# **Daniela Lieder**

Untersuchung der Reifung des Hepatitis B Virus Nukleokapsids

# Untersuchung der Reifung des Hepatitis B Virus Nukleokapsids

# Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Daniela Lieder, geb. Oed

aus Magdeburg

D7

Referent: Prof. Dr. B. Bowien

Korreferent: Prof. Dr. K. von Figura

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2002

# Inhaltsverzeichnis

| Abkürzungen |   |    |
|-------------|---|----|
| 1. EIN      | LEITUNG   | 1  |
| 1.1.        | Überblick   | 1  |
| 1.2.        | Genomstruktur und Genomreplikation                      | 2  |
| 1.3.        | Virusstruktur und Genprodukte                           | 5  |
| 1.4.        | Infektionszyklus des Hepatitis B Virus                  | 6  |
| 1.5.        | Das Hepatitis B Virus Core-Protein                      | 9  |
| 1.6.        | Modelle zur Untersuchung der HBV Biologie               | 12 |
| 1.7.        | Ziel der Arbeit   | 13 |
| 2. MA       | TERIAL  | 15 |
| 2.1.        | Bakterienstämme   | 15 |
| 2.2.        | Zelllinien  | 15 |
| 2.3.        | Baculoviren   | 16 |
| 2.4.        | Plasmide  | 17 |
| 2.5.        | Enzyme  | 25 |
| 2.6.        | Oligonukleotide   | 25 |
| 2.7.        | Antikörper  | 26 |
| 2.8.        | Peptide   | 27 |
| 2.9.        | DNA-Längenstandards                                     | 27 |
| 2.10        | . Proteinstandards                                      | 28 |
| 2.11        | . Radionukleotide                                       | 29 |
| 2.12        | . Nährmedien für die Anzucht von Escherichia coli       | 29 |
| 2.13        | . Nährmedien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen | 30 |
| 2.14        | . Lösungen und Puffer                                   | 30 |
| 2.15        | 5. Geräte   | 34 |
| 2.16        | 5. Chemikalien  | 36 |
| 3. ME       | THODEN  | 38 |
| 3.1.        | Mikrobiologische Methoden                               | 38 |
| 3           | .1.1. Anzucht der <i>E. coli</i> -Stämme                | 38 |
| 3           | .1.2. Bestimmung der Zelldichte                         | 38 |
| 3           | .1.3. Herstellung kompetenter <i>E. coli-</i> Zellen    | 38 |

# INHALTSVERZECHNIS

|    | 3.1.4. Transformation von <i>E. coli</i>                                  | 39 |
|----|---|----|
|    | 3.1.5. Induktion IPTG-induzierbarer Promotoren im präparativen Maßstab    | 39 |
| 3. | .2. Methoden zur DNA-Analyse und Plasmidkonstruktion                      | 39 |
|    | 3.2.1. Reinigung und Konzentrierung von DNA                               | 39 |
|    | 3.2.1.1. Phenol-Chloroform-Extraktion                                     | 39 |
|    | 3.2.1.2. Ethanolfällung   | 39 |
|    | 3.2.1.3. Isopropanolfällung   | 40 |
|    | 3.2.2. DNA-Aufreinigung mittels "QIAquick Gel Extraction Kit"             | 40 |
|    | 3.2.3. Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen                 | 40 |
|    | 3.2.4. Polymerase-Ketten-Rektion (PCR)                                    | 41 |
|    | 3.2.5. In vitro-Mutagenese mittels überlappender PCR                      | 42 |
|    | 3.2.6. Analytische Agarosegelelektrophorese                               | 43 |
|    | 3.2.7. Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Extraktion            | 43 |
|    | 3.2.8. Ligation mit der T4 DNA-Ligase                                     | 43 |
|    | 3.2.9. Präparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen (nach BIRNBOIM & DOLY,      |    |
|    | 1979; modifiziert)  | 44 |
|    | 3.2.10. Plasmidpräparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen mit hoher Reinheit  | 44 |
|    | 3.2.11. Plasmidpräparation im präparativen Maßstab (nach BIRNBOIM & DOLY, |    |
|    | 1979; modifiziert)  | 44 |
|    | 3.2.12. Konzentrationsbestimmung von DNA                                  | 45 |
|    | 3.2.13. DNA-Sequenzierung   | 45 |
|    | 3.2.13.1. Sequenzierung mit $\alpha^{35}$ S-dATP                          | 45 |
|    | 3.2.13.2. Automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs     | 46 |
| 3. | .3. Zellkulturtechniken   | 48 |
|    | 3.3.1. Kultivierung, Transfektion und Infektion von Säugerzellen          | 48 |
|    | 3.3.1.1. Subkultivierung von Säugerzellen                                 | 48 |
|    | 3.3.1.2. Transfektion von HuH7- und HepG2-Zellen mittels                  |    |
|    | Kalziumphosphat   | 48 |
|    | 3.3.1.3. Infektion von HepG2-Zellen mit rekombinanten Baculoviren         |    |
|    | (DELANEY & ISOM, 1998)  | 49 |
|    | 3.3.1.4. Bestimmung von HBsAg und HBeAg                                   | 49 |
|    | 3.3.2. Vermehrung von Insektenzellen                                      | 49 |
|    | 3.3.2.1. Subkultivierung von Insektenzellen als Suspensionskultur         | 50 |
|    | 3.3.2.2. Subkultivierung von Insektenzellen als adhärente Kultur          | 50 |
|    | 3.3.2.3. Zellzahlbestimmung   | 50 |
|    | 3.3.3. Arbeiten mit Baculoviren   | 50 |

# INHALTSVERZECHNIS

|      | 3.3.3.1. Herstellung rekombinanter Baculoviren                                     | 50 |
|------|--|----|
|      | 3.3.3.2. Herstellung eines rekombinanten Baculovirusstocks                         | 51 |
|      | 3.3.3. Konzentration von Baculoviren (O'REILLY et al., 1994)                       | 51 |
|      | 3.3.3.4. Titration rekombinanter Baculoviren                                       | 52 |
| 3.4. | Arbeiten mit Proteinen   | 53 |
| 3    | 3.4.1. Präparation von <i>E. coli-</i> Zellextrakten                               | 53 |
| 3    | 3.4.2. Aufreinigung von rekombinant in <i>E. coli</i> -exprimierten Core-Partikeln |    |
|      | (HATTON et al., 1992; modifiziert)   | 53 |
| 3    | 3.4.3. Lysatherstellung von Zellkulturen   | 54 |
| 3    | 3.4.4. Immunpräzipitation  | 55 |
| 3    | 3.4.5. HBc-ELISA   | 55 |
| 3    | 3.4.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)                              | 56 |
| 3    | 3.4.7. Coomassiefärbung  | 57 |
| 3    | 3.4.8. Western Blot (BURNETTE, 1981)   | 57 |
| 3    | 3.4.9. Immunblot   | 58 |
| 3    | 3.4.10. Farbreaktion mit 3,3-Diaminobenzidintetrahydro–Chlorid (DAB)               | 58 |
| 3    | 3.4.11. Chemilumineszenzdetektion von Meerrettich-Peroxidase-Konjugaten            | 58 |
| 3    | 3.4.12. Bestimmung der Proteinkonzentration  | 59 |
| 3.5. | Southern Blot (SOUTHERN, 1975)   | 59 |
| 3    | 3.5.1. DNA-Transfer auf Nylonmembran   | 59 |
| 3    | 3.5.2. Hybridisierung mit dem "Alk Phos Direct"-Kit                                | 60 |
| 3    | 3.5.3. Direktmarkierung mit Alkalischer Phosphatase                                | 60 |
| 3    | 3.5.4. Detektion von Sonden  | 60 |
| 3.6. | Präparation von Nukleokapsiden   | 61 |
| 3    | 3.6.1. Anreicherung durch Saccharosegradientenzentrifugation                       | 61 |
| 3    | 3.6.2. Anreicherung durch Nycodenzgradientenzentrifugation                         | 61 |
| 3    | 3.6.3. Anreicherung durch isopyknische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation         | 62 |
| 3.7. | Elektronenmikroskopie  | 62 |
| 3.8. | Peptidbindungsansatz   | 62 |
| 3.9. | Radioaktive metabolische Markierung von Zellen (pulse-chase-Experimente)           | 63 |
| 3.10 | ). Phosphorylierung von Nukleokapsiden (KANN & GERLICH, 1994; modifiziert)         | 63 |
| 3.11 | 1. Bindung von DNA an Nukleokapside  | 64 |
| 3    | 3.11.1. <sup>32</sup> P-radioaktive Markierung von linearisierter Plasmid-DNA      | 64 |
| 3    | 3.11.2. DNA-Bindungsversuch  | 65 |
| 3.12 | 2. Trypsinverdau der Nukleokapside   | 65 |

|   | 3.12.1. Verwendung von ungekoppeltem Trypsin (SEIFER & STANDRING, 1994;          |     |
|---|--|-----|
|   | modifiziert)   | 65  |
|   | 3.12.2. Verwendung von an Gold-gekoppeltem Trypsin (Au-Trypsin)                  | 65  |
|   | 3.13. Bindung von Nukleokapsiden und Mikrosomen                                  | 66  |
|   | 3.13.1. Mikrosomenpräparation (PRANGE et al., 1992)                              | 66  |
|   | 3.13.2. Bindungsansatz von Nukleokapsiden und Mikrosomen                         | 66  |
|   | 3.13.3. Ultraflotationsansätze der Bindungsansätze                               | 66  |
|   | 3.14. Nachweis der endogenen Polymerase in HBV-Partikeln                         | 67  |
|   | 3.15. Isolierung von HBV-DNA   | 68  |
|   | 3.16. Isolierung von ccc (circular covalently closed)-DNA (SUMMERS et al., 1990) | 68  |
|   | 3.17. Immunfluoreszenzfärbung  | 69  |
|   | 3.18. Autoradiographie   | 70  |
| 4 | . Ergebnisse   | 71  |
|   | 4.1. Vergleichende Untersuchungen reifer und unreifer Nukleokapside mit          |     |
|   | proteinbiochemischen Methoden  | 71  |
|   | 4.1.1 Markierung von Nukleokapsiden mit $\gamma^{32}$ P-ATP                      | 72  |
|   | 4.1.2. Bindung von DNA an Nukleokapside  | 74  |
|   | 4.1.3. In vitro-Bindung von Nukleokapsiden an Mikrosomen                         | 76  |
|   | 4.1.4. Partieller Trypsin-Verdau von Nukleokapsiden                              | 78  |
|   | 4.1.5. Verdau von Nukleokapsiden mit Goldpartikel-gekoppeltem Trypsin            | 82  |
|   | 4.2. Untersuchung der Virionbildung nach Mutation der C-terminalen               |     |
|   | Aminosäure des Core-Proteins   | 85  |
|   | 4.2.1. Konstruktion des Plasmids pSVcoreC185S                                    | 86  |
|   | 4.2.2. Einfluss der Cystein-Substitution auf die Virionbildung                   | 88  |
|   | 4.2.3. Einfluss der Substitution auf den Reifungsgrad der viralen DNA            | 90  |
|   | 4.3. Bindung rekombinanter Core-Partikel an Peptide                              | 91  |
|   | 4.3.1. Expression der Core-Partikel in E. coli und deren Aufreinigung            | 92  |
|   | 4.3.2. Elektronenmikroskopische Darstellung der Core-Partikel                    | 94  |
|   | 4.3.3. Untersuchung der <i>in vitro</i> -Bindung                                 | 96  |
|   | 4.4. Nachweis von cccDNA   | 99  |
|   | 4.4.1. Transduktion des HBV-Genoms mittels rekombinanter Baculoviren des         |     |
|   | Typs BlueBac4.5-RVHBV1.5   | 99  |
|   | 4.4.1.1. Konstruktion und Charakterisierung von BlueBac4.5-RVHBV1.5-             |     |
|   | Baculoviren  | 100 |
|   | 4.4.1.2 cccDNA-Nachweis im Southern Blot   | 104 |

| 4.4.1.3. Untersuchung der Persistenz der cccDNA                        | 106 |
|--|-----|
| 4.4.2. Transduktion des HBV-Genoms mittels rekombinanter Baculoviren   |     |
| des Typs BlueBac4.5-SVHBV1.5   | 108 |
| 4.4.2.1. Transfektion von pSVHBV1.5-Konstrukten                        | 110 |
| 4.4.2.2. Konstruktion und Charakterisierung von BlueBac4.5-            |     |
| SVHBV1.5-Baculoviren   | 112 |
| 4.4.2.3. Untersuchungen zur Infektionseffizienz mittels                |     |
| Immunfluoreszenzfärbung  | 115 |
| 4.4.2.4. cccDNA-Nachweis mittels HBeAg im Western Blot-Nachweis        | 116 |
| 4.4.2.4.1. Konstruktion des Plasmids pRVHBV1.5 cATG                    | 117 |
| 4.4.2.4.2. Identifikation von HBeAg im Western Blot                    | 120 |
| 4.4.2.4.3. HBeAg-Nachweis durch Western Blot nach Transduktion         |     |
| mittels BlueBac4.5-SVHBV1.5-Baculoviren                                | 122 |
| 4.4.2.4.4. HBeAg-Nachweis nach Transduktion mittels BlueBac4.5-        |     |
| SVHBV1.5-Baculoviren und Lamivudin-Behandlung                          | 123 |
|  |     |
| 5. DISKUSSION  | 127 |
| 5.1. Vergleichende Untersuchungen unreifer und reifer Nukleokapside    | 127 |
| 5.1.1. Untersuchungen der Core-Protein-Phosphorylierung von            |     |
| Nukleokapsiden   | 130 |
| 5.1.2. Untersuchungen zur Konformationsänderung des Core-Proteins      | 131 |
| 5.2. Einfluss der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins auf die    |     |
| Virionbildung  | 137 |
| 5.3. Bindung rekombinanter Core-Partikel an Peptide                    | 139 |
| 5.4. Nachweis von cccDNA   | 142 |
| 5.4.1. Nachweis von cccDNA im Southern Blot nach Transduktion des HBV- |     |
| Genoms unter Kontrolle des endogenen Promotors                         | 142 |
| 5.4.2. Indirekter Nachweis von cccDNA durch HBeAg nach Transduktion    |     |
| des HBV-Genoms unter Kontrolle des SV40-Promotors                      | 145 |
| 5.5. Ausblick  | 149 |
|  |     |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG   | 151 |
|  |     |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS  | 152 |

#### **A**BKÜRZUNGEN

Grundsätzlich werden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Systeme International d'Unites) benutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Ein-Buchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie die Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der "International Union for Biochemistry".

A Adenosin
Abb. Abbildung
Ag Antigen
Ak Antikörper
Amp Ampicillin

anti- Antikörper gegen
AP Alkalische Phosphatase
APS Ammoniumpersulfat

AS Aminosäure

ATP Adenosin-5´-triphosphat

bidest. doppelt destilliert

bp Basenpaare (engl.: base pairs)

BSA Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)

bzw. beziehungsweise

C Cytosin ca. circa

ccc ringförmig, doppelsträngig geschlossen (engl.:

covalently closed circular)

Ci Curie (1  $C = 3.7 \times 10^{10}$  Zerfälle pro Sekunde) cpm Zerfälle pro Minute (engl.: counts per minute)

CTP Cytosin-5'-triphosphat

Da Dalton

dATPDesoxyadenosin-5´-triphophatdCTPDesoxycytosin-5´-triphophatddNTPDidesoxynukleotid-5´-trihosphatdGTPDesoxyguanosin-5´-triphophat

d.h. das heißt
DMSO Dimethylsulfoxid
DNase Desoxyribonuklease

DNA Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic

acid)

dNTP Desoxynukleotid-5'-triphosphat

DR Wiederholungssequenz (engl.: *direct repeat*) dsDNA doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure

DTT Dithiothreitol E. coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraacetat

ELISA Enzymgekoppelter Immuntest (engl.: enzyme-linked

immunosorbent assay)

ER Endoplasmatisches Retikulum

FCS fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)

G Guanin

g Gramm
GP Glykoprotein
h Stunde

HBc Hepatitis B Core
HBeAg Hepatitis B e-Antigen
HBs Hepatitis B Surface
HBV Hepatitis B Virus
HRP Meerrettich-Peroxidase
IPTG Isopropylthiogalaktosid

kD Kilobasenpaare kD Kilodalton LB Luria Bertani

LHBs großes Hüllprotein des Hepatitis B Virus (engl.: large

hepatitis B surface protein)

Lsg. Lösung Molarität m milli

mA Milliampere

MAb monoklonaler Antikörper

MCS multiple Klonierungsstelle (engl.: *multiple cloning site*)
MHBs mittleres Hüllprotein des Hepatitis B Virus (engl.:

middle hepatitis B surface protein)

min Minute

MOI Infektionsmultiplizität (engl.: *multiplicity of infection*)

mol 6,3 x 10<sup>23</sup> Teilchen

MOPS 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure mRNA Boten-RNA (engl.: *messenger RNA*)

n nano nt Nukleotid

oc offen zirkulär (engl.: open circular)

OD Optische Dichte

ORF offener Leserahmen (engl.: open reading frame) ori Replikationsursprung (engl.: origin of replication)

p pico P rotein

32P Radioisotop 32 des Phosphors PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate

buffered saline)

PCR Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain

reaction)

PEG Polyethylenglykol

pfu Plaquebildende Einheit (engl.: plaque forming unit)

pH negativer dekadischer Logarithmus der

Wasserstoffionenkonzentration

POD Peroxidase
Pol Polymerase
PVDF Polyvinylidenfluorid

RNA Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)

RNase Ribonuklease

RT Reverse Transkriptase

<sup>35</sup>S Radioisotop 35 des Schwefels

SDS Natriumdodecylsulfat (engl.: sodiumdodecylsulfat)

sec Sekunden

SF Spodoptera frugiperda

#### **A**BKÜRZUNGEN

SHBs kleines Hüllprotein des Hepatitis B Virus (engl.: small

hepatitis B surface protein)

spez. Akt. spezifische Aktivität

ssDNA einzelsträngige DNA (engl.: single stranded DNA)

suppl. supplementiert

SV40 Affenvirus 40 (engl.: simian virus 40)

T Thymin Tab. Tabelle

TAE Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq Thermus aquaticus
TBE Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE Tris-EDTA-Puffer

TEMED N, N, N', N'-Tetraethylendiamin

TP Terminales Protein

Tris Trishydromethylaminomethan tRNA Transfer-RNA (engl.: *transfer RNA*)

U Einheit (engl.: *unit*)
UE Untereinheiten
ü.N. über Nacht

upm Umdrehungen pro Minute

UV ultraviolett V Volt Vol. Volumen

v/v Volumen pro Volumen

W Watt

w/v Gewicht (engl.: *weight*) pro Volumen X-Gal 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-D-Galaktosid

z.B. zum Beispiel

 $\mu$  micro

#### Aminosäuren

| Α | Ala | Alanin         | M | Met | Methionin  |
|---|-----|----------------|---|-----|------------|
| С | Cys | Cystein        | N | Asn | Asparagin  |
| D | Asp | Asparaginsäure | Р | Pro | Prolin     |
| E | Glu | Glutaminsäure  | Q | Gln | Glutamin   |
| F | Phe | Phenylalanin   | R | Arg | Arginin    |
| G | Gly | Glycin         | S | Ser | Serin      |
| Н | His | Histidin       | T | Thr | Threonin   |
| 1 | lle | Isoleucin      | V | Val | Valin      |
| K | Lys | Lysin          | W | Trp | Tryptophan |
| L | Leu | Leucin         | Υ | Tyr | Tyrosin    |

# 1. EINLEITUNG

#### 1.1. Überblick

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört zu der kleinen Virusfamilie *Hepadnaviridae*. Sie umfasst umhüllte **hepa**totrophe **DNA**-Viren, die sich insbesondere durch ihr enges Wirtsspektrum und ihren einzigartigen Replikationsmechanismus, der ein RNA-Intermediat einschließt, auszeichnen. Die Hepadnaviren werden in die Säugetiereinfizierenden (*Orthohepadnaviridae*) und die Vogelarten-infizierenden (*Avihepadnaviridae*) Viren unterteilt. Zu den Orthohepadnaviridae gehören neben dem Hepatitis B Virus, das nur Menschen und höhere Primaten infiziert, auch die Hepatitisviren des Waldmurmeltiers ("woodchuck hepatitis virus", WHV; SUMMERS et al., 1978), des Erdhörnchens ("ground squirrel hepatitis virus", GSHV; MARION et al., 1980) und des Wollaffens ("woolly monkey hepatitis B virus", WMHBV; Lanford et al., 1998). Das Hepatitis B Virus der Pekingente ("duck hepatitis B virus, DHBV; MASON et al., 1980) und das Hepatitis B Virus des Graureihers ("heron hepatitis B virus, HHBV; SPRENGEL et al., 1988) werden zu den Avihepadnaviridae zusammengefasst. Die Identifizierung des HBV in Patientenseren gelang in den 60er Jahren (BLUMBERG et al., 1965) durch elektronenmikroskopische Darstellung der Viren (DANE et al., 1970).

