.2.1.18 PCR zur Herstellung subklonierbarer Fragmente	53
2.2.1.19 PCR vermittelte Subklonierung des TLM	53
2.2.1.20 Ortsspezifische Mutagenese-PCR	53
2.2.1.21 Fusions-PCR	54
2.2.2 Zellbiologische Methoden	54
2.2.2.1 Kultivierung und Passagieren von eukaryotischen Zellen	54
2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	54
2.2.2.3 Zellzählung	55
2.2.2.4 Zytosolpräparation aus eukaryotischen Zellen	55
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	55
2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.2.3.2 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	56
2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.2.3.4 Western Blot (WB)	57
2.2.3.5 Induktionskulturen von <i>E.coli</i> zur Proteinproduktion	58
2.2.3.6 Aufschluss von Bakterien	58
2.2.3.7 Reinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	58
2.2.3.8 Dialyse (Diffusion gegen PBS)	59
2.2.4 Immunologische Methoden	59
2.2.4.1 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)	59
2.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	59
2.2.4.3 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (CLSM)	60
2.2.5 Tierversuche	60

3. Ergebnisse	62
3.1 Herstellung der bakteriellen Expressionsplasmide für Kontroll-IFN- α bzw. TLM-IFN- α	62
3.1.1 TLM-IFN- α Plasmid pAS2	62
3.1.2 Kontroll-IFN- α Plasmid pAS3	63
3.2 Herstellung von TLM-IFN in verschiedenen Expressionssystemen	65
3.3 Reinigung von TLM-IFN und Kontroll-IFN	66
3.4 Funktionalität von TLM-IFN und Kontroll-IFN	70
3.4.1 TLM-IFN und Kontroll-IFN induzieren die Expression des MxA-Gens	70
3.4.2 TLM-IFN und Kontroll-IFN induzieren die Expression des 25OAS-Gens	71
3.5 Zellpermeabilität von Kontroll-IFN und TLM-IFN	73
3.5.1 TLM-IFN ist zellpermeabel	73
3.6 Antivirale Aktivität von TLM-IFN und Kontroll-IFN <i>in vivo</i>	76
3.6.1 Oral verabreichtes TLM-IFN besitzt eine stärkere antivirale Aktivität als oral verabreichtes Kontroll-IFN	76
4. Diskussion	79
4.1 Wahl des Modellorganismus	79
4.2 Herstellung der Expressionsplasmide pAS3 bzw. pAS2 für Kontroll-IFN bzw. TLM-IFN	79
4.3 Herstellung von TLM-IFN und Kontroll-IFN	79
4.4 Biologische Aktivität von TLM-IFN und Kontroll-IFN	80
4.5 Funktionalität von TLM-IFN und Kontroll-IFN	81
4.6 Zellpermeabilität von TLM-IFN und Kontroll-IFN	82
4.7 Tierversuche	83
4.8 Möglichkeit einer oralen IFN-Therapie	84
4.9 Ausblick: Medizinisch eingesetzte Proteine, die durch TLM-Modifikation oral verfügbar gemacht werden können	85
5. Literatur	87
Danksagung	112
Eidesstattliche Erklärung	113

I. Zusammenfassung

Interferon (IFN) spielt eine wichtige Rolle bei der Therapie von malignen Tumoren, entzündlichen Erkrankungen und Infektionen. So ist IFN z.B. Teil der Therapie der chronischen Hepatitis B. Bei weltweit 350 Millionen Infizierten und einer Million Todesfällen pro Jahr stellt die Hepatitis B ein ernstes medizinisches Problem dar. Bis zu 40% der mit IFN- α behandelten Patienten zeigen eine klinische Verbesserung im Sinne einer Normalisierung der Serum-Transaminasen und Beendigung der Virusreplikation. Die IFN-Therapie ist aber nicht unproblematisch: Nebenwirkungen sind häufig und können stark und dosislimitierend sein. Dies und die Tatsache, dass IFN bis heute ausschließlich parenteral verfügbar ist, wirkt sich negativ auf die *Compliance* der Patienten aus.

Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob durch die Fusion des IFN- α Moleküls mit dem Zellpermeabilität vermittelnden Translokationsmotiv (TLM)-Peptid aus der PreS2-Region des HBV ein zellpermeables Fusionsprotein (TLM-IFN) generiert werden kann. Weiter sollte untersucht werden, ob TLM-IFN bei oraler Verabreichung verfügbar und antiviral wirksam ist. Zur rekombinanten Herstellung von TLM-IFN und des entsprechenden Kontrollproteins (Kontroll-IFN) wurden zunächst bakterielle Expressionsplasmide hergestellt, die für TLM-IFN (pAS2) bzw. Kontroll-IFN (pAS3) kodieren. *Escherichia coli* wurden mit pAS2 bzw. pAS3 transformiert und anschließend induziert. Sowohl TLM-IFN als auch Kontroll-IFN wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und angereichert. Die Funktionalität von TLM-IFN und Kontroll-IFN wurde durch Untersuchung der Induktion der Expression des *Myxovirus-Resistance-A* (*MxA*)- und des *2'-5'Oligoadenylatsynthetase* (*25OAS*)-Gens *in vitro* nachgewiesen. Die Untersuchung der Zellpermeabilität *in vitro* hat gezeigt, dass TLM-IFN im Gegensatz zu Kontroll-IFN zellpermeabel ist. Das Pilotexperiment in Mäusen, die mit Adenovirus, das das 1,2fache HBV-Genom enthält, infiziert worden waren, hat gezeigt, dass oral verabreichtes TLM-IFN *in vivo* verfügbar ist und stärkere antivirale Aktivität besitzt als Kontroll-IFN. Durch die TLM-Modifikation könnte eine orale IFN-Therapie möglich werden. Um eindeutig zeigen zu können, dass die erhöhte Zellpermeabilität für die stärkere antivirale Aktivität von TLM-IFN *in vivo* ursächlich ist, müssen Versuche im *Marmota monax*-Modell durchgeführt werden. Durch die Fusion mit dem TLM könnten auch andere in der Medizin eingesetzte Proteine zellpermeabel und oral verfügbar gemacht werden.