Weltweit sind Schätzungen zufolge mindestens 350 Millionen Menschen chronisch HBV-infiziert, wobei die Verteilung geographische Unterschiede zeigt. In Südostasien, Zentralund Südafrika sowie in Teilen Südamerikas liegt die Prävalenz von Hepatitis B-Infektionen bei 60-90 %, wogegen die westlichen Industriestaaten eine Trägerrate von unter 1 % (Deutschland 0,5-0,8 %) aufweisen (HOLLINGER, 1991).

Die Infektion mit dem Hepatitis B Virus zeigt unterschiedliche klinische Manifestationen, die von einer inapparenten Verlaufsform bei ca. 50 % der Infizierten bis zu einer seltenen fulminanten Hepatitis mit Todesfolge reichen (PAYNE et al., 1996). In den meisten Fällen verläuft die Infektion selbstlimitierend, jedoch nimmt die Erkrankung bei ca. 10 % der Infizierten einen chronischen Verlauf. Erfolgt die Infektion bei der Geburt, liegt die Chronifizierungsrate bei 80 %. Chronisch Infizierte tragen ein ca. 200 mal höheres Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (BEASLEY et al., 1981). Neben der horizontalen Übertragung des HBV, z.B. über Bluttransfusionen oder Geschlechtsverkehr, spielt die peri- oder postnatale Infektion von Säuglingen eine wichtige Rolle.

Da es bisher keine zuverlässig wirksame Therapie gibt, ist die Untersuchung des Vermehrungszyklus des Virus für die Entwicklung antiviraler Strategien wichtig. Außerdem erlangt das Virus auch Bedeutung in der Gentherapie, da es spezifisch Hepatocyten infiziert (HANAFUSA et al., 1999; PROTZER et al., 1999).

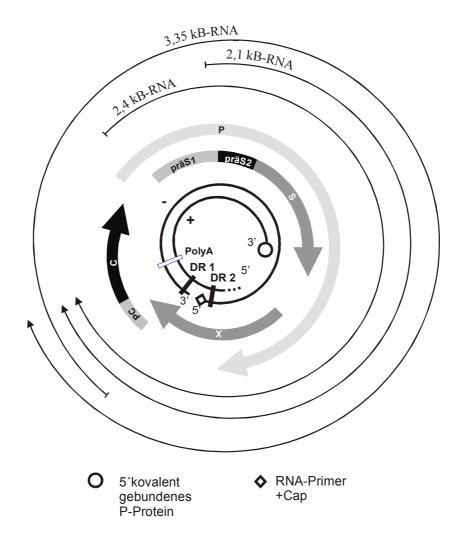
# 1.2. Genomstruktur und Genomreplikation

Das HBV besitzt eines der kleinsten Genome unter den DNA-Viren. Es hat eine Länge von ca. 3,2 kb und besteht aus einer zirkulären und partiell doppelsträngigen DNA, die sich aus einem vollständigen, kodierenden (-)-DNA-Strang und einem unvollständigen komplementären (+)-DNA-Strang zusammensetzt (Abb. 1). Die Länge des Plus-Stranges ist aufgrund des heterogenen 3'-Endes variabel (HRUSKA et al., 1977; LANDERS et al., 1977). Der (-)-Strang ist nicht kovalent geschlossen und besitzt eine terminale Redundanz von 5 bis 8 Nukleotiden (nt) an seinen Enden. Am 5'-Ende, dem Bereich einer 11 Nukleotide umfassenden repetitiven Sequenz (DR1, engl.: direct repeat) ist kovalent ein virales Protein (TP; Terminales Protein) gebunden (GERLICH & ROBINSON, 1980; WILL et al., 1987). Ungefähr 20 Basenpaare vor dem 3'-Ende des vollständigen Stranges liegt die einzige Consensussequenz für ein Polyadenylierungssignal.

Das 5'-Ende des inkompletten Plus-Stranges befindet sich 226 bp oberhalb des 5'-terminalen Proteins in der ebenfalls 11 Nukleotide umfassenden, zweiten repetitiven Sequenz (DR2) (SUMMERS et al., 1975; CHARNAY et al., 1979; WILL et al., 1987). Die zirkuläre Struktur des Genoms wird durch Basenpaarungen zwischen den 5'-Enden der beiden DNA-Stränge gewährleistet. Dieser Bereich wird auch als kohäsive Überlappungsregion bezeichnet (SATTLER & ROBINSON, 1979). Nur der Negativstrang wird im Replikationsverlauf in mRNA transkribiert.

Das zirkuläre DNA-Molekül enthält vier teilweise überlappende offene Leserahmen (ORFs) (GANEM & VARMUS, 1987). Diese vier Gene kodieren die folgenden Virusproteine: das PräC/C-Gen das Core-Protein und das Präcore-Protein, das präS/S-Gen die kleinen, mittleren und großen Oberflächenproteine, das Polymerase-Gen das Polymerase (Pol)-Protein und das X-Gen das X-Protein. Durch die Überlappung der Gene miteinander und mit regulatorischen Regionen wird eine hohe Komplexität der genetischen Organisation des Virus bedingt. Die Expression der viralen Genprodukte wird durch 4 Promotoren, zwei Enhancer und diverse Transkriptionsfaktoren gesteuert (GANEM, 1996).

Die Replikation des Genoms erfolgt in mehreren Schritten, wobei alle Schritte durch die Aktivitäten des Pol-Proteins unter Beteiligung der *cis*-aktiven Elemente auf dem Prägenom gewährleistet werden. Die virale DNA-Polymerase kann in drei funktionelle Bereiche unterteilt werden: TP (Terminales Protein), RT (Reverse Transkriptase) und RNaseH, die unterschiedliche Aufgaben während der Replikation erfüllen (LANFORD et al., 1999).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des HBV-Genoms, der offenen Leserahmen und der gebildeten mRNAs. PolyA: Polyadenylierungssignal, DR1 und DR2: *direct repeats*, P: Leserahmen des Polymerase-Proteins, präS1/präS2/S: Leserahmen der kleinen, mittleren und großen Hüllproteins, C: Leserahmen des Core-Proteins, PC: Leserahmen des Präcore-Bereichs, X: Leserahmen des X-Proteins. Die für das X-Protein kodierende mRNA ist nicht dargestellt.

Die Hepadnaviren zeigen eine einzigartige Replikationsstrategie (SUMMERS & MASON, 1982; GANEM & VARMUS, 1987; TIOLLAIS et al., 1981 und 1985). Nach Eindringen des Nukleokapsids in die Hepatocyte und Transport des Genoms in den Zellkern erfolgt zuerst die Vervollständigung und Reparatur des Genoms. Wahrscheinlich wird dieser Vorgang von Enzymen der Wirtszelle durchgeführt (KÖCK & SCHLICHT, 1993). Die hierdurch entstehende zirkulär kovalent geschlossene Form (ccc-Form, engl.: covalently closed circular) der DNA (WEISSER et al., 1983) liegt im Zellkern vor.

Während der Replikation wird eine 3,35 kB-RNA gebildet, die ein Kopie der viralen zirkulären DNA im Zellkern darstellt. Sie dient als Transkript für die Expression von Core-Protein und Polymerase. Diese RNA ist aber auch Matrize für die Synthese des HBV-Genoms, in dieser Funktion wird sie deshalb als Prägenom bezeichnet (HUANG &

SUMMERS, 1991). Die Transkription des Prägenoms wird von der RNA-Polymerase II der Zelle durchgeführt. Sie synthetisiert von der HBV-DNA weitere verschiedene RNA-Transkripte; es entstehen unter anderem 3,35 kB-RNAs mit 5'-variablen Enden. Nur das kürzeste der 3,35 kB-Transkripte dient als Prägenom (ENDERS et al., 1987). Die längeren RNAs enthalten an ihren 5'-Enden ein Startkodon, das bei der prägenomischen RNA fehlt und von dem die Synthese des Präcore-Proteins ausgeht. Dadurch wird die Bindung der viralen Polymerase verhindert (NASSAL et al., 1990). Die Polymerase kann an die kürzere prägenomische RNA vor dem Core-Protein-Startkodon binden. Die Bindungsstelle wird als ε-Sequenz bezeichnet (BARTENSCHLAGER & SCHALLER, 1992). Sie befindet sich in einem Bereich, der auf dem Prägenom dubliziert vorliegt (DR1). In dieser Region bildet sich die Konformation eines "stem loops" aus. Nach erfolgtem Kontakt wird die Expression von Core-Proteinen verhindert und ein Signal generiert, das die Verpackung der prägenomische RNA zusammen mit dem Polymerase-Protein in Core-Partikel initiiert. Erst dort findet die DNA-Synthese statt (BARTENSCHLAGER et al., 1990 und 1992; HIRSCH et al., 1991; JUNKER-NIEPMANN et al., 1990; POLLAK & GANEM, 1993; JEONG et al., 2000). Die RNA dient als Vorlage für die DNA-Synthese (Howe & Tyrell, 1996).

Die Bildung des (-)-Strangs (BLUM et al., 1984) beginnt mit der Synthese von vier Nukleotiden durch reverse Transkription, wobei das TP als "Primer" dient (BARTENSCHLAGER et al., 1988; GERLICH & ROBINSON, 1980). Das erste Nukleotid ist ein GMP und kovalent mit einem Tyrosinrest (Tyr 96) der Reversen Transkriptase verbunden (LANFORD et al., 1995; TAVIS et al., 1994; WANG & SEEGER, 1993; ZOULIM & SEEGER, 1994). Dieser Vorgang wird als "(-)-Strang priming" bezeichnet.

Durch die terminale Redundanz der RNA ist die DR1-Region ebenfalls am 3'-Ende vorhanden. Die Nukleotide werden wahrscheinlich über eine Konformations-änderung des Enzyms zu dieser Region transloziert. Nun erfolgt die Synthese der (-)-Strang-DNA mit der RNA als Matrize. Durch die RNaseH-Aktivität des Enzyms wird gleichzeitig die RNA abgedaut mit Ausnahme eines kurzen Fragments am 5'-Ende, das die DR1-Region enthält (CHANG et al., 1990; RADZIWILL et al., 1990). Die Größe der verbleibenden RNA umfasst 15 bis 18 Ribonukleotide (LOEB et al., 1991). Das kurze Fragment wird an eine interne Sequenz (DR2) transloziert, wo es als Primer für die (+)-Strang-DNA-Synthese dient (LIEN et al., 1986 und 1987). Die (+)-Strang-DNA-Elongation wird über die DR1-Region und das 5'-Ende der (-)-Strang-DNA fortgesetzt. Die Polymerisation ist meistens nicht vollständig und bricht nach etwa der Hälfte der (+)-Strang-Synthese ab. Die so entstandene partiell doppelsträngige Form der DNA stellt das Genom des HBV dar.

# 1.3. Virusstruktur und Genprodukte

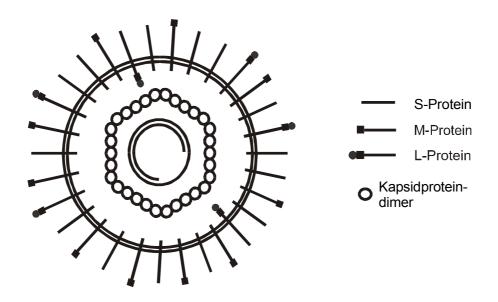


Abb. 2: Aufbau des Hepatitis B Virus-Partikel.

Das sphärische Hepatitis B Virus-Partikel (Abb. 2) hat einen Durchmesser von ca. 42 nm. Im Inneren befindet sich ein ikosaedrisches Nukleokapsid mit einem Durchmesser von etwa 30 nm. Es wird von einer äußeren Membran umhüllt, in der drei unterschiedlich große Virus-Oberflächenproteine inseriert sind, die zum Teil in glykosylierter Form vorliegen. Die Translation der Hepatitis B-Oberflächenproteine wird an drei verschiedenen Startkodons innerhalb eines ORF's initiiert und an einem gemeinsamen Stop-Kodon terminiert. Alle Proteine werden kotranslational in die ER-Membran inseriert.

Das kleine Oberflächenprotein (SHBs) besitzt ein Molekulargewicht von 24 kD und hat eine Länge von 226 As. Es stellt den C-terminalen Teil der beiden größeren Oberflächenproteine dar, der als S-Region bezeichnet wird. Neben der unglykosylierten Form (P24) liegt es zu 40 % in glykosylierter Form (GP27) vor (PETERSON, 1981).

Das mittlere Oberflächenprotein (MHBs) besitzt an seinem N-terminalen Ende gegenüber dem kleinen Hüllprotein zusätzlich 55 As, die durch die PräS2-Region kodiert werden (STIBBE & GERLICH, 1983; NEURATH et al., 1985; MACHIDA et al., 1983; MACHIDA et al., 1984). Es existiert in zwei unterschiedlich glykosylierten Formen, GP33 und GP36, die sich durch die fakultative Glykosylierung der S-Domäne unterscheiden (STIBBE & GERLICH, 1982).

Das große Hüllprotein (LHBs) wird durch die PräS1-, PräS2- und S-Region kodiert (HEERMANN et al., 1984; WONG et al., 1985; PFAFF et al., 1986) und besitzt je nach Subtyp gegenüber dem MHBs N-terminal zusätzlich 108 As (Subtyp *ay*) oder 119 As (Subtyp *ad*, VALENZUELA et al., 1980). Das LHBs wird als unglykosyliertes (P39) und glykosyliertes (GP42) Protein exprimiert, wobei nur die fakultative Glykosylierungsstelle der S-Domäne genutzt wird (HEERMANN et al., 1984).

Das Nukleokapsid setzt sich aus 180 oder 240 Core-Proteinen mit einem Molekulargewicht von 21 kD zusammen. Im Kapsid befindet sich das Virusgenom, eine zirkulär partiell doppelsträngige DNA (ROBINSON et al., 1974), und eine daran kovalent gebundene virale DNA-Polymerase (KAPLAN et al., 1973).

Die Funktion der Nichtstrukturproteine X und HBeAg (1.5.) bei der Virusproduktion ist unklar. Das X-Protein kann *in vitro* eine Vielzahl von Promotoren *trans*-aktivieren, indem es Signaltransduktionskaskaden auslöst (KEKULE at al., 1993; ROSSNER, 1992). In Zellkultur ist das HBV-X-Protein nach Transfektion nicht essentiell für die Virusproduktion (BLUM et al., 1992), wohl aber bei der Infektion von Woodchucks mit dem WHV (ZOULIM et al., 1994).

Im Serum infizierter Individuen sind zudem subvirale, nicht infektiöse Partikel nachweisbar, die nur die viralen Hüllproteine und Lipide enthalten. Sie liegen in  $10^3$ - bis  $10^5$ -fach höherer Konzentration als die Virionen vor und haben eine sphärische oder filamentöse Form mit einem Durchmesser von 20 nm, wobei die Länge der Filamente zwischen 50 nm und 1  $\mu$ m variiert. Die biologische Funktion der subviralen Partikel ist nicht bekannt.

# 1.4. Infektionszyklus des Hepatitis B Virus

Während der Infektion gelangt das Virus durch Endocytose in die Leberzelle (Abb. 3), wobei die Oberflächenproteine eine vermittelnde Rolle zu spielen scheinen (LE SEYEC et al., 1999). Der genaue Mechanismus ist bislang unbekannt. Es wird vermutet, dass ein Bereich im großen Hüllprotein an einen oder mehrere zelluläre Rezeptoren bindet. Bisher konnte keiner der zahlreichen Rezeptorkandidaten, wie z.B. die Carboxypeptidase D (Tong et al, 1999; Urban et al., 2000) oder ein Protein von 80 kD Größe (RYU et al., 2000) oder andere sicher bestätigt werden. Während der Aufnahme in die Zelle verliert das Virus seine äußere Hülle und das Nukleokapsid zerfällt wahrscheinlich an der Kernmembran (Guidotti et al., 1994; Bock et al., 1996; Kann et al., 1997). Das virale Genom gelangt vermutlich, wie Untersuchungen am WHV zeigten, als DNA-Polymerase-Komplex in den Zellkern (Kann et al., 1997). Hier wird es durch zelluläre Enzyme in eine

kovalent geschlossene Form (ccc-Form) überführt (KÖCK & SCHLICHT, 1993). Diese cccDNA dient als Matrize für die anschließende Transkription von vier verschiedenen mRNAs (0,7 kB, 2,1 kB, 2,4 kB, 2 x 3,35 kB). Jede mRNA wird über ihren eigenen Promotor transkribiert und endet an einem allen gemeinsamen Polyadenylierungsort. Die mRNAs werden in das Cytoplasma exportiert und in die viralen Proteine translatiert. Die beiden 3,35 kB-mRNAs unterschieden sich am 5'-Ende um ca. 30 Nukleotide (1.3.). Die kürzere Variante wird als sogenannte prägenomische RNA bezeichnet, da sie als Matrize für die folgende reverse Transkription dient. Im Cytoplasma werden von dieser mRNA die virale Polymerase und das Core-Protein exprimiert. In einem selektiven Prozess assembliert das Core-Protein zu Partikeln, die das Prägenom und die Polymerase eingeschlossen haben. Dieser Komplex wird als Nukleokapsid bezeichnet. Im Inneren des Kapsids findet die DNA-Synthese statt. Aus der (+)-Strang-RNA wird (-)-Strang-DNA und schließlich (+)-Strang-DNA gebildet (1.3.). Der weitere Infektionsverlauf kann in zwei Phasen unterteilt werden.

Im DHBV-System wurde gezeigt, dass in der frühen Phase der Infektion das Virusgenom intrazellulär vervielfältigt und noch kein neues Virus gebildet wird (TUTTLEMANN et al., 1986). Das Kapsid zerfällt an der Kernmembran, die DNA gelangt in den Zellkern, wo der bereits beschriebene Ablauf von neuem beginnt. Die intrazelluläre Amplifikation des Virusgenoms dient der verstärkten Expression viraler Produkte.

In der späten Phase der Infektion kommt es am Endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Interaktion zwischen den reifen Nukleokapsiden und Hüllproteinen. Letztere werden von zwei unterschiedlichen mRNAs translatiert. Von der 2,4 kb großen mRNA wird das große Hüllprotein translatiert. Die 2,1 kb große RNA dient der Synthese des kleinen und mittleren Hüllproteins. Alle drei Hüllproteine inserieren in die Membran des ER. Die replikationskompetenten Nukleokapside treten mit den Hüllproteinen am ER in Kontakt und werden über das Lumen des ER und weiter über den Golgi-Apparat als infektiöse Viren sezerniert. Sind die Nukleokapside nicht replikationskompetent, z.B. bei gestörter DNA-Synthese, findet keine Assoziation mit den Hüllproteinen und damit keine Sekretion statt (GERELSAIKHAN et al., 1996; WEI et al., 1996). So ist die weitgehend erfolgte Genomreifung Voraussetzung für die Umhüllung des Kapsids durch die Hüllproteine.

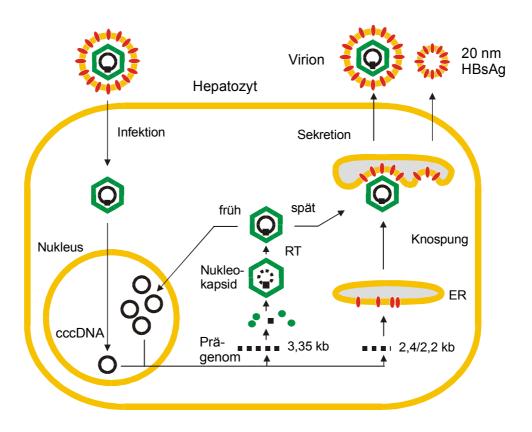


Abb. 3: Infektionszyklus des Hepatitis B Virus.

Die Regulation der intrazellulären Genomkopienzahl ist für eine permanente und effektive Virusproduktion in einer infizierten Zelle von entscheidender Bedeutung. Im DHBV-Modell wurde entdeckt, dass die Kopienzahl der nukleären ccc-Form des viralen Genoms in der Frühphase der Infektion auf einem intrazellulären Weg zunächst amplifiziert und dann relativ konstant gehalten wird. Das ist Voraussetzung für die hohe Kopienzahl der viralen cccDNA in der Zelle, die als Template zur Transkription der viralen mRNAs dient. Gleichzeitig darf die Kopienzahl nicht zu stark steigen, da hiermit zumindestens im DHBV-Modell cytopathogene Effekte verbunden sind (LENHOFF et al., 1999). Mutanten, bei denen die Expression der L-Proteine blockiert war oder die durch Mutationen im L-Protein in der Morphogenese von Virionen gehemmt waren, zeigten diese Regulation nicht, sondern akkumulierten größere Mengen an viraler cccDNA, wodurch die Zellen schließlich geschädigt wurden (SUMMERS et al., 1990; LENHOFF & SUMMERS, 1994a).

# 1.5. Das Hepatitis B Virus Core-Protein

#### Proteinstruktur

Das Core-Protein wird von dem C-ORF kodiert. Diesem Leserahmen ist ein kurzer, 29 Codon umfassender ORF vorgelagert (Prä-C), so dass zwei verschiedene Proteine synthetisiert werden können (Abb. 4).

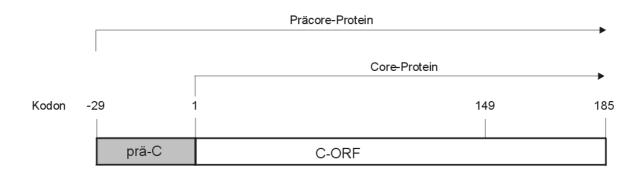


Abb. 4: Schematische Darstellung des Präcore/Core-ORF.

Die Expression des größeren Proteins beginnt mit dem ersten ATG. Das Protein wird als Präcore-Protein bezeichnet und besitzt ein Molekulargewicht von 25 kD (BRUSS & GERLICH, 1988). Es besitzt gegenüber dem Core-Protein N-terminal 29 zusätzliche Aminosäuren, die durch den PräC-Bereichs des Core-ORFs kodiert werden. Diese Region enthält eine Signalsequenz, durch die das Protein zum ER geleitet wird. Dort werden die ersten 19 AS bei der Translokation in das ER-Lumen proteolytisch abgetrennt (STANDRING et al., 1988). Nach einer weiteren Prozessierung, bei der der C-terminale Teil zwischen den AS 149 und 150 abgetrennt wird, entsteht das reife 17 kD Protein. Es erscheint als HBeAg im Serum (OU et al., 1986). Das HBe-Antigen dient in der Virusdiagnostik als Marker für den Verlauf einer HBV-Infektion (ALTER et al., 1976; OKADA et al., 1976; BONINO et al., 1991). Es ist weder für die Virusbildung noch für die Infektiösität notwendig, die genaue Funktion ist noch nicht bekannt (BRUNETTO et al., 1989 und 1991).

Von dem zweiten ATG wird die Synthese des HBV Core-Proteins initiiert. Das Core-Protein ist der Hauptbestandteil des viralen Kapsids und besteht je nach Subtyp aus 183 bzw. 185 AS. Das Molekulargewicht beträgt 21 kD. Das Core-Protein kann in zwei funktionell unterschiedliche Domänen unterteilt werden. Der Bereich des Core-Proteins, der die Partikelbildung in einem "self assembly"-Prozess ermöglicht, umfasst die Nterminalen 144 AS (GALLINA et al., 1989; BIRNBAUM & NASSAL, 1990). Dieser Proteinabschnitt enthält einen höheren Anteil an hydrophoben AS. Der basische

C-Terminus umfasst 36 AS und ist sehr Arginin-reich (17 AS Arginine). Dieser Abschnitt ist positiv geladen, stark hydrophil und die Sequenz ähnelt der von Protamin. Ihm wird die Fähigkeit zugeschrieben, DNA binden zu können (PETIT & PILLOT, 1985). Eine Deletion des gesamten C-Terminus beeinflusst die Partikelbildung nicht. Der C-Terminus ist an der Verpackung der prägenomischen RNA und der viralen DNA-Synthese beteiligt. Experimente, in denen Viren mit C-terminal verkürztem Core-Protein erzeugt wurden, zeigten, dass es abhängig von der Größe der Deletion nicht mehr zur RNA-Verpackung kommt bzw. die Synthese der DNA im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 5-10 sinkt (NASSAL, 1992a). Eine Phosphorylierung des Proteins (FEITELSON et al., 1982; GERLICH et al., 1982) kann an den Serinresten des C-Terminus erfolgen. Vermutlich ist eine zelluläre Proteinkinase, die in die Core-Partikel verpackt wird, hierfür verantwortlich (YEH & OU, 1991; KANN & GERLICH, 1994; KAU & TING, 1998).

Das Präcore- und Core-Protein zeigen, neben ihrer unterschiedlichen Größen, verschiedene antigene Determinanten (SCHÖDEL et al., 1992). Das Präcore-Protein besitzt zwei charakteristische Determinanten (HBe1 und HBe2). HBe1 befindet sich in dem Bereich um As 80 und ist ein sequentielles Epitop. Es liegt auf der Oberfläche von Core-Partikeln. HBe2 dagegen liegt im Bereich von As 130 und stellt ein konformationelles Epitop dar. Dieses Epitop ist auf Core-Partikeln maskiert und kann nur bei Core-Proteindimeren oder denaturiertem Core-Protein nachgewiesen werden (SALFELD et al., 1989). In der partikulären Form des Core-Proteins ist nur eine konformationelle Determinante vorhanden, die als HBc bezeichnet wird. Sie überlappt mit dem HBe1-Epitop, ist aber nicht mit ihm identisch. Die HBc-Determinante wird nur auf der Oberfläche von Core-Partikeln präsentiert. Das HBcAg kann durch Denaturierung oder eingeschränkte Proteolyse in HBeAg konvertiert werden (MCKAY et al., 1981; TAKAHASHI et al, 1980).

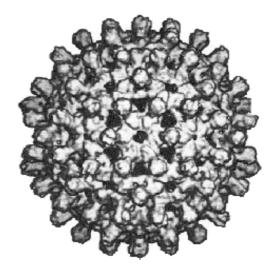
#### Core-Partikel

Core-Partikel bilden sich aus einem Pool an Core-Proteindimeren, wobei keine Oligomere als Zwischenprodukte nachgewiesen werden können. Dieser Vorgang ist von der Konzentration des Core-Proteins abhängig (Seifer et al., 1993). In der infizierten Zelle ist für die Bildung des Nukleokapsids die Interaktion der Core-Proteine mit einem Prägenom-Polymerase-Komplex notwendig. Zunächst bindet das P-Protein an ein Verpackungssignal, die sogenannte ε-Sequenz, die sich am 5′-Ende der prägenomischen RNA befindet (Junker-Niepmann et al., 1990; 1.2.). Das P-Protein interagiert eventuell mit dem 3′-Ende des Prägenoms, so dass eine Zirkularisierung des Komplexes induziert und die Zusammenlagerung der ersten Core-Proteindimere initiiert wird. Eine spontane

Bildung von Kapsiden ohne Anwesenheit von anderen HBV-Proteinen erfolgt hingegen bei der Expression von Core-Proteinen in anderen Zellsystemen, wie z.B. Bakterien (COHEN & RICHMOND, 1982), *Xenopus*-Oocyten (ZHOU & STANDRING, 1991) und Insektenzellen (LANFORD & NOTVAL, 1990).

1994 wurde ein Strukturmodell für das Nukleokapsid (Abb. 5) aus cryoelektronenmikroskopischen Daten von Partikelpräparationen aus *E. coli* und aus infizierter Leber abgeleitet (CROWTHER et al., 1994). Es wurden zwei verschiedene Formen gefunden: zum einen eine kleinere Form aus 180 Untereinheiten (UE) bzw. 90 Core-Proteindimeren mit einem Durchmesser von 25 nm, zum anderen eine größere Form aus 240 UE bzw. 120 Dimeren mit einem Durchmesser von 30 nm. Welche dieser Strukturen an der Virusmorphogenese beteiligt sind, ist jedoch nicht bekannt.

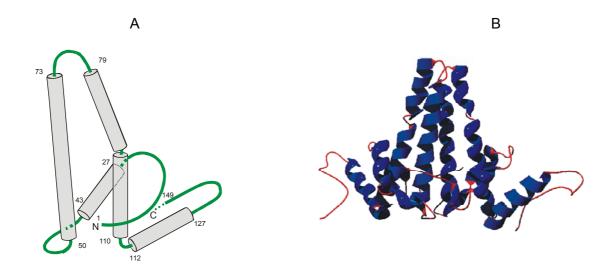
Vor 3 Jahren wurde die Kristallstruktur von bakteriell exprimierten HBV-Kapsiden, die aus C-terminal verkürztem Core-Protein bestanden (AS 1-149) aufgeklärt (Abb. 6A und B; WYNNE et al., 1999). Die Deletion des C-Terminus beeinflusst wie schon erwähnt die Partikelbildung nicht, erlaubt aber eine effizientere Expression in *E. coli*. Es wurde gezeigt, dass zwei antiparallele  $\alpha$ -Helices (AS 50-110) die Spikes bilden. Die Helices sind an der Spitze durch eine Schleife miteinander verbunden. An der Basis wird der Spike von einer Schleife aus den N-terminalen 49 AS umgeben. Die C-terminalen AS sind rechtwinklig zum Spike angeordnet und bilden ebenfalls eine  $\alpha$ -Helix (AS 112-127).



**Abb. 5:** Modell des HBV Core-Partikels (Conway et al., 1997; modifiziert) Dieses Modell wurde anhand cryo-elektronenmikoskopischer Daten erstellt. Deutlich zu sehen sind die nach außen gerichteten Spikes des HBV-Kapsids und Poren, die ein Durchtreten kleinerer Moleküle wie z.B. Nukleotide ermöglichen.

Die Daten haben gezeigt, dass die Dimerkontaktregion durch ein 4-Helix-Bündel geformt wird (Abb. 6B). Die am C-terminalen Ende befindlichen Strukturen (AS 120-143) vermitteln den Kontakt zwischen den einzelnen Proteindimeren, so dass die Schale des Kapsids gebildet und stabilisiert wird.

In der Kapsidschale sind kleine Poren mit einer Größe von 1,4 nm, durch die kleine Moleküle, wie z.B. ATP und Nukleotide in das Innere gelangen können, die für die DNA-Synthese notwendig sind.



**Abb. 6:** Darstellung des HBV-Core-Proteins (WYNNE et al., 1999). Die Modelle wurden anhand der Kristallstrukturdaten erstellt. (A) Schematische Darstellung eines Core-Protein-Monomers. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Aminosäuren des Core-Proteins, die graumarkierten Zylinder stellen a-Helices dar. (B) Graphische Darstellung eines Core-Protein-Dimers.

# 1.6. Modelle zur Untersuchung der HBV Biologie

Bisher gibt es kein Zellkultursystem, das in der Lage ist, die HBV-Replikation in einer Weise, wie sie bei der Infektion in humanen Leberzellen stattfindet, zu ermöglichen. Als in vitro System kommt die Infektion von primären humanen Hepatocyten mit dem HBV in Betracht, aber eines der größten technischen Probleme bei der Schaffung eines solchen permissiven Zellsystems liegt in der Präparation und Kultivierung ausreichend hoher Mengen primärer Hepatocyten. Deshalb erfolgten Versuche, etablierte von humanen Hepatomen abgeleitete Zelllinien zu infizieren. Sie stellten sich weitgehend als nicht erfolgreich dar. Kürzlich wurde eine Methode zur Infektion von HepG2-Zellen beschrieben, bei der die Zellen mit DMSO-behandelt wurden (PARAN et al., 2001), deren Reproduzierbarkeit aber noch bestätigt werden muss. Morphogenese des HBV werden deshalb in den meisten Fällen durch Transfektion von Hepatomzelllinien mit HBV DNA-tragenden Plasmiden durchgeführt. Ein Nachteil dieses

Systems liegt in der fehlenden intrazellulären Amplifikation des HBV-Genoms über den beschriebenen Weg der cccDNA-Bildung (1.4.). Auch transgene Mäuse, die infektiöses HBV bilden, sind für Untersuchungen nur eingeschränkt nutzbar, da sie ebenfalls keine cccDNA produzieren (GUIDOTTI et al., 1995). Da für das humane HBV kein Tiermodell zur Verfügung steht, wurde ein Großteil der Biologie des HBV aus Studien anderer Mitglieder der Hepadnavirus-Familie abgeleitet. Zahlreiche Untersuchungen wurden speziell beim WHV und DHBV durchgeführt. Diese beiden animalen Viren wurden ebenfalls erfolgreich in primären Hepatocyten, die aus den jeweiligen natürlichen Wirten gewonnen wurden, vermehrt (GALLE et al., 1989; CHOI et al., 1988). Aufgrund der Unterschiede zwischen den einzelnen Hepadnaviren, wie z.B in der Transkriptionsregulation (DI et al., 1997) und im Virusaufbau (SCHLICHT et al., 1987), können die erhaltenen Aussagen aber nicht ohne weiteres für das humane HBV übernommen werden. Ferner werden Studien der Immunologie und Pathogenese der Infektion dadurch limitiert, dass die natürlichen Wirte des DHBV und WHV genetisch und immunbiologisch nicht gut definiert sind. Im letzten Jahr wurde berichtet, dass primäre Tupaja-Hepatocyten mit humanem HBV und WMHBV infiziert werden können (KÖCK et al., 2001). Desweiteren wurden alternative experimentelle Syteme entwickelt, mit denen es möglich ist, HBV-Genome mit Hilfe von rekombinanten Baculoviren (DELANEY & ISOM, 1998) und Adenoviren (SPRINZL et al., 2001) in Hepatomzelllinien zu transduzieren. Diese Methode scheint einer natürlichen Infektion ähnlich zu sein, da es zur Etablierung von cccDNA kommt. Mit Hilfe dieser Übertragungswege von HBV-DNA in kultivierte Zellen könnte es gelingen, ein permissives Zellsystem für die HBV-Replikation aufzubauen, dass alle intrazellulären Schritte des Vermehrungszyklus umfasst.

# 1.7. Ziel der Arbeit

Die korrekte Regulation des intrazellulären Transports der im Cytosol gebildeten Kapside ist für eine permanente und effektive Virusproduktion von großer Bedeutung. Die Kapside können zwei Transportwegen folgen: Zum einen kann ihr offen zirkuläres HBV-Genom in den Zellkern entlassen werden, wo es zur ccc-Form umgewandelt wird. Zum anderen können die Nukleokapside durch die Oberflächenproteine umhüllt und als Bestandteil der Virionen sezerniert werden. Auf welche Weise der Transport des reifen Nukleokapsids beim humanen HBV reguliert wird, ist ungeklärt. Deshalb sollte ein experimentelles *in vitro*-System zur Untersuchung der cccDNA-Bildung des HBV-Genoms etabliert werden.

Der abschließende Schritt der Morphogenese des Hepatitis B Virus ist die Umhüllung des cytoplasmatisch vorgebildeten Nukleokapsids an der die Virusproteine tragenden ER-Membran. Es wurde in vorangegangenen Experimenten beobachtet, dass ausschließlich reife, d.h. DNA-haltige Kapside umhüllt und sezerniert werden. Unreife, RNA-haltige Nukleokapside dagegen werden nicht umhüllt. Die Synthese von DNA im Inneren des Nukleokapsids bewirkt demnach die Bildung eines Signals auf der Partikel-Oberfläche, das die Kapside kompetent für die Umhüllung macht. Durch biochemische Untersuchungen unreifer und reifer Kapside sollte dieses Umhüllungssignal identifiziert werden. Außerdem wurde die Virionbildung in Abhängigkeit von der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins (Cystein 185) untersucht.

In diesem Zusammenhang sollte desweiteren die *in vitro*-Bindung von spezifischen Peptiden, die sich aus bestimmten Regionen der Hüllproteine des HBV ableiten, an Kapside analysiert werden. Dazu wurden Kapside aus Core-Mutanten, die replikationskompetent aber in der Virionbildung blockiert sind, zur Bindung eingesetzt.

# 2. MATERIAL

# 2.1. Bakterienstämme

Tab. 1: Verwendete Stämme von Escherichia coli

| Stamm | Relevanter Genotyp  | Referenz                 |
|-------|---|--------------------------|
| DH5α  | supE44D, lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15), hscR17, recA, endA1, gyrA96, thi-1, relA1                                 | Наманам et al.<br>(1983) |
| JW1   | ara, $\triangle$ (lac-proAB), rpsL, thi, $\Phi$ 80, lacZ $\triangle$ M15, F'lac $^{\rm q}$ , proA $^{\rm +}$ B $^{\rm +}$ | KOLMAR et al. (1990)     |

Genotypenbezeichnungen gemäß BERLYN et al. (1996).

# 2.2. Zelllinien

Tab. 2: Verwendete Zelllinien

| COS7-Zellen (GLUZMANN, 1980)                  | Durch Transformation mit Deletionsmutanten des Simian Virus 40 (SV40) immortalisierte Affennierenzellen. Sie bilden konstitutiv das große T-Antigen des Virus und replizieren deshalb mit hoher Effizienz transfizierte Plasmide, die den SV40-origin of replication enthalten. |
|---|---|
| HuH7-Zellen<br>(NAKABAYASHI et al., 1982)     | Humane Hepatomzelllinie, die stabil oder transient mit der<br>Kalziumphosphat-Methode transfizierbar ist. Diese Zellen<br>setzen im Gegensatz zu HepG2-Zellen nicht nur komplette<br>Virionen, sondern auch nackte Core-Partikel frei.  |
| HepG2-Zellen<br>(ADEN et al., 1979)           | Zelllinie, die aus Biopsiegewebe eines primären, humanen<br>Leberkarzinoms stammt. Morphologisch handelt es sich<br>um Parenchymzellen, die sich durch adhärentes<br>Wachstum auszeichnen.  |
| Insektenzelllinie SF21 (VAUGHN, et al., 1977) | Zelllinie, die aus dem Ovargewebe des Nachtfalter<br>Spodoptera frugiperda stammt. Sie ist empfänglich für<br>Infektionen mit insektenpathogenen Baculoviren.   |
| Insektenzelllinie SF9 (SUMMERS & SMITH, 1987) | Klonale Zelllinie der parentalen SF21-Linie. Sie ist empfänglich für Infektionen mit insektenpathogenen Baculoviren.  |

#### 2.3. Baculoviren

#### BlueBac4.5-RVHBV1.5

Rekombinantes Baculovirus, das die 1,5-fache Kopie des HBV-Genoms aus dem Vektor pRVHBV1.5 WT enthält. Die Viren entstanden durch homologe Rekombination der Baculovirus-DNA "Bac-N-Blue" mit dem Vektor pBlueBac4.5-RVHBV1.5.

#### BlueBac4.5-RVHBV1.5 env

Rekombinantes Baculovirus, das die 1,5-fache Kopie des HBV-Genoms aus dem Vektor pRVHBV1.5 env enthält. Die Viren entstanden durch homologe Rekombination der Baculovirus-DNA "Bac-N-Blue" mit dem Vektor pBlueBac4.5-RVHBV1.5 env.

#### BlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env

Rekombinantes Baculovirus, das die 1,5-fache Kopie des HBV-Genoms aus dem Vektor pRVHBV1.5 RT env enthält. Die Viren entstanden durch homologe Rekombination der Baculovirus-DNA "Bac-N-Blue" mit dem Vektor pBlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env.

#### BlueBac4.5-SVHBV1.5

Rekombinantes Baculovirus, das die 1,2-fache Kopie des HBV-Genoms aus dem Vektor pSVHBV1.5 WT enthält. Das HBV-Genom steht unter Kontrolle des SV40-early-promotors. Die Viren entstanden durch homologe Rekombination der Baculovirus-DNA "Bac-N-Blue" mit dem Vektor pBlueBac4.5-SVHBV1.5.

#### BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env

Rekombinantes Baculovirus, das die 1,2-fache Kopie des HBV-Genoms aus dem Vektor pSVHBV1.5 RT env enthält. Das HBV-Genom steht unter Kontrolle des SV40-early-promotors. Die Viren entstanden durch homologe Rekombination der Baculovirus-DNA "Bac-N-Blue" mit dem Vektor pBlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env.

#### 2.4. Plasmide

# pMKVIII WT (KOSCHEL et al., 1999)

Zwischen die Restriktionsschnittstellen *Hin*dIII und *Bam*HI im Polylinker des Plasmids pBluescript KS(+) (Stratagene, Heidelberg) wurde der bakterielle Tac-Promotor eingesetzt. Durch PCR wurde vor das Core-Gen (Subtyp *adw2*, VALENZUELA et al., 1980) eine *Bam*HI-Schnittstelle (nt 1889) eingeführt. Über diese und eine weitere *Bam*HI-Schnittstelle (nt 26 in der HBV-Sequenz) wurde ein ca. 1400 bp großes DNA-Fragment, welches das Core-Gen enthält, hinter dem Tac-Promotor inseriert. Durch *in vitro* Mutagenese wurden 6 Restriktionsenzymschnittstellen in den Bereich des Core-Gens eingeführt, ohne die Aminosäuresequenz des WT-Core-Proteins zu ändern.

pMKVIII A11-G10 pMKVIII A11-V13 pMKVIII P50-E46 pMKVIII R133-P135 pMKVIII S141-L140 pMKVIII T33-S35

KOSCHEL et al., 1999

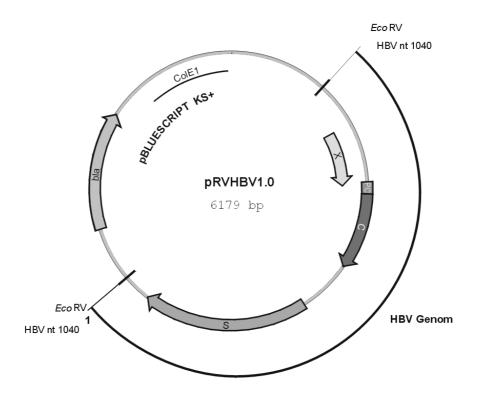
Durch quasi-saturierende Mutagenese des Vektors pMKVIII WT entstandende Core-Protein-Mutanten. Die Bezeichnung gibt die fusionierten As im Ein-Buchstaben-Code an.

#### **pSV65** (PERSING et al., 1986)

Dieser Expressionsvektor wurde durch die Insertion eines 342 bp großen *Pvu*II-*Hin*dIII-Fragments aus dem SV40-Genom in das Plasmid pSP65 (Promega, Madison, USA) hergestellt. Das SV40-Fragment enthält den frühen SV40-Promotor und den SV40-origin of replication. Der Vektor verfügt über einen SP6-Promotor und einen M13-Polylinkerbereich.

#### pRVHBV1.0

Über die Restriktionsschnittstelle *Eco*RV (nt 1040) wurde die einfache Kopie des HBV-Genoms (Subtyp *adw2*, VALENZUELA et al., 1980) mit einer Länge von 3,2 kb in den Vektor pBluescript KS(+) (Stratagene, Heidelberg) inseriert (Abb. 7).



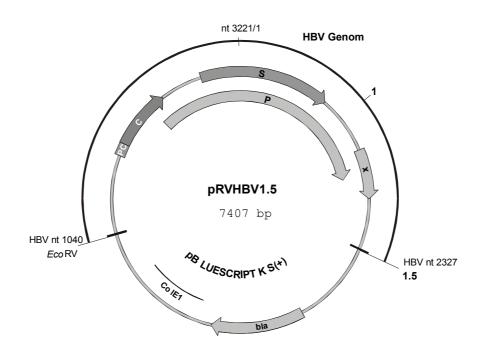
**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Plasmids pRVHBV1.0. bla: Gen für die  $\beta$ -Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, PC: Leserahmen des Präcore-Bereichs des HBV, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV.

# pRVHBV1.0 cATG (diese Arbeit)

In das Konstrukt pRVHBV1.0 WT wurde durch *in vitro* Mutagenese das Startkodon des Core-Gens in ein Kodon, das die Aminosäure Alanin kodiert, umgewandelt (Nukleotidaustausche A1899G, T1900C und G1901C), so dass kein Core-Protein gebildet werden kann. Die Mutation wirkte sich im überlappenden Präcore-Gen aus. Das Kodon ATG (Methionin) wurde in ein GCC (Alanin) umgewandelt.

# **pRVHBV1.5** (BRUSS & GANEM, 1991)

Über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RV (nt 1040) und *Bsp*MII (nt 2327) wurde die 1,5-fache Kopie des HBV-Genoms (Subtyp *adw2*, VALENZUELA et al., 1980) mit einer Länge von 4,5 kb in den Vektor pBluescript KS(+) (Stratagene, Heidelberg) inseriert (Abb. 8). Über dieses Konstrukt wird das gesamte HBV-Genom exprimiert.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des Plasmids pRVHBV1.5. bla: Gen für die  $\beta$ -Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, PC: Leserahmen des Präcore-Bereichs des HBV, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV, P: Leserahmen der Polymerase des HBV.

#### pRVHBV1.5 env<sup>-</sup> (BRUSS & GANEM, 1991)

In das Konstrukt pRVHBV1.5 WT wurde durch *in vitro* Mutagenese im S-Bereich ein Stopkodon eingeführt (Nukleotidaustausch T196G), so dass keine L-, M- und SHBs-Proteine gebildet werden können. Die Mutation wirkte sich nicht im überlappenden Polymerase-Gen aus.

#### pRVHBV1.5 RT env (GERELSAIKHAN et al., 1996)

In das Konstrukt pRVHBV1.5 env wurde durch *in vitro* Mutagenese ein G (nt 740) gegen ein C ausgetauscht, wodurch der Aspartatrest in dem für reverse Transkriptasen typischen Aminosäuresequenzmotiv YMDD an der Position 552 des P-Proteins zu einem Histidinrest (YMHD) verändert wurde, so dass die reverse Transkriptaseaktivität des Polymerase-Proteins blockiert ist.

# pRVHBV1.5core (KOSCHEL et al., 2000)

Das Plasmid entspricht dem Konstrukt pRVHBV1.5 bis auf einen Nukleotidaustausch an der Position 2012. Durch *in vitro* Mutagenese wurde ein T gegen ein G ersetzt. Das Kodon TAT (Tyrosin) wurde in ein Stop-Kodon (TAG) umgewandelt. Somit kann von

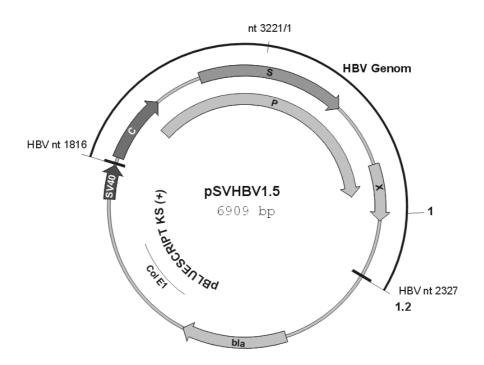
diesem Vektor kein Core-Protein mehr exprimiert werden, aber alle anderen Strukturproteine.

# pRVHBV1.5 cATG (diese Arbeit)

Das Plasmid entspricht dem Konstrukt pRVHBV1.5 bis auf Nukleotidaustausche an den Positionen 1898, 1899 und 1900. Durch *in vitro* Mutagenese wurde das Startkodon des Core-Proteins (ATG) in ein GCC umgewandelt, das für die Aminosäure Alanin kodiert. Somit kann von diesem Vektor kein Core-Protein mehr exprimiert werden, aber alle anderen HBV-Proteine.

# pSVHBV1.5

Das Plasmid enthält ein 1,2mer des HBV-Genoms (HBV-Sequenz Subtyp *adw2*; VALENZUELA et al., 1980). Der Core-Promotor der HBV-DNA wurde durch den SV40-early-promotor ersetzt (Abb. 9). Über dieses Konstrukt wird das gesamte HBV-Genom exprimiert. Es wurde aus dem Plasmid pRVHBV1.5 konstruiert und freundlicherweise von PD Dr. V. Bruss zur Verfügung gestellt.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung des Plasmids pSVHBV1.5 WT. bla: Gen für die  $\beta$ -Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV, P: Leserahmen der Polymerase des HBV, SV40: SV40-Promotor.

#### pSVHBV1.5 L

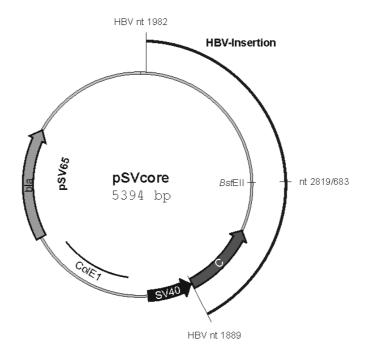
Das Plasmid entspricht pSVHBV1.5. An Position 3006 wurde ein Guanosinrest zu einem Adenosinrest mutiert. Durch diese Punktreaktion wird ein Stop-Kodon in den Leserahmen des PräS1-Gens eingefügt, so dass kein LHBs gebildet wird. Daher entstehen auch keine infektiösen Virionen. Es können nur subvirale Partikel sezerniert werden. Die Mutation wirkt sich nicht im überlappenden Polymerase-Leseraster aus, so dass die Bildung vollständiger Core-Partikel nicht behindert ist. Das Plasmid pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> wurde freundlicherweise von PD Dr. V. Bruss zur Verfügung gestellt.

#### pSVHBV1.5 RT env

In das Konstrukt pSVHBV1.5 wurde durch *in vitro* Mutagenese im S-Bereich ein Stopkodon eingeführt (Nukleotidaustausch T196G), so dass keine L-, M- und SHBs-Proteine gebildet werden kann. Desweiteren wurde durch *in vitro* Mutagenese ein G (nt 740) gegen ein C ausgetauscht, wodurch der Aspartatrest in dem für reverse Transkriptasen typischen Aminosäuresequenzmotiv YMDD an der Aminosäure-Position 552 des P-Proteins zu einem Histidinrest (YMHD) verändert wurde, so dass die reverse Transkriptaseaktivität des Polymerase-Protein blockiert ist. Das Plasmid pSVHBV1.5 RT env wurde freundlicherweise von PD Dr. V. Bruss zur Verfügung gestellt.

# pSVcore (KOSCHEL et al., 2000)

Dieser eukaryotische Expressionsvektor trägt ein 930 bp HBV-Core-Genfragment. Über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Bst*EII wurde das Fragment aus dem Plasmid pMKVIII in den Vektor pSVBX24H (BRUSS & GANEM, 1991) eingesetzt (Abb. 10).



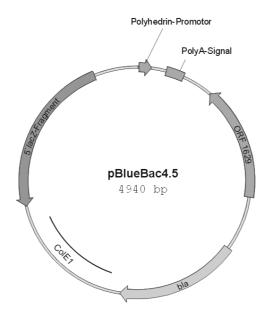
**Abb. 10:** Schematische Darstellung des Plasmids pSVcore. bla: Gen für die  $\beta$ -Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, SV40: SV40-Promotor.

# pSVcoreC185S (diese Arbeit)

Das Plasmid entspricht dem Konstrukt pSVcore bis auf Nukleotidaustausche an den Positionen 2452 und 2453. Durch *in vitro* Mutagenese wurde das Kodon TGT (Cystein) in ein TCC umgewandelt, das für die Aminosäure Serin kodiert. Somit kann von diesem Plasmid Core-Protein exprimiert werden, das am C-Terminus anstelle der Aminsäure Cystein ein Serin trägt.

#### pBlueBac4.5 (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

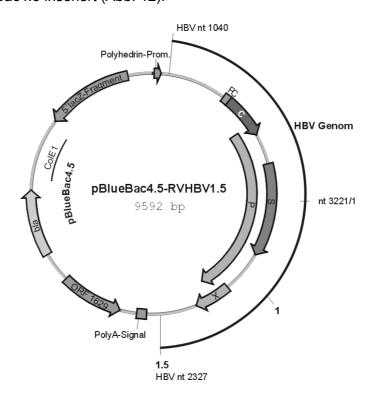
Das Plasmid dient zur Herstellung rekombinanter, HBV-DNA enthaltender Baculoviren. Nach Insertion der gewünschten HBV-DNA wird es als Baculotransfer-Vektor genutzt. Es beinhaltet das 5'-Ende des *lacZ*-Gens und den ORF1629 des Baculovirusgenoms (Abb. 11). Über diese Sequenzen findet die komplettierende homologe Rekombination in das linearisierte Baculovirusgenom (Bac-N-Blue DNA) statt.



**Abb. 11:** Schematische Darstellung des Plasmids pBlueBac4.5. bla: Gen für die β-Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, PolyA-Signal: Polyadenylierungssignal, ORF 1629: den Polyhedrin-Promotor flankierender offener Leserahmen des Baculovirus.

# pBlueBac4.5-RVHBV1.5 (diese Arbeit)

Derivat von pBlueBac4.5 zur Konstruktion rekombinanter Baculoviren. Aus dem Plasmid pRVHBV1.5 wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Sma*I das 1,5-fache HBV-Genom in pBlueBac4.5 inseriert (Abb. 12).



**Abb. 12:** Schematische Darstellung des Plasmids pBlueBac4.5-RVHBV 1.5. Legende siehe folgende Seite.

Legende zur Abb. 12.

bla: Gen für die β-Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, PolyA-Signal: Polyadenylierungssignal, ORF 1629: den Polyhedrin-Promotor flankierender offener Leserahmen des Baculovirus, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, PC: Leserahmen des Präcore-Bereichs des HBV, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV, P: Leserahmen der Polymerase des HBV.

# pBlueBac4.5-RVHBV1.5 env (diese Arbeit)

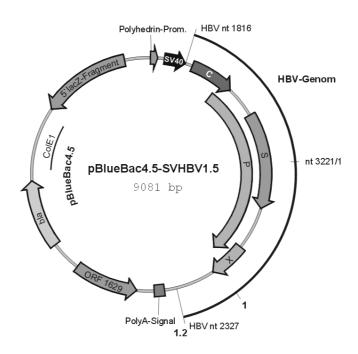
Derivat von pBlueBac4.5 zur Konstruktion rekombinanter Baculoviren. Aus dem Plasmid pRVHBV1.5 env wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xhol* und *Smal* das 1,5-fache HBV-Genom in pBlueBac4.5 inseriert.

# pBlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env (diese Arbeit)

Derivat von pBlueBac4.5 zur Konstruktion rekombinanter Baculoviren. Aus dem Plasmid pRVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Sma*I das 1,5-fache HBV-Genom in pBlueBac4.5 inseriert.

#### pBlueBac4.5-SVHBV1.5 (diese Arbeit)

Derivat von pBlueBac4.5 zur Konstruktion rekombinanter Baculoviren. Aus dem Plasmid pSVHBV1.5 WT wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xhol* und *Pstl* der SV40-early-promotor und Teile des HBV-Genoms in das ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid pBlueBac4.5-RVHBV1.5 inseriert. Das Plasmid enthält die 1,2-fache Kopie des HBV-Genoms unter Kontrolle des SV40-Promotors (Abb. 13).



**Abb. 13:** Schematische Darstellung des Plasmids pBlueBac4.5-SVHBV1.5. Legende siehe folgende Seite.

Legende zur Abb. 13.

bla: Gen für die β-Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, PolyA-Signal: Polyadenylierungssignal, ORF 1629: den Polyhedrin-Promotor flankierender offener Leserahmen des Baculovirus, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, C: Leserahmen des Core-Protein des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV, P: Leserahmen der Polymerase des HBV, SV40: SV40-Promotor.

#### pBlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env (diese Arbeit)

Derivat von pBlueBac4.5 zur Konstruktion rekombinanter Baculoviren. Aus dem Plasmid pSVHBV1.5 WT wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xhol* und *Pstl* der SV40-early-promotor und Teile des HBV-Genoms in das ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid pBlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env inseriert.

## 2.5. Enzyme

Tab. 3: Verwendete Enzyme

| Enzym                            | Hersteller                         |
|----------------------------------|------------------------------------|
| DNasel                           | Roche, Mannheim                    |
| Lysozym                          | Sigma, Steinheim                   |
| Mikrokokkennuklease              | Roche, Mannheim                    |
| Plasmid Safe ATP-Dependent-DNase | Biozym, Hessisch Oldendorf         |
| Proteinase K                     | Amresco, Ohio, USA                 |
| Proteinkinase C                  | Roche, Mannheim                    |
| Restriktionsendonukleasen        | New England Biolabs, Schwalbach    |
| RNase A                          | Roche, Mannheim                    |
| T4 DNA-Ligase                    | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| Taq DNA-Polymerase               | Roche, Mannheim                    |
| Trypsin                          | Sigma, Steinheim                   |

Die für die Verwendung der Enzyme relevanten Puffer wurden vom Hersteller bezogen oder nach dessen Angaben angefertigt.

## 2.6. Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotidprimer wurden für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion), zur Mutagenese oder für die Sequenzierung eingesetzt.

Tab. 4: Eingesetzte Oligonukleotide

| Primer | Lage bei HBV nt | Sequenz 5´→ 3´-Richtung             |
|--------|-----------------|-------------------------------------|
| #VB10  | 2070-2088       | GCC ATT CTC TGC TGG GGG             |
| #VB25  | 2600-2611       | CAG TGA GAG GGC                     |
| #r5    | 259-287         | GAT CCC CCT AGA AAA TTG AGA GAA     |
|        |                 | GTC C                               |
| #0041  | 1392-1414       | CCA ACT GGA TCC TGC GCG GGA CG      |
| #0070  | 2394-2420       | ACG CGG CGA TTG AGC TCT GCG TCT     |
|        |                 | GCG                                 |
| #0135  | 2208-2178       | GAAACC ACA ATA GTT GCC TGA GCT TTA  |
|        |                 | AAC C                               |
| #0142  | 2655-2675       | CTA TCC TAC CCA CAC TAA ATA         |
| #0143  | 2439-2462       | CGG GAA TCT CAA TCC TAG TAT TCC     |
| #0144  | 2440-2466       | CCA AGG AAT ACT AGG ATT GAG ATT CCC |
| #0152  | 1981-2002       | GAG GCG GTG TCT AGG AGA TCT C       |
| #0222  | 1888-1916       | GGC TTT GGG GCG CCG ACA TTG ACC     |
|        |                 | CTT AT                              |
| #4881  | 2256-2273       | GTC TCT TTC GGA GTG TGG             |
| #6318  | 2980-2997       | CCC CAT CGA TTT GAC GGG GTT GAA     |
|        |                 | GTC C                               |
| #6574  | 636-650         | CTA TGG GAG GTG GGC C               |

Die Angaben zur Position der Primer bezieht sich auf die HBV-Sequenz des Subtyps *adw2* (VALENZUELA et al., 1980).

## 2.7. Antikörper

Tab. 5: Verwendete Antikörper

| rb anti-HBc | anti-HBc, polyklonales Serum,   | DAKO, Hamburg               |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------|
|             | Kaninchen                       |                             |
| gt anti-HBs | anti-HBs, polyklonales Serum,   | DAKO, Hamburg               |
|             | Ziege                           |                             |
| F1451       | anti-HBc/e, polyklonales Serum, | Abt. Virologie, Universität |
|             | Mensch                          | Göttingen                   |

| F2760               | anti-HBc/e, polyklonales Serum,  | Abt. Virologie, Universität |
|---------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|                     | Mensch                           | Göttingen                   |
| anti-HBc-konjugiert | POD konjugiert, Schaf            | Abt. Virologie, Universität |
|                     |                                  | Göttingen                   |
| Cy2 anti-rabbit IgG | anti-IgG Kaninchen, Carbocyanin- | Dianova, Hamburg            |
|                     | konjugiert, Esel                 |                             |
| Universal Antibody- | anti-IgG, POD-konjugiert,        | Eurogentec, Seraing,        |
| HRP                 | rekombinantes Protein            | Belgien                     |

## 2.8. Peptide

Die Peptide wurden von der Arbeitsgruppe P. Roingeard (Medizinische Fakultät der Universität Tours, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration betrug jeweils 0,1 mg/ml.

Tab. 6: Verwendete Peptide

| Peptid | Aminosäureposition | Sequenz N→C-Richtung                  |  |
|--------|--------------------|---------------------------------------|--|
| L2     | 29-56              | NPD WDF NPN KDT WPD ANK VGA GAF GLG F |  |
| L4a    | 77-95              | TLP ANP PPA STN RQS GRQ PT            |  |
| L4b    | 96-116             | PLS PPL RNT HPQ AMQ WNS TTF           |  |
| S1     | 31-55              | SLD SWW TSL NFL GGT TVC LGQ NSQ S     |  |
| S2     | 56-80              | PTS NHS PTS CPP TCP GYR WMC LRR F     |  |

Die Angaben zur Position der Aminosäuren beziehen sich bei L2, L4a und L4b auf die Aminosäuresequenz des großen Hüllproteins, bei S1 und S2 auf die Aminosäuresequenz des kleinen Hüllproteins des HBV des Subtyps *ayw* (GALIBERT et al., 1979).

## 2.9. DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandards bei der Auftrennung DNA-haltiger Lösungen im Agarosegel dienten:

λ-DNA, *BstE*II-verdaut, New England Biolabs, Schwalbach 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

**Tab. 7:** Referenz-DNA-Fragmente als Größenstandards (in bp)

| λ-DNA, BstEll-verdaut | 100 bp DNA Ladder Plus |
|-----------------------|------------------------|
| 8454                  | 3000                   |
| 7242                  | 2000                   |
| 6369                  | 1500                   |
| 5686                  | 1200                   |
| 4822                  | 1031                   |
| 4324                  | 900                    |
| 3675                  | 800                    |
| 2323                  | 700                    |
| 1929                  | 600                    |
| 1371                  | 500                    |
| 1264                  | 400                    |
| 701                   | 300                    |
| 244                   | 200                    |
| 117                   | 100                    |

## 2.10. Proteinstandards

Als Größenreferenz für im SDS-PAGE aufgetrennte Proteine diente der "Rainbow marker low" der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg oder der "ROTI-Mark PRESTAINED" der Firma Roth, Karlsruhe.

Tab. 8: Referenzproteine als Größenstandards

"Rainbow marker low"

"ROTI-Mark PRESTAINED"

| Bande             | kD   |
|-------------------|------|
| Ovalbumin         | 46,0 |
| Carboanhydrase    | 30,0 |
| Trypsin-Inhibitor | 21,5 |
| Lysozym           | 14,3 |
| Aprotinin         | 6,5  |
| Insulin (b) Kette | 3,4  |
| Insulin (a) Kette | 2,35 |

| Bande             | kD    |
|-------------------|-------|
| Myosin            | 245,0 |
| β-Galaktosidase   | 123,0 |
| Serum-Albumin     | 77,0  |
| Ovalbumin         | 42,0  |
| Carboanhydrase    | 30,0  |
| Trypsin-Inhibitor | 25,4  |
| Lysozym           | 17,0  |

## 2.11. Radionukleotide

Tab. 9: Verwendete Radionukleotide

| $\alpha^{35}$ S-dATP  | spez. Akt. 600 Ci/mmol  | NEN, Bad Homburg                        |
|---|-------------------------|---|
| $\alpha^{32}$ P-dCTP  | spez. Akt. 3000 Ci/mmol | NEN, Bad Homburg                        |
| <sup>35</sup> S Protein labeling Mix<br>( <sup>35</sup> S-Methionin, <sup>35</sup> S-Cystein) | spez. Akt. 1200 Ci/mmol | NEN, Bad Homburg                        |
| $\gamma^{32}$ P-ATP   | spez. Akt. 6000 Ci/mmol | NEN, Bad Homburg                        |
| Rainbow [ <sup>14</sup> C]-methylierter<br>Protein-Marker (high range)                        | k.A.                    | Amersham Pharmacia<br>Biotech, Freiburg |

## 2.12. Nährmedien für die Anzucht von Escherichia coli

Tab. 10: Medien für die Anzucht von Bakterienkulturen

| LB-Medium  | Hefeextrakt<br>Trypton<br>NaCl<br>mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>  | 5 g<br>10 g<br>10 g<br>ad 1000 ml                                 |
|------------|--|---|
| TYM-Medium | Hefeextrakt Trypton NaCl MgCl <sub>2</sub> oder MgSO <sub>4</sub> mit H <sub>2</sub> O bidest.   | 5 g<br>20 g<br>6 g<br>0,01 M<br>ad 1000 ml                        |
| TB-Medium  | Hefeextrakt Trypton Glycerin mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> . getrennt autoklavieren K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> . | 24 g<br>12 g<br>4 ml<br>ad 900 ml<br>16,4 g<br>2,3 g<br>ad 100 ml |
| LB-Agar    | Bacto-Agar<br>in LB-Medium   | 15 g<br>1000 ml   |

## 2.13. Nährmedien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

Tab. 11: Medien für die eukaryotische Zellkultur

| Medium   | Zelllinie                      | Zusammensetzung  |
|--|--------------------------------|--|
| DMEM suppl.                                    | COS7<br>HuH7                   | DMEM<br>10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS)<br>1 % (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum   |
| DMEM/Met <sup>-</sup> /Cys <sup>-</sup> suppl. | HuH7                           | DMEM/Met <sup>-</sup> /Cys <sup>-</sup><br>4 mM Glutamin   |
| HepG2-Medium suppl.                            | HepG2                          | 67 % (v/v) MEM 22 % (v/v) Medium 199 5 mg/l Insulin 0,175 mg/l Hydrocortison 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS) 1 % (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum |
| TC100 suppl.                                   | Insektenzellen<br>SF9 und SF21 | TC100-Medium 6 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS) 1 % (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum  |
| Sf-900 II SFM suppl.                           |                                | Sf-900 II SFM 6 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS) 0,1 % (v/v) Pluronic F-68 1 % (v/v) Antibiotikum-Antimykotikum                                       |
| Grace-Medium                                   |                                | Serum und Antibiotikum-<br>Antimykotikum-freies Medium   |

Alle aufgeführten Medien und Medienbestandteile wurden von der Firma Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

## 2.14. Lösungen und Puffer

Tab. 12: Lösungen und Puffer

| Lösung/ Puffer              | Zusammensetzung   |            |
|-----------------------------|-------------------|------------|
| Bindungspuffer für          | Tris-HCI, pH 9,5  | 100 mM     |
| Mikrosomenansätze           | NaCl              | 100 mM     |
|                             | MgCl <sub>2</sub> | 50 mM      |
| Blotpuffer für Western Blot | Glycin            | 0,192 M    |
|                             | Tris              | 25 mM      |
|                             | Methanol          | 15 % (v/v) |

| Lösung/ Puffer                     | Zusammensetzung                  |                      |  |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------|--|
| Coating-Puffer                     | Na-Phosphat, pH 7,6              | 17,5 mM              |  |
| Coomassie-Entfärber                | Methanol                         | 10 % (v/v)           |  |
|                                    | Essigsäure                       | 5 % (v/v)            |  |
| Coomassie-Färbelösung              | Methanol                         | 50 % (v/v)           |  |
|                                    | Essigsäure                       | 10 % (v/v)           |  |
|                                    | Coomassie-Brillant-Blau          | 0,1 % (w/v)          |  |
| DEAE-Dextran/Chloroquin            | DEAE-Dextran                     | 10 mg/ml             |  |
|                                    | Chloroquin                       | 2,5 mM               |  |
| Denaturierungslösung für           | NaOH                             | 0,5 M                |  |
| Southern Blot                      | NaCl                             | 1,5 M                |  |
| HEPES-Puffer (2 x)                 | Hepes                            | 50 mM                |  |
|                                    | NaCl                             | 280 mM               |  |
|                                    | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,5 mM, mit NaOH     |  |
|                                    |                                  | auf pH7,1 einstellen |  |
| Laufpuffer (10 x)                  | Tris                             | 0,25 M               |  |
| für SDS-PAGE                       | Glycin                           | 1,92 M               |  |
|                                    | SDS                              | 1 % (w/v)            |  |
| Lösung I für die                   | Glucose                          | 50 mM                |  |
| Plasmidpräparation                 | Tris-HCI, pH 8,0                 | 25 mM                |  |
|                                    | EDTA                             | 10 mM                |  |
| Lösung II für die                  | NaOH                             | 0,2 N                |  |
| Plasmidpräparation                 | SDS                              | 1 % (w/v)            |  |
| Lösung III für die                 | K <sup>+</sup>                   | 3 M                  |  |
| Plasmidpräparation                 | Acetat <sup>-</sup>              | 5 M, pH 5,5 mit      |  |
|                                    |                                  | Eisessig einstellen  |  |
| Lösung IV für die                  | LiCl                             | 5 M, -20 °C          |  |
| Plasmidpräparation                 |                                  |                      |  |
| Lösung V für die                   | Polyethylenglykol 6000           | 13 % (w/v)           |  |
| Plasmidpräparation                 | NaCl 1,6 M                       |                      |  |
| Lysispuffer zur ccc-DNA-Isolierung | Tris-HCI, pH 8,0                 | 50 mM                |  |
|                                    | EDTA                             | 10 mM                |  |
|                                    | NaCl                             | 150 mM               |  |
|                                    | SDS                              | 1 % (w/v)            |  |

| Lösung/ Puffer                    | Zusammensetzung                  |                 |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Lysispuffer zur Proteinisolierung | Tris-HCl, pH 8,0                 | 50 mM           |
| aus <i>E. coli</i>                | EDTA                             | 5 mM            |
|                                   | NaCl                             | 150 mM          |
|                                   | Lysozym                          | 2 mg/ml         |
|                                   | PMSF                             | 100 μg/ml       |
|                                   | DNasel                           | 20 μg/ml        |
| Mikrokokkennuklease-Puffer        | Glycin                           | 50 mM           |
|                                   | Ca-Acetat                        | 5 mM            |
|                                   |                                  | pH 9,2 mit NaOH |
|                                   |                                  | einstellen      |
| Milch-Puffer                      | Magermilchpulver                 | 5 % (w/v)       |
|                                   | Tween20                          | 0,2 % (v/v)     |
|                                   | in PBS inkompl.                  |                 |
| Mowiol-Eindeckelmedium            | Mowiol 4-88                      | 1 % (w/w)       |
|                                   | Glycerin                         | 19,5 % (v/v)    |
|                                   | Tris-HCl, pH 8,5                 | 0,1 M           |
| Neutralisierungspuffer            | Tris-HCl, pH 7,5                 | 0,5 M           |
|                                   | NaCl                             | 1,5 M           |
| PBS inkomplett                    | NaCl                             | 180 mM          |
|                                   | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8,5 mM          |
|                                   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2,2 mM          |
| Probenauftragspuffer (4 x)        | Tris-HCI, pH 6,8                 | 0,25 M          |
| für SDS-PAGE                      | SDS                              | 12 % (w/v)      |
|                                   | Glycerin                         | 20 % (v/v)      |
|                                   | Bromphenolblau                   | 0,06 % (w/v)    |
|                                   | DTT (frisch zugeben)             | 20 % (w/v)      |
| Probenpuffer (6 x)                | TAE                              | 6 x             |
| für Agarosegelelektrophorese      | Bromphenolblau                   | 0,04 % (w/v)    |
|                                   | Xylencyanol FF                   | 0,04 % (w/v)    |
|                                   | Glycerol                         | 30 %            |
| Proteinase K-Puffer (2 x)         | SDS                              | 2 % (w/v)       |
|                                   | Tris-HCl, pH 7,5                 | 20 mM           |
|                                   | EDTA                             | 20 mM           |

| Lösung/ Puffer                  | Zusammensetzung                  |                       |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Proteinkinase C-Puffer (5 x)    | Tris-HCl, pH 7,5                 | 100 mM                |
|                                 | MgCl <sub>2</sub>                | 50 mM                 |
|                                 | CaCl <sub>2</sub>                | 2,5 mM                |
|                                 | Phosphatidylserin                | 100 mg/ml             |
| RNase A-Lösung                  | RNase A                          | 20 μg/ml in TE-Puffer |
| Sammelgelpuffer (4 x)           | Tris-HCl, pH 6,8                 | 0,5 M                 |
|                                 | SDS                              | 0,4 % (w/v)           |
| Substratmix für ELISA           | Zitronensäure                    | 100 mM                |
|                                 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 200 mM                |
|                                 | Orthophenyldiamin                | 0,4 mM                |
| TAE (50 x)                      | Tris-Acetat, pH 7,8              | 2 M                   |
|                                 | EDTA                             | 50 mM                 |
| TBE (10 x)                      | Tris                             | 0,9 M                 |
|                                 | Borsäure                         | 0,9 M                 |
|                                 | EDTA, pH 8,0                     | 20 mM                 |
| TBS                             | Tris-HCl, pH 7,4                 | 25 mM                 |
|                                 | NaCl                             | 200 mM                |
|                                 | KCI                              | 2,7 mM                |
| TE-Puffer                       | Tris-HCl, pH 8,0                 | 10 mM                 |
|                                 | EDTA                             | 1 mM                  |
| TE/RNase-Puffer                 | Tris-HCl, pH 8,0                 | 10 mM                 |
|                                 | EDTA                             | 1 mM                  |
|                                 | RNaseA                           | 50 μg/ml              |
| TNE-Puffer                      | NaCl                             | 100 mM                |
|                                 | EDTA                             | 0,1 mM                |
|                                 | Tris-HCl, pH 8,0                 | 10 mM                 |
| Transformationspuffer I (TFB I) | Kalium-Acetat                    | 30 mM                 |
|                                 | Glycerin                         | 15 % (w/v)            |
|                                 | KCI                              | 100 mM                |
|                                 | CaCl <sub>2</sub>                | 10 mM                 |
|                                 | MnCl <sub>2</sub>                | 50 mM, pH 5,8 mit     |
|                                 |                                  | Essigsäure einstellen |

| Lösung/ Puffer                    | Zusammensetzung   |                     |
|-----------------------------------|---|---------------------|
| Transformationspuffer II (TFB II) | 3-(N-Morpholino)propan-<br>sulfonsäure (MOPS)               | 10 mM               |
|                                   | CaCl <sub>2</sub>   | 75 mM               |
|                                   | KCl <sub>2</sub>  | 10 mM               |
|                                   | Glycerin  | 15 % (v/v)          |
| Trenngelpuffer (4 x)              | Tris-HCI, pH 8,8  | 1,5 M               |
|                                   | SDS   | 0,1 % (w/v)         |
| Trypan-Blau                       | Trypan-Blau   | 0,25 % (v/v) in PBS |
| Waschpuffer A                     | Harnstoff   | 2 M                 |
|                                   | SDS   | 0,1 % (w/v)         |
|                                   | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, pH 7,0 | 50 mM               |
|                                   | NaCl  | 150 mM              |
|                                   | MgCl <sub>2</sub>   | 10 mM               |
| Waschpuffer B                     | Tris-HCI, pH 10,0   | 50 mM               |
|                                   | NaCl  | 100 mM              |
|                                   | MgCl <sub>2</sub>   | 2 mM                |

## 2.15. Geräte

| Autoradiographie Film BIOMAX MR                | Kodak, Rochester, USA        |
|--|------------------------------|
| Brutschrank CO <sub>2</sub> -Auto-Zero         | Heraeus, Hanau               |
| Elektroblot-Kammer                             | Biorad, München              |
| ELISA-Plattenwaschgerät                        | Dynatech, Denkendorf         |
| Gelkassette                                    | Biorad, München              |
| Geltrockner                                    | Biotec Fischer, Reiskirchen  |
| Hochvakuumpumpe                                | Leybold Heraeus, Osterode    |
| Kühlfalle                                      | Leybold Heraeus, Osterode    |
| Hybridisierungsofen "Mini 10"                  | Hybaid, Heidelberg           |
| Laufkammer für Agarosegelelektrophoresen       | Eigenbau                     |
| Laufkammer für Polyacrylamidgelelektrophoresen | Eigenbau                     |
| Vertikalelektrophorese-System                  | Hoefer Sci. Ins., Heidelberg |
| mighty small tall SE 280T                      |                              |
| Magnetrührer                                   | IKA, Schütt, Göttingen       |

Mikroskop "Telaval 31" Zeiss, Jena
Mikroskop "Leica DMR" Leica, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer Zeiss, Jena

pH-Meter "Mettler Toledo MP225" Merck Labor, Dietikon, Schweiz

Refraktometer Zeiss, Jena

Schüttler Lab-Shaker Braun, Melsungen

Sequenziergerät ABI 373 A DNA-Sequencer Applied Biosystems, Weiterstadt

Sofortbildphotographie

Orangefilter Hoya G
Polaroid, Herts, Großbritanien
Polaroid-Filme Typ 667
Polaroid, Herts, Großbritanien
Polaroid-Sofortbildkamera-System
Polaroid, Herts, Großbritanien

Ultraviolett-Schirm Kodak, Rochester, USA

Chroma 41 (254 nm)

Spannungsgerät E883 Peqlab, Erlangen

Spektralphotometer

Immuno-Reader NJ2000 Intermed, Deutschland
Spektralphotometer DU70 Beckman, München
Sterilbank "HERAsafe" Heraeus, Hanau
Szintillationszähler PW4700 Philips, Hamburg
Tischinkubator Eppendorf, Hamburg

Transblot-Zelle TE mighty small Transphor Hoefer Sci. Ins., Heidelberg Thermo-Cycler "GeneAmp PCR System 9600" Perkin Elmer, Norwalk, USA Ultraschallgerät Branson-Sonifier-250 Branson, Bad Liebenzell

Waagen

Feinwaage handy Sartorius, Göttingen Grobwaage universal Sartorius, Göttingen Wasserbad GFL, Burgwedel

Vortexgerät Bender & Hobein AG, Schweiz

Zentrifugen

Eppendorf Tischzentrifuge C5415

Kühlzentrifuge 5402

Kühlzentrifuge RC 26 plus

Rotor SLA-3000

Rotor SA 300

Sorvall, Bad Homburg

Sorvall, Bad Homburg

Sorvall, Bad Homburg

Sorvall, Bad Homburg

Hettich, Tuttlingen

Ultrazentrifuge L8-M

Ultrazentrifuge L8-M

Eppendorf, Hamburg

Sorvall, Bad Homburg

Hettich, Tuttlingen

Beckman, München

Rotor SW 28 Beckman, München
Rotor SW 40 Beckman, München
Rotor SW 60 Beckman, München
TI 70.1-Rotor Beckman, München

#### 2.16. Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, im Reinheitsgrad "zur Analyse" oder "reinst" von den Firmen Merck (Darmstadt), Paesel & Lorei (Frankfurt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) bezogen. Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Kassel) verwendet.

Acrylamid-Lösung (38 % (w/v) Acrylamid, Applichem, Darmstadt

2 % (w/v) Bisacrylamid)

Adenosintriphosphat Roche, Mannheim
Agarose Peqlab, Erlangen
Ammoniumpersulfat (APS) Sigma, Steinheim
Ampicillin Serva, Heidelberg
ATP-Lösung (25 mM) Roche, Mannheim

Bacto-Hefeextrakt Bacton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Bacto-Trypton Bacton-Dickinson, Franklin Lakes, USA

Bromphenolblau Serva, Heidelberg
Coomassie-Blau R250 Merck, Darmstadt
Desoxynukleotide Roche, Mannheim
Dialyseschläuche Serva, Heidelberg
3,3-Diaminobenzidintetrahydro-Chlorid Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO) Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT) Serva, Heidelberg

Entwickler Kodak, Rochester, USA Fixierer Kodak, Rochester, USA

Immobilon-Membran PVDF Millipor Corporation, Bedford

IPTG (Isopropyl-β-D-galactopyranosid) Serva, Heidelberg

Lamivudin (2-Desoxy-3-thiacytidin) GlaxoWellcome, Greenford, Großbritanien

Milchpulver Glücksklee

Mowiol 4-88 Calbiochem, La Jolla, USA

Nonidet P40 Sigma, Steinheim

#### MATERIAL

Nycodenz (Röntgenkontrastmittel)

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

Polyethylenglykol (PEG) 6000

Prism Ready Reaction DyeDeoxy

Terminator Cycle Sequencing Kit

Sequenzierungs-Kit, Version 2.0

PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)

TEMED (N,N,N',N'-

Tetramethylethylendiamin)

Tween 20

Life Technologies, Eggenstein

Sigma, Steinheim

Serva, Heidelberg

Applied Biosystems, Weiterstadt

USB, Cleveland, USA

Sigma, Steinheim

Serva, Heidelberg

Merck, Darmstadt

#### 3. METHODEN

## 3.1. Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1. Anzucht der E. coli-Stämme

Die Bakterienstämme *E. coli* DH5 $\alpha$  (2.1.) und JW1 (2.1.) wurden in sterilem LB- oder TB-Medium (2.11.) bei 37 °C als stationäre Schüttelkultur angezogen. Als Selektionsmedium wurde jeweils Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml eingesetzt.

### 3.1.2. Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der relativen Zelldichte erfolgte indirekt durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) im DU70-Spektralphotometer.

#### 3.1.3. Herstellung kompetenter E. coli-Zellen

Kompetente Bakterienzellen sind in der Lage, freie DNA aufzunehmen. Diese Fähigkeit der Zellen ändert sich mit dem physiologischen Zustand. Die Ausprägung der Kompetenz ist während der exponentiellen Wachstumsphase am stärksten und sinkt danach rasch ab.

Eine einzelne Kolonie des entsprechenden Bakterienstamms wurde für 2 Stunden in 5 ml sterilem TYM-Medium (2.11.) bei 37 °C und 110 upm auf einem Schüttler (Lab-Shaker, Braun, Melsungen) inkubiert. Das gesamte Volumen dieser Vorkultur wurde in 100 ml TYM-Medium überimpft und die Hauptkultur unter denselben Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,4 bei einer Wellenlänge von 600 nm (DU70-Spektralphotometer) wurde die Hauptkultur zur Ernte bei 3000 upm und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Hettich 30RF, Göttingen).

Das Bakterienpellet wurde in 40 ml sterilem Transformationspuffer I (2.13.) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine zweite Zentrifugation der Bakteriensuspension unter den oben genannten Bedingungen. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 4 ml sterilem eiskaltem Transformationspuffer II (2.13.) vorsichtig resuspendiert. Nach Portionierung der Bakteriensuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis wurden die kompetenten Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70 °C aufbewahrt (HANAHAN, 1983).

#### 3.1.4. Transformation von *E. coli*

Die Übertragung von freier löslicher DNA in ein Bakterium wird als Transformation bezeichnet. Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

Schockgefrorene kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente Zellen mit 1 ng DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Steigerung der Transformationsrate folgte eine Inkubation des Transformationsansatzes für 90 sec bei 42 °C. Nachdem der Ansatz 2 min auf Eis abgekühlt wurde, erfolgte die Zugabe von 200 µl LB-Medium (2.11.) und eine Inkubation für 45 min bei 37 °C. Je 0,1 ml des Transformationsansatzes wurden auf LB-Amp-Platten (2.11.) ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

#### 3.1.5. Induktion IPTG-induzierbarer Promotoren im präparativen Maßstab

Jeweils 5 x 400 ml LB-Amp-Medium (2.11.) wurden mit 8 ml einer Übernachtkultur der entsprechenden  $E.\ coli$ -Stämme angeimpft. Jede Kultur wurde in einem 2000 ml-Kolben bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Kulturen erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,2 mM Endkonzentration) für 6 h bei 37 °C. Die Zellernte und Lysatherstellung erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben.

#### 3.2. Methoden zur DNA-Analyse und Plasmidkonstruktion

#### 3.2.1. Reinigung und Konzentrierung von DNA

#### 3.2.1.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Proteine wurden aus DNA-haltiger, wässriger Lösung durch Extraktion mit Phenol-Chloroform entfernt. Die DNA-haltige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isomylalkohol (25:24:1, Sigma, Steinheim) versetzt, 30 sec durch Vortexen gemischt und die Phasen durch Zentrifugation von 5 min in einer Tischzentrifuge (C5415, Eppendorf) bei 14000 upm getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde entnommen, mit Ethanol oder Isopropanol versetzt und die DNA gefällt (3.2.1.2. und 3.2.1.3.).

#### 3.2.1.2. Ethanolfällung

Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von Ethanol gefällt. Für die Ethanolfällung wurde die DNA-haltige wässrige Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 2,5 Volumina absolutem Ethanol versetzt. Nach Inkubation für 10 min auf Eis oder bei –20 °C wurde die

DNA für 20 min bei 4 °C und 14000 upm in einer Tischzentrifuge (Typ 5415, Eppendorf) pelletiert. Das Sediment wurde mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in dem gewünschten Puffer oder  $H_2O$  bidest. aufgenommen.

#### 3.2.1.3. Isopropanolfällung

Durch die Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol und 0,1-fachem Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 wurde die Plasmid-DNA für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Die Pelletierung erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation. Anschließend konnte das Präzipitat mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 min abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in dem jeweils angegebenen Puffer oder H<sub>2</sub>O bidest. gelöst.

#### 3.2.2. DNA-Aufreinigung mittels "QIAquick Gel Extraction Kit"

Geringere Mengen von DNA wurden mit Hilfe eines modifizierten Protokolls des "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Dazu wurden 50  $\mu$ l DNA-Lösung mit 500  $\mu$ l PB-Puffer durchmischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Nach der Zentrifugation von 1 min bei 14000 upm in einer Tischzentrifuge (C5415, Eppendorf) wurde die Säule mit 750  $\mu$ l PE-Puffer gewaschen. Nacheinander wurde 2 x 1 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jedesmal verworfen. Zur Elution der DNA wurden 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest. auf die Säule gegeben, 10 min inkubiert und 1 min zentrifugiert.

#### 3.2.3. Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Durch die Verwendung von Restriktionsendonukleasen (2.5.) können DNA-Moleküle in definierte Fragmente zerlegt werden, die dann zur Analyse und Konstruktion neuer DNA-Moleküle eingesetzt werden können.

Die spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, für 60 min bei 37 °C. Alle Restriktionsspaltungen wurden unter Reaktionsbedingungen (Enzymaktivität/DNA-Menge, Salzkonzentration des Reaktionsansatzes und Reaktionstemperatur) durchgeführt, die vom Hersteller empfohlen wurden. Waren lange Reaktionszeiten oder hohe Reaktionstemperaturen erforderlich, wurde der Ansatz mit Bayol F überschichtet. Jeder Restriktionsansatz wurde anschließend zur Überprüfung gelelektrophoretisch im Agarosegel (3.2.6.) aufgetrennt.

### 3.2.4. Polymerase-Ketten-Rektion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (SAIKI et al., 1985) erfolgt *in vitro* die Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnittes mit Hilfe von zwei flankierenden hybridisierenden Oligonukleotiden und einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, CHIEN et al., 1976). Die beiden Oligonukleotide (Primer I und II) besitzen eine unterschiedliche Sequenz, die bei dem einen zum Minus-Strang und bei dem anderen zum Plus-Strang der Ziel-DNA (Template) komplementär ist. Somit hybridisieren beide Primer mit unterschiedlichen Strängen. Die 3'-Enden der Primer weisen hierbei aufeinander zu und flankieren damit den DNA-Bereich, der *in vitro* vermehrt werden soll. Zur Amplifikation wird das Template zunächst durch Hitze denaturiert, damit bei anschließender Abkühlung die Primer mit der einzelsträngigen Template-DNA hybridisieren (Annealing) können. Die DNA-Synthese (Elongation) erfolgt danach in Gegenwart der vier dNTPs und der Taq-Polymerase bei einer optimalen Reaktionstemperatur. Dieser Zyklus Denaturierung, Annealing und Elongation wird mehrere Male hintereinander wiederholt, wobei es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA kommt.

Die PCR wurde durch das Gerät TC9600 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) in Plastikreaktionsgefäßen (Thinwalled-Reaction Tubes, Perkin Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Die allgemeinen Reaktionsbedingungen (modifiziert nach SAIKI et al., 1985) wurden bezüglich der Komponenten wie folgt gewählt:

| Template-DNA (ca. 2 ng)                      | 1 µl     |
|--|----------|
| Primer I (200 pmol)                          | 1 µl     |
| Primer II (200 pmol)                         | 1 µl     |
| dNTP-Lösung (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 5 µI     |
| Taq-Polymerase-Puffer (10x)                  | 5 μΙ     |
| H <sub>2</sub> O bidest.                     | ad 50 µl |
| Taq-Polymerase (5 U/μΙ)                      | 0,5 μΙ   |

Das zyklische Temperaturprogramm wurde entsprechend der Primerkombination variiert. Die Annealingtemperatur (Tm) ist abhängig von der Länge und dem prozentualen GC-Gehalt der Primer und wurde 2 °C unter dem errechneten Tm-Wert gewählt. Bei verschiedenen Tm-Werten wurde vom niedrigeren ausgegangen.

Der Tm-Wert wurde wie folgt berechnet (CHESTER & MARSHAK, 1993):

Tm = 69,3 + %GC-Gehalt x 0,41 – 650/ Länge des Primers

Das Zeitintervall für die Elongation (tx) richtete sich nach der zu erzeugenden Fragmentlänge. Dabei wurde für die Erzeugung eines 1 kb Polynukleotidstrangs 1 min angesetzt.

Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Reaktion im Thermo-Zykler nach folgendem Programm: Zu Beginn wurde 5 min bei 95 °C denaturiert. Daran schlossen sich zur Erzeugung und Amplifikation des Fragments 30 Zyklen mit folgendem Programm an:

1 min 95 °C 30 sec Tm tx 72 °C

Zum Abschluss wurde nochmals eine Elongation von 10 min bei 72 °C zur Verlängerung von Abbruchfragmenten angefügt.

Um das Produkt von Primern, Template-DNA und Taq-Polymerase zu trennen, wurde es nach der Auftrennung aus dem Agarosegel (3.2.7.) isoliert.

## 3.2.5. In vitro-Mutagenese mittels überlappender PCR

Zur *in vitro*-Mutagenese konnte die überlappende PCR-Technik mit komplementären Oligonukleotiden, die die Mutation sowohl in dem sense-Strang als auch in dem antisense-Strang enthielten, verwendet werden. Dafür wurden zwei PCR-Runden durchgeführt.

In der ersten Runde wurden die die Mutationen enthaltenden komplementären Oligonukleotide mit jeweils außen flankierenden Oligonukleotiden getrennt eingesetzt, so dass zwei, sich partiell überlappende separate PCR-Fragmente gemäß den Angaben für die klassische PCR (3.2.4.) amplifiziert werden konnten. Die Primer sollten so gewählt werden, dass die Mutation möglichst in der Mitte des überlappenden Bereichs liegt. Die beiden PCR-Fragmente wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, isoliert und aufgereinigt (3.2.7.).

Die so gewonnenen Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 dann in eine weitere PCR-Reaktion mit den beiden äußeren Primern eingesetzt, wobei es durch die Renaturierung der DNA-Stränge zur Ausbildung eines DNA-Hybrids aufgrund der partiellen Überlappung kommt. Dieses DNA-Hybrid wurde wiederum durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, isoliert und aufgereinigt. Das aufgereinigte DNA-Hybrid wurde anschließend mit Restriktionsenzymen verdaut (3.2.3.) und in einen Vektor eingesetzt (3.2.8.).

#### 3.2.6. Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte je nach erwarteter Fragmentlänge in 0,7 % - 2 %-igen (w/v) Agarosegelen in Gelelktrophoresekammern (Eigenbau) mit 1 x TAE (2.13.) als Laufpuffer. Dazu wurde die Agarose (2.15.) in TAE suspendiert und aufgekocht. Die Lösung wurde auf 60 °C abgekühlt und ca. 50 ml auf eine Glasplatte gegossen. Kurz vor dem Gießen wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) der Lösung zugegeben.

Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6 x Probenpuffer (2.13.) gemischt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 100-120 V für 30-90 min je nach Fragmentgröße durchgeführt. Die Gele wurden auf einem UV-Schirm (2.14.) durchleuchtet und mit einer Polaroidkamera (2.14.) dokumentiert.

#### 3.2.7. Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Extraktion

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde genutzt, um DNA mit spezifischer Länge im präparativen Ansatz zu isolieren. Nach Anfärbung und möglichst kurzer Beleuchtung mit UV-Licht wurde das Gelstück, das das gewünschte DNA-Fragment enthielt, exakt mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte dann mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" von der Firma QIAGEN (Hilden). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde je nach weiterem Verwendungszweck in 30 μl TE-Puffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 oder H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Zur Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der eluierten DNA wurde eine analytische Agarosegelelektrophorese durchgeführt (3.2.6.).

#### 3.2.8. Ligation mit der T4 DNA-Ligase

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von überstehenden und stumpfen DNA-Enden unter ATP-Verbrauch.

Die Ligation von Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem durchgeführt (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Das Verhältnis von Vektor-DNA zu Fragment-DNA betrug in der Regel 1:3. Zur DNA-Lösung von 8 µl Volumen wurden 1 µl T4 DNA-Ligase (1 Unit) und 1 µl 10 x Ligasepuffer gegeben. Die Ligation fand über Nacht bei 16 °C oder für 2 h bei 25 °C statt.

# 3.2.9. Präparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen (nach BIRNBOIM & DOLY, 1979; modifiziert)

Mit dieser Methode können Mikrogramm-Mengen von Plasmiden aus *E. coli*-Kulturen innerhalb kurzer Zeit isoliert werden.

Zu diesem Zweck wurden mit einer sterilen Impföse von einzelnen Kolonien Kulturen in 2 ml TB-Amp-Medium (2.11.) angelegt, die über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert wurden. Von dieser Kultur wurde dann 1 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 14000 upm sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde dann durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Hiefür wurde das Bakterienpellet in 100 μl Lösung I (2.13.) aufgenommen und mit 200 μl Lösung II (2.13.) lysiert. Danach wurde es mit 150 μl Lösung III (2.13.) neutralisiert. Das Lysat wurde nun für 10 min bei 4 °C, 14000 upm zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5402). Der Überstand wurde daraufhin mit Phenol-Chloroform extrahiert (3.2.1.1.) und die Nukleinsäure mit Ethanol präzipitiert (3.2.1.2.). Das DNA-Sediment wurde abschließend in 100 μl TE/RNase A-Puffer (2.13.) resuspendiert.

Nach Aufbereitung der Plasmid-DNA erfolgten Restriktionsanalysen durch Behandlung von je 3 µl der DNA-Lösungen mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen (3.2.3.).

#### 3.2.10. Plasmidpräparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen mit hoher Reinheit

Zur Plasmidpräparation bis zu einer Gesamtmenge von 20 µg wurde das "Plasmid Mini Kit" der Firma Qiagen (Hilden) benutzt. Die DNA-Gewinnung und Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das DNA-Sediment wurde in 50 µl 1 x TE (2.13.) gelöst. Die auf diese Weise präparierte DNA konnte direkt in eine automatische Seguenzierreaktion eingesetzt werden (3.2.13.2.).

# 3.2.11. Plasmidpräparation im präparativen Maßstab (nach BIRNBOIM & DOLY, 1979; modifiziert)

Um größere Mengen relativ reiner Plasmid-DNA zu erhalten, wurde 1 ml einer Vorkultur in 30 ml TB-Amp-Medium (2.11.) überimpft und für 12 h bei 37 °C und 110 upm (Schüttler, Braun, Melsungen) inkubiert.

Die Hauptkultur wurde 15 min bei 5000 upm (Hettich 30RF, Tuttlingen) und 4 °C abzentrifugiert, anschließend das Sediment in 5 ml Lösung I (2.13.) gelöst und danach durch die Zugabe von 10 ml frisch angesetzter Lösung II (2.13.) alkalisch lysiert. Während der Lyse wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und von Zeit zu Zeit vorsichtig durchmischt. Durch Zugabe von 7,5 ml der Lösung III (2.13.) zum klaren Lysat und anschließendem Mischen kommt es zur Renaturierung von episomaler, nicht aber

von genomischer DNA. Nach der Zentrifugation des Präparationsansatzes bei 3000 upm und Raumtemperatur für 5 min wurden dem überführten Überstand 13,5 ml Isopropanol zugemischt und wiederum abzentrifugiert (10 min bei Raumtemperatur und 5000 upm). Das Pellet wurde in 3 ml 1 x TE-Puffer gelöst, mit 3 ml der Lösung IV (2.13.) vermischt und anschließend bei 5000 upm und Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde verworfen, der Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt, 10 min bei Raumtemperatur und 5000 upm zentrifugiert und das DNA-Sediment 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet in 0,5 ml TE/RNase A (2.13.) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens der Lösung V (2.13.) erfolgte eine Fällung der DNA. Anschließend wurde die DNA wurde für 5 min bei 14000 upm pelletiert und in 400 µl TE-Puffer gelöst. Danach wurde eine dreimalige Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.1.1.) durchgeführt und die Aufreinigung der DNA durch eine Ethanol-Präzipitation (3.2.1.2.) abgeschlossen. Das DNA-Sediment wurde in 0,5 ml TE-Puffer (2.13.) aufgenommen.

#### 3.2.12. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (DU70 Spektralphotometer). Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Extinktion von 1 in einer 1 cm-Küvette einer DNA-Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Durch Vergleich der Extinktionen bei 260 und 280 nm konnte die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Es gilt dabei, dass eine proteinfreie DNA-Lösung ein Verhältnis der Extinktionen 260 nm zu 280 nm von 2 hat. Bei Verunreinigungen der DNA-Probe durch Proteine verkleinert sich dieser Wert.

#### 3.2.13. DNA-Sequenzierung

## 3.2.13.1. Sequenzierung mit $\alpha^{35}$ S-dATP

Die Sequenzierung erfolgte nach der Methode von SANGER et al. (1977). Dabei wird ein an einen DNA-Einzelstrang hybridisiertes Oligonukleotid durch eine DNA-Polymerase verlängert, nachdem es zuvor mit  $\alpha^{35}$ S-dATP markiert worden ist. In 4 parallelen Ansätzen befindet sich je ein Didesoxynukleotid. Dadurch bricht die Polymerase-Reaktion immer dann ab, wenn ein solches Nukleotid eingebaut wird.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Sequenzierungskit, Version 2.0 der Firma USB (Cleveland, USA). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Doppelstrang-DNA muss vor der Reaktion zunächst denaturiert werden. Dazu wurden  $2~\mu g$  DNA mit  $12~\mu l$   $H_2O$  und  $2~\mu l$  2~M NaOH/2 mM EDTA versetzt, so dass sich ein Volumen von  $22~\mu l$  ergab und 5~min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde

der Ansatz auf Eis gestellt und zur Präzipitation der DNA mit 8  $\mu$ I 0,4 M Ammoniumacetat und 100  $\mu$ I –20 °C kaltem Ethanol versetzt. Dann erfolgte eine Inkubation bei –20 °C für 15 min. Nach einer Zentrifugation von 15 min, Waschen des Pellets mit –20 °C kaltem 70 %igem Ethanol und wiederholter Zentrifugation von 15 min wurde das Pellet nach Verwerfen des Überstandes getrocknet, anschließend die DNA in 7  $\mu$ I H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert, 2  $\mu$ I 5 x Sequenase-Puffer und 1  $\mu$ I Primer (3 pmoI) zupipettiert. Der Ansatz wurde 2 min bei 65 °C inkubiert und langsam auf Raumtemperatur heruntergekühlt, wobei sich der Primer an einer spezifischen Stelle an die Template-DNA anlagerte (Annealing-Reaktion). Für die Markierungsreaktion erfolgte die Zugabe von 5,5  $\mu$ I Markierungsmix:

```
1 \mul 0,1 M DTT 0,5 \mul labeling mix 0,5 \mul \alpha^{35}S-dATP (600 Ci/mmol, 5 \muCi) 0,25 \mul Sequenase ad 5,5 \mul H<sub>2</sub>O bidest.
```

Danach wurde der Ansatz für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Kettenabbruch-Reaktion wurden jeweils 2,5 µl ddNTPs in die Näpfe einer Mikrotiterplatte pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von 3,5 µl Markierungsmix und eine Inkubation bei 37 °C für 10 min. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 4 µl einer Stop-Mix-Lösung (95 % (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenol-Blau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF) zupipettiert und anschließend für 10 min bei 80 °C erhitzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem denaturierenden 6 %igen Polyacrylamidgel. 24 g Harnstoff wurden in 7,9 ml Acrylamid-Stammlösung [40 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid 38:2], 5 ml 10 x TBE (2.13.) und 18 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 250 μl 10 % (w/v) APS und 50 µl TEMED gestartet und die Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer eingespannt. Anschließend wurden 2-4 µl der Proben in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 3 h bei 40 W. Danach wurde das Gel auf Whatmann-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen und unter Vakuum und Hitze getrocknet. Die Detektion der radioaktiv markierten DNA-Fragmente erfolgte durch Autoradiographie (3.17.).

#### 3.2.13.2. Automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs

Für die automatische Sequenzierung wurde ebenfalls das Prinzip der Didesoxymethode nach SANGER et al. (1977) angewandt.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das "Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die im Reaktionsgemisch vorliegenden Didesoxynukleotide sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (dyeddNTP), so dass alle entstehenden Abbruchfragmente am letzten Nukleotid eine entsprechende Farbmarkierung enthalten. Die zur Sequenzierung eingesetzte Plasmid-DNA sollte eine möglichst hohe Reinheit aufweisen. Diese wurde durch Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (3.2.11.), Präparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen mit hoher Reinheit (3.2.9.) oder Präparation von kleineren DNA-Mengen mit anschließender modifizierter Aufreinigung mittels "QIAquick Gel Extraction Kit" (3.2.2.) gewährleistet. Dabei war es wichtig, dass die DNA in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst war.

Die Sequenzierreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

DNA-Template (Plasmid-DNA) 500 ng
Oligonukleotid 5 pmol
Terminationsmix 6 μl

(enthält Puffer, dNTPS, dyeddNTPs

sowie Polymerase)

 $H_2O$  bidest. ad 17  $\mu$ l

Die Sequenzreaktion wurde in einem Thermocycler (TC9600, Perkin Elmer, Norwalk, USA) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 20 sec 94 °C, 20 sec 50-60 °C (abhängig von der Annealingtemperatur des Oligonukleotids), 4 min 60 °C, 25 Zyklen.

An die Sequenzierreaktion schloss sich eine Ethanolfällung mit 50 µl Ethanol und 2 µl 3 M Natrium-Acetat, pH 4,7 an. Die Proben wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min mit 14000 upm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das kaum sichtbare Sediment wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Resuspendiert wurden die so konzentrierten DNA-Abbruchfragmente in 3 µl Formamid/EDTA (5:1). Vor der Sequenzgel-Elektrophorese wurden die Proben für 2 min bei 90 °C denaturiert und bis zu Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Die elektrophoretische Trennung und Analyse der entstandenen fluoreszenzmarkierten Fragmente erfolgte im ABI 373 DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Nukleotidsequenz wird in diesem Gerät durch die Analyse der Emmisionswellenlängen der in die Abbruchfragmente eingebauten fluoreszenzmarkierten ddNTPs bestimmt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem denaturierenden 6 %igen Polyacrylamidgel. 30 g Harnstoff wurden in 9 ml Acrylamid-Stammlösung [40 % (w/v) Acrylamid:Bisacryl-

amid 38:2], 6 ml 10 x TBE (2.13.) und 23,5 ml  $H_2O$  gelöst und sterilfiltriert. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 180  $\mu$ l 10 % (w/v) APS und 24  $\mu$ l TEMED gestartet und die Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde es in die Sequenzierapparatur eingespannt und mit den denaturierten Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 10 h bei 40 mA in 1 x TBE.

#### 3.3. Zellkulturtechniken

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank (HERAsafe, Heraeus) durchgeführt. Zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen wurden beschichtete Zellkulturschalen (Costar Corning, Bodenheim) und Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nürnbrecht) eingesetzt.

#### 3.3.1. Kultivierung, Transfektion und Infektion von Säugerzellen

### 3.3.1.1. Subkultivierung von Säugerzellen

Zum Umsetzen, Transfizieren und Waschen der HuH7-, COS7- und HepG2-Zellen (2.2.) wurden stets auf 37 °C erwärmte Lösungen verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub>.

Um die Zellen zu erhalten, wurden sie alle 2-3 Tage umgesetzt. Sie wurden dazu zweimal mit PBS (2.13.) gewaschen, mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin) abgelöst und im entsprechenden Kulturmedium um den Faktor 3 bis 6 verdünnt. Dabei wurden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt, mit frischem Medium versehen und bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C unter 6 % CO<sub>2</sub>-Luftgemisch gehalten.

#### 3.3.1.2. Transfektion von HuH7- und HepG2-Zellen mittels Kalziumphosphat

Zwölf Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in DMEM suppl.-Medium subkultiviert (3.3.1.1.). Die Zelldichte sollte am Tag der Transfektion ca. 60 % erreicht haben. Die folgenden Angaben beziehen sich auf Gewebekulturschalen mit 10 cm Durchmesser. Erfolgte die Transfektion unter Verwendung anderer Kulturschalen, so mussten die eingesetzten Volumina entsprechend verändert werden.

Durch die Kalziumphosphat-Methode wird der transiente und stabile Gentransfer in eine eukaryotische Zelle ermöglicht. Die durch diese Methode hergestellten DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitate können von den Zellen in einem phagocytotischen Prozess aufgenommen werden.

Für die Herstellung des Präzipitats wurden 10  $\mu$ g Plasmid-DNA mit 500  $\mu$ l 250 mM CaCl<sub>2</sub> vermischt, tropfenweise zu 500  $\mu$ l 2 x HEPES-Puffer (2.13.) gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Gemisch wurde auf die mit 10 ml frischem Medium versehenen Zellen getropft. Nach 6-8 h Inkubation im Brutschrank folgten zwei Waschschritte mit PBS (2.13.) und die Zugabe von frischem DMEM suppl.-Medium (2.12.). Anschließend wurden die Zellen für mindestens zwei weitere Tage im Brutschrank inkubiert.

# 3.3.1.3. Infektion von HepG2-Zellen mit rekombinanten Baculoviren (DELANEY & ISOM, 1998)

Zwölf Stunden vor der Infektion wurden die HepG2-Zellen in HepG2 suppl.-Medium subkultiviert (3.3.1.1.). Die Zelldichte sollte am Tag der Infektion ca. 60 % erreicht haben. Die Zellen wurde nach Entfernen des Kulturmediums mit einer definierten Infektionsmultiplizität (MOI, engl.: *multiplicity of infection*) durch Inkubation von 0,5 ml (1 ml) Baculovirusüberstand (in PBS verdünnt) auf einer 60 mm (100 mm)-Schale für 1 h im Brutschrank infiziert. Danach wurden die Zellen zweimal mit jeweils 6 ml (12 ml) PBS (2.13.) gewaschen, 5 ml (10 ml) frisches Kulturmedium zugegeben und für mindestens 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Bei der Superinfektion der Zellen wurde eine zweite Infektion der Zellen am 4. Tag nach der Erstinfektion wie oben beschrieben durchgeführt.

## 3.3.1.4. Bestimmung von HBsAg und HBeAg

Die Bestimmung des HBsAg- und HBeAg-Konzentration im Überstand transfizierter und infizierter eukaryotischer Zellen wurde freundlicherweise in der Diagnostikabteilung der Abteilung Virologie durchgeführt (HBsAg- und HBeAg-Test der Firma Sorin Biomedica, Saluggia, Italien). Für die ELISA-Tests wurden 100 µl Zellüberstand in einer Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass das Messergebnis im linearen Messbereich lag. Transfektionen konnten als erfolgreich gewertet werden, wenn mit entsprechenden Plasmiden transfizierte Zellen (3.3.1.2.) eine HBsAg-Konzentration von ca. 20 ng/ml im Überstand erreicht hatten.

#### 3.3.2. Vermehrung von Insektenzellen

Zum Subkultivieren, Transfizieren und Infizieren der Insektenzellinien SF9 und SF21 (2.2.) wurde auf 27 °C vorgewärmtes Medium verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 27 °C und normaler Raumluft.

#### 3.3.2.1. Subkultivierung von Insektenzellen als Suspensionskultur

Die Insektenzellinien SF9 und SF21 wurden bei 27 °C in Sf-900 II SFM suppl.-Medium (2.12.) als Suspensionskulturen im Rotationsschüttler unter ständigem Schütteln bei 120 upm kultiviert und vermehrt. Hierzu wurden 32 ml Medium in einer 500 ml Laborflasche (Schütt Labtech., Göttingen) mit 5 x  $10^5$  Zellen/ml inokuliert und für 72 h bis zu einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte durch 1:8-Verdünnung in einer frischen 500 ml Laborflasche mit Sf-900 II SFM suppl.-Medium.

#### 3.3.2.2. Subkultivierung von Insektenzellen als adhärente Kultur

Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 27 °C und normaler Raumluft. Zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen wurden beschichtete Zellkulturflachen (75 cm², Sarstedt, Nürnbrecht) eingesetzt. Die Zellen wurden in einem Volumen von 10-12 ml Medium inkubiert.

Um die Zellen zu erhalten, wurden sie alle 4-5 Tage umgesetzt. Sie wurden dazu in TC100 suppl.-Medium (2.12.) um den Faktor 3 bis 4 verdünnt. Dabei wurden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt, mit frischem Medium versehen und bis zur weiteren Verwendung bei 27 °C und Raumluft gehalten.

#### 3.3.2.3. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Zeiss, Jena). Die Gitternetzkammer wurde durch Auftropfen der Zellsuspension gefüllt und mit einem fest aufliegenden Deckglas bedeckt. Die Zellen innerhalb eines Großquadrats wurden ausgezählt und mit 10<sup>4</sup> multipliziert, um die Zellzahl/ml Kultur zu bestimmen. Die Vitalität der Zellen wurde durch Anfärben mit 0,25 % (v/v) Trypan-Blau (2.13.) bestimmt. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf.

#### 3.3.3. Arbeiten mit Baculoviren

#### 3.3.3.1. Herstellung rekombinanter Baculoviren

Rekombinante Baculoviren des Typs pBlueBac4.5 entstanden *in vivo* durch komplettierende homologe Rekombination mit einem kotransfizierten Transfervektor des Typs pBlueBac4.5 (2.4.), über die die heterologen Genfragmente in das Virusgenom eingeführt wurden.

Zwölf Stunden vor der Infektion wurden SF9-Zellen in TC100 suppl.-Medium subkultiviert (3.3.2.2.). Die Zelldichte sollte am Tag der Transfektion ca. 80 % erreicht haben. Die

Transfektion erfolgte mit dem "BacNBlue-DNA"-Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Dazu wurde folgender Transfektionsmix zusammenpipettiert:

rekombinantes Transferplasmid des Typs
pBlueBac4.5 (1 µg/ml) 4 µl
Grace-Medium 1 ml
Insectin Plus Liposomen 20 µl

Der Ansatz wurde für 20 sec kräftig gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit 2 ml serumfreiem Grace-Medium (2.12.) gewaschen. Danach wurde der Transfektionsmix tropfenweise auf die Zellen gegeben, die anschließend für 4 h bei Raumtemperatur langsam schwenkend inkubiert wurden. Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml TC100 suppl.-Medium bis zur vollständigen Lyse in der Regel 5-7 Tage bei 27 °C inkubiert (KITTS & POSSEE, 1993).

## 3.3.3.2. Herstellung eines rekombinanten Baculovirusstocks

Die Vermehrung der Baculoviren erfolgte durch Infektion von SF21-Zellen. Viren einzelner Virus-Plaques wurden durch Infektion von 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 35 mm Kulturschalen vermehrt. Ansonsten erfolgte die Virusvermehrung durch Infektion von 1 x 10<sup>7</sup> Zellen in 100 mm Kulturschalen mit einer MOI von 5. Hierfür wurden die Zellen zu ca. 60 %iger Konfluenz ausgesät. Nachdem sich die Zellen am Boden angeheftet hatten, wurde das Medium durch die entsprechende Menge TC100 suppl.-Medium (2.12.) ersetzt (2 ml für 35 mm und 10 ml für 100 mm Kulturschalen). Nach Zugabe der jeweiligen Virusmenge wurden die Zellen bis zur vollständigen Zellyse bei 27 °C inkubiert.

Nach vollständiger Lyse der Zellen wurde das virushaltige Medium in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 upm (Zentrifuge Universal 30RF) und Raumtemperatur geklärt. Der virushaltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei Dunkelheit und 4 °C aufbewahrt. Zur Langzeitlagerung wurden die Viren bei –70 °C eingefroren.

#### 3.3.3.3. Konzentration von Baculoviren (O'REILLY et al., 1994)

Zur Infektion der HepG2-Zellen mit rekombinant erzeugten Baculoviren waren hochtitrige Baculovirusstocks erforderlich. Zu diesem Zweck wurden die erzeugten Baculovirusstocks (3.3.3.2.) durch Pelletierung über einen Saccharosegradienten konzentriert.

Dazu wurden je 33 ml Virusstock in einem SW28-Zentrifugenröhrchen (S/L Tube P.A. 39 ml, Sorvall Instruments, USA) mit 3 ml 25 % (w/w) Saccharose (in 10 mM NaCl/5 mM EDTA) vorsichtig unterschichtet. Nun erfolgte eine Ultrazentrifugation (L8-M Ultrazentrifuge, Beckman, München) für 2,5 h bei 4 °C und 24000 upm im SW28-Rotor. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Viruspellet in 1 ml PBS (2.13.) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgenommen. Zum Schluss wurde das resuspendierte Viruspellet duch einen Filter (Sarstedt, Nürnbrecht) mit der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert.

#### 3.3.3.4. Titration rekombinanter Baculoviren

Zur Isolierung einzelner rekombinanter Baculoviren und zur Bestimmung des Virustiters wurde ein Plaque-assay durchgeführt. Mit dem Virus infizierte Zellen setzen den Farbstoff X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-Galaktosid) durch die exprimierte β-Galaktosidase zu einem blauen, unlöslichen Farbstoff um. Diese blauen Plaques können lichtmikroskopisch ausgewertet und der Virustiter berechnet werden. Vom Virusstock wurden Verdünnungen von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-8</sup> in TC100 suppl.-Medium hergestellt. 3 x 10<sup>6</sup> SF9-Zellen wurden in 3 ml TC100 suppl.-Medium aufgenommen, auf einer Kulturschale mit einem Durchmesser von 60 mm ausgesät und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2,3 ml Medium pro Schale abgesaugt und jeweils 0,3 ml der Verdünnungen zugegeben. Nach 1 h Schwenken bei Raumtemperatur wurde der virushaltige Überstand von den Schalen abgesaugt und die Zellen mit einem Top-Agar aus Baculovirus-Agarose (Invitrogen, Groningen, Niederlande), TC100 suppl.-Medium und X-Gal überschichtet. Der Top-Agar wurde hergestellt, indem 1,6 ml einer auf 46 °C temperierten Mischung aus gleichen Teilen 2,5 % (w/v) Baculovirus-Agarose und TC100 suppl.-Medium mit 1,6 ml TC100 suppl.-Medium vereinigt wurden, welcher X-Gal in einer Konzentration von 3 µl/ml (50 mg/ml in Dimethylformamid) beigesetzt worden war. Nach dem Erkalten des Top-Agars wurden die Schalen für 5 Tage in einer feuchten Kammer bei 27 °C inkubiert.

Zur Isolierung einzelner rekombinanter Baculoviren wurden einzelne *Plaques* mit sterilen Pasteur-Pipetten ausgestanzt und die Viren durch Infektion von SF21-Zellen vermehrt (3.3.3.2.).

Zur Ermittlung des Virustiters wurden die blauen *Plaques* ausgezählt. Die plaquebildenden Einheiten (pfu, engl.: *plaque forming units*) pro ml Stammlösung wurden nach folgender Formel berechnet:

Virustiter [pfu/ml]= Anzahl der Plaques / Virusverdünnung x 0,3

Das Virusvolumen, das für die Infektion einer definierten Zellzahl mit einer bestimmten Infektionsmultiplizität (MOI) benötigt wird, ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

Virusvolumen [ml] = MOI [pfu/Zelle] x Zellzahl / Virustiter [pfu/ml]

#### 3.4. Arbeiten mit Proteinen

#### 3.4.1. Präparation von *E. coli-*Zellextrakten

Jeweils 2000 ml einer IPTG-induzierten *E.coli*-Kultur (3.1.5.) wurden durch 30minütige Zentrifugation bei 3500 upm und 4 °C (RC26 Plus Zentrifuge, SLA3000-Rotor, Sorvall) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml PBS (2.13.) gewaschen und für weitere 30 min bei 4 °C und 3500 upm (Universal 30RF, Hettich) pelletiert. Das gewaschene Zellsediment wurde nun in 20 ml Lysispuffer (2.13.) resuspendiert, 3 x bei –20 °C eingefroren und wieder aufgetaut und durch Ultraschallbehandlung (3 x 10 Impulse, 30 % *outputlevel*, Branson-Sonifier-250) lysiert. Durch 30minütige Zentrifugation bei 10000 upm und 4 °C (RC26 Plus Zentrifuge, SA300-Rotor, Sorvall) wurde der lösliche Zellüberstand gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

# 3.4.2. Aufreinigung von rekombinant in *E. coli*-exprimierten Core-Partikeln (HATTON et al., 1992; modifiziert)

In einem ersten Schritt wurde der lösliche Zellüberstand (3.4.1.) einer Ammmoniumsulfat-Fällung unterworfen. Die Fällung diente zur Abtrennung von Fremdprotein. Dabei wurde dem Zellüberstand Ammoniumsulfat langsam unter Rühren zugesetzt, bis eine Sättigung von 40 % (w/v) erreicht wurde. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurde das ausgefällte Protein durch Zentrifugation für 15 min bei 12000 upm und 4 °C (RC26 Plus Zentrifuge, SA300-Rotor, Sorvall) pelletiert. Das Protein wurde in 5 ml TNE-Puffer (2.13.) aufgenommen.

Die weitere Aufreinigung erfolgte durch ratenzonale Saccharose-Gradientenzentrifugation. Die Gradientenzentrifugation ist eine wichtige Methode, um partikuläre Strukturen aus komplexen Gemischen anzureichern. Durch Übereinanderschichten verschieden konzentrierter Saccharoselösungen entsteht ein Gradient, in dem in einem Zentrifugalfeld Partikel aufgetrennt werden können.

In SW28-Zentrifugenröhrchen (S/L Tube P.A. 39 ml, Sorvall Instruments, USA) wurden je 5 ml von 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % (w/w) Saccharose in TNE-Puffer vorsichtig übereinandergeschichtet. Zum Schluss wurden die nach der Ammoniumsulfat-Fällung erhaltenen 5 ml Lysat aufpipettiert. Die Röhrchen wurden in einem Schwingbecher für den

entsprechenden Schwingrotor (SW28, Beckmann, München) gestellt und nach sorgfältigem Austarieren fest verschraubt. Nun erfolgte eine Ultrazentrifugation (L8-M Ultrazentrifuge, Beckmann, München) für 17 h bei 10 °C und 24000 upm. Anschließend wurde die Lösung durch Abpipettieren von jeweils 1 ml-Fraktionen vom oberen Miniskus Saccharose-Konzentration fraktioniert. Die der einzelnen Fraktionen refraktometrisch (Refraktometer, Zeiss, Jena) bestimmt und die Fraktionen wurden im HBcAg-ELISA (3.4.5.) auf Vorhandensein von Core-Antigen untersucht. Die Core-Partikel enthaltenden Fraktionen befanden sich in der Regel bei einer Saccharose-Konzentration von 43 % bis 55 % (w/w). Sie wurden vereinigt und zur Entfernung der Saccharose gegen 5 I PBS dialysiert (18 h, 4 °C). Für die weitere Aufreinigung war es erforderlich, die proteinhaltige Lösung einzuengen. Das erfolgte durch Zentrifugation der dialysierten Fraktionen für 100 min bei 5000 upm und 4 °C (Universal 30 RF, Hettich) durch Macrosep Centrifugal Concentrator-Röhrchen (Ausschlussgröße 100 kD; Pall, New York, USA). Daran schloss sich eine zweite ratenzonale Saccharose-Gradientenzentrifugation an. In

Daran schloss sich eine zweite ratenzonale Saccharose-Gradientenzentrifugation an. In SW40-Zentrifugenröhrchen (S/L Tube P.A. 12,5 ml, Sorvall Instruments, USA) wurden je 1,75 ml von 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % (w/w) Saccharose in TNE-Puffer vorsichtig übereinandergeschichtet. Zum Schluss wurden die nach der Einengung erhaltenen 2 ml proteinhaltige Lösung aufpipettiert. Es erfolgte eine Ultrazentrifugation (L8-M Ultrazentrifuge, Beckman, München) für 2,5 h bei 10 °C und 30000 upm. Anschließend wurde die Lösung durch Abpipettieren von jeweils 0,8 ml-Fraktionen vom oberen Miniskus fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden im HBcAg-ELISA (3.4.5.) und SDS-PAGE (3.4.6.) auf Vorhandensein von Core-Protein untersucht. Abschließend erfolgte eine Dialyse der vereinigten Core-Partikel-haltigen Fraktionen gegen 2 l PBS für 18 h bei 4 °C. Danach wurden die Core-Partikel in 1 ml Portionen bei -20 °C zur Langzeitaufbewahrung eingefroren.

#### 3.4.3. Lysatherstellung von Zellkulturen

Nach Abnahme des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und zur Herstellung der Zelllysate mit 1,5 ml Lysispuffer (2.13.) überschichtet. Nach 5-10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Zellrasen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Vor der Immunpräzipitation (3.4.4.) wurde das Zelllysat und der Kulturüberstand zur Abtrennung der Zelldebris für 10 min bei 14000 upm (Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

#### 3.4.4. Immunpräzipitation

Durch die Immunpräzipitation erfolgte eine rasche, einfache und effektive Isolierung von Antigen aus dem Zellkulturüberstand und den Zelllysaten (3.4.3.) von transfizierten und infizierten Zellen (3.3.1.2. und 3.3.1.3.) über den Einsatz spezifischer Antikörper, die an Protein A/Sepharose (Sigma, Steinheim) gebunden sind. Zunächst wurden zur Quellung 2,5 mg (Reaktionsansatz für das Zelllysat) bzw. 7,5 mg Protein A/Sepharose (Ansatz für den Zellkulturüberstand) mit 1 ml PBS versetzt und dreimal mit PBS gewaschen (gemischt, 30 sec bei 14000 upm zentrifugiert).

Zur Bindung der Antikörper (2.7.) an Protein A/Sepharose wurde dem Ansatz für das Zelllysat 1 µl Antikörper (1mg/ml) und dem Ansatz für den Zellkulturüberstand 3 µl Antikörper beigemischt und bei 4 °C für mindestens 8 h oder mindestens 3 h bei RT schwenkend inkubiert.

Zur Immunpräzipitation wurde dann der Zellüberstand oder das Zelllysat mit dem Protein A/Antikörper-Gemisch versetzt und für 8-12 h bei 4 °C oder mindestens 3 h bei RT geschwenkt. Sollte die Immunpräzipitation unter Anwesenheit eines Detergenz erfolgen, so wurde dem Ansatz 0,5 % (v/v) Nonidet P40 (Endkonzentration) hinzugefügt. Im Anschluss an die Immunpräzipitation erfolgten drei Waschschritte mit PBS. Dazu wurde der Ansatz mit 1 ml PBS gemischt, 30 sec bei 14000 upm zentrifugiert und der Überstand mit einer ausgezogenen Glaspipette von dem Sepharosesediment entfernt.

#### 3.4.5. HBc-ELISA

Der ELISA (engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein Test, welcher die Möglichkeit eines sehr empfindlichen Nachweises von Antigenen bietet. Ein weiterer Vorteil entsteht durch die schnelle Durchführbarkeit und der parallelen Untersuchung einer großen Anzahl von Proben. In dem verwendeten Sandwich-Assay reagieren Antikörper, die an eine Festphase gebunden sind, mit dem nachzuweisenden Antigen, welches über eine Indikatorreaktion mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper nachgewiesen werden kann.

Der erste Antikörper (Serum F1451, enthält anti-HBc/e; 2.7.) wurde in Coating-Puffer (2.13.) 1:1000 verdünnt und je 100  $\mu$ l der Verdünnung pro Napf in die Mikrotiterplatte "Maxisorp U96" (NUNC, Kampstrup, Dänemark) pipettiert. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurden die Näpfe 3 x mit 1 x PBS/0,05 % (v/v) Tween 20 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation mit 150  $\mu$ l 1 % (w/v) BSA/PBS pro Napf bei 37 °C für 1 h. Nach erneutem Waschen der Näpfe wurden 100  $\mu$ l des jeweiligen Antigens in 1 % (w/v)

BSA/PBS verdünnt in die Näpfe pipettiert. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass das Messergebnis im linearen Messbereich lag. Nach einem weiteren Waschschritt wurden 100  $\mu$ l eines Peroxidase-markierten anti-HBc (anti-HBc-POD-konjugiert) in 1 % (w/v) BSA/20 % FCS/PBS 1:500 verdünnt in die Näpfe gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Die Näpfe wurden dann gewaschen. Zur Anfärbung wurden 100  $\mu$ l Substratmix (2.13.) hinzugegeben, der zuvor mit 2  $\mu$ l 30 % (v/v)  $H_2O_2$  pro 10 ml versetzt worden war. Nach ca. 30 min wurde die Farbreaktion mit 100  $\mu$ l 2 M  $H_2SO_4$ /Napf gestoppt. Die Messung der Extinktion bei 492 nm erfolgte im Plattenphotometer (Immuno-Reader NJ2000; Intermed).

## 3.4.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung und Analyse von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer. Es wurden zwei verschiedene Elektrophoresesysteme eingesetzt. Zum einen wurde die Studier-Elektrophorese-Kammer (STUDIER, 1973) und zum anderen die *mighty-small-tall-*Elektrophorese-Kammer (SE 280T, Hoefer Sci. Instruments) verwendet. Für die "Studier"-Gele wurden jeweils zwei Glasplatten zusammengesetzt, zum Abdichten der Abstandshalter (*spacer*) wurde Vaseline verwendet. Die denaturierten Proteine wurden im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid (LAEMMLI, 1970) unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Hierzu wurden die Proteine in einem 5 %igen Sammelgel konzentriert und über ein 15 %iges Polyacrylamid-Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt.

Zunächst wurden die Kammern zu 70 % ihrer Höhe mit Trenngel gefüllt. Im Anschluss wurde die Geloberfläche mit 20 %igem (v/v) Methanol überschichtet, um die Ausbildung einer glatten Oberfläche zu gewährleisten. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war (ca. 30 min) wurde das Methanol abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die *mighty-small-tall-*Gele konnten nach vollständiger Polymerisation in feuchter Verpackung bis zu 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Acrylamid-Stammlösung bestand aus 39 % (w/v) Acrylamid/1 % (w/v) Bisacrylamid.

| 5 % Sammelgel      |  | 15 % Trenngel  |   |
|--------------------|--|--|---|
| SE 280T-<br>System | Studier-<br>System   | SE 280T-<br>System   | Studier-<br>System  |
| 3,75 ml<br>5,5 ml  | 1,6 ml<br>3 ml   | 15,7 ml<br>-   | 11,8 ml<br>-  |
| -                  | -  | 8,8 ml   | 7,5 ml  |
| 11 ml              | 7,4 ml   | 10,2 ml  | 10,5 ml   |
| 28 µl<br>105 µl    | 20 μl<br>80 μl   | 58 µl<br>233 µl  | 50 μl<br>200 μl   |
|                    | SE 280T-<br>System<br>3,75 ml<br>5,5 ml<br>-<br>11 ml<br>28 µl | SE 280T-<br>System System  3,75 ml 1,6 ml 5,5 ml 3 ml 11 ml 7,4 ml 28 μl 20 μl | SE 280T- Studier- SE 280T- System System System  3,75 ml 1,6 ml 15,7 ml 5,5 ml 3 ml 8,8 ml 11 ml 7,4 ml 10,2 ml 28 μl 20 μl 58 μl |

Vor Durchführung der Elektrophorese wurden die Platten der *mighty-small-tall-*Gele von Acrylamidrückständen gereinigt. Bei "Studier"-Gelen wurden der untere *spacer* und Reste des Vakuumfettes entfernt. Die Gele wurden in die entsprechende Elektrophoresekammer gespannt und der Laufpuffer (2.13.) in die Elektrodenkammer gefüllt.

Die aufzutrennende Proteinlösung wurde mit 0,25 Vol. 4 x Probenauftragspuffer (2.13.) versetzt, zur Denaturierung und Spaltung der Disulfidbrücken 5 min bei 95 °C gekocht und in die Taschen des Gels gefüllt (maximal 20 µl bei *mighty-small-tall-*Gelen, maximal 50 µl bei "Studier"-Gelen). Die Elektrophorese der *mighty-small-tall-*Gele wurde für ca. 10 min bei 15 mA, dann für ca. 2 h bei 20-25 mA pro Gel durchgeführt. Die Auftrennung im "Studier"-Gel erfolgte über Nacht bei 5 mA oder für 4 h bei 30 mA.

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine entweder auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) übertragen (3.4.8.), um im Immunblot (3.4.9.) spezifisch nachgewiesen zu werden, oder die Gele wurden mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt (3.4.7.). Desweiteren wurden die Gele unter Vakuum und Hitze getrocknet (Geltrockner, Biotec Fischer, Reiskirchen) und zur Autoradiographie radioaktiv markierter Proteine ein Röntgenfilm aufgelegt (3.17.). "Studier"-Gele, in denen metabolisch radioaktiv markierte Proteine aufgetrennt wurden, wurden zur Überprüfung der eingesetzten Antikörper Coomassie-gefärbt (3.4.7.) und zur Signalverstärkung 20 min in "Amplify" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) geschwenkt.

#### 3.4.7. Coomassiefärbung

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt werden. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für 30 min in Coomassie-Färbelösung (2.13.) inkubiert. Durch vollständiges Entfärben des Gels mit Coomassie-Entfärber (2.13.) für 45 min bei Raumtemperatur konnten die Proteine visualisiert werden. Anschließend konnte das Gel unter Vakuum und Hitze (Geltrockner, Biotec Fischer, Reiskirchen) getrocknet werden.

## 3.4.8. Western Blot (BURNETTE, 1981)

Im Western Blot wurden Proteine mittels einer Transblot-Zelle (TE mighty small Transphor, Hoefer Scientific Instruments) von einem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst 5 min in reinem Methanol inkubiert, anschließend mindestens 5 min in Blotpuffer (2.13.) äquilibriert. Auf einen mit Blotpuffer getränkten Filter wurde das Polyacrylamidgel plaziert, die Membran luftblasenfrei aufgelegt und mit

einem weiteren Blotpuffer-befeuchteten Filter bedeckt. Filter, Gel und Membran wurden in eine Gelkassette gespannt und in die Blotkammer gestellt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte unter Kühlung bei 100 V für 1 h oder über Nacht bei 30 mA. Die Membran konnte dann direkt in einen Immunblot (3.4.9.) eingesetzt werden.

#### 3.4.9. Immunblot

Für den Nachweis von Antigenen, die durch Western Blot auf PVDF-Membranen transferiert wurden (3.4.8.), wurde zunächst der Membranhintergrund durch Inkubation in Milch-Puffer (2.13.) für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln abgesättigt. Die Inkubation mit spezifischen Antikörpern oder Antiseren, die je nach Herstellerangaben in Milch-Puffer verdünnt wurden, erfolgte unter Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBS/0,5 % Tween20 gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper durch eine einstündige Inkubation mit einem sekundären, Peroxidase (POD)-konjugiertem Antikörper (2.7.), der 1:500 in Milch-Puffer verdünnt wurde, markiert. Nach erneutem Waschen der Membran, wie oben beschrieben, schloss sich die Farbreaktion mit 3,3-Diaminobenzidintetrahydro–Chlorid (DAB) (3.4.10.) oder die Chemilumineszenzreaktion der gebundenen Meerrettich-Peroxidase an (3.4.11.).

#### 3.4.10. Farbreaktion mit 3,3-Diaminobenzidintetrahydro-Chlorid (DAB)

Die Membran wurde in frisch angesetzte DAB-Lösung (10 mg/100 ml PBS), die mit 20  $\mu$ l 30 %  $H_2O_2$  versetzt wurde, schwenkend inkubiert. Wo das Peroxidase-markierte Protein gebunden war, wurde eine braune Färbung sichtbar. Die Farbreaktion wurde durch Spülen der Membran mit  $H_2O$  bidest. gestoppt.

#### 3.4.11. Chemilumineszenzdetektion von Meerrettich-Peroxidase-Konjugaten

An Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper wurden mit dem Chemilumineszenzsystem ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsprechend den Herstellerangaben nachgewiesen. Je 3 ml der Reagenzien 1 und 2 wurden miteinander vermischt und auf die gewaschene Membran gegeben. Nach Inkubation für eine Minute wurde die abgetropfte Membran noch feucht in einen Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und auf einem BIOMAX-Röntgenfilm für 1 min bis 1 h exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte wie unter (3.17.) beschrieben.

#### 3.4.12. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des "BCA Protein Assay"-Kit (PIERCE, Illinois, USA), dem das von SMITH et al. (1985) beschriebene Verfahren zugrunde liegt. Dabei bilden Peptide und Proteine mit Cu²+-Ionen in alkalischer Lösung einen violetten Komplex, dessen Menge photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt wurde.

Es wurde für jede Proteinprobe eine Doppelbestimmung in Mikrotiterplatten der Firma Greiner (Frickenhausen) durchgeführt.

25 μl Probe wurden mit 200 μl *Working Reagenz* versetzt, welches aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B hergestellt wurde. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Extinktion der Probe bei 562 nm im Photometer (Immuno-Reader NJ2000, Intermed) gegen eine Referenz ohne Protein gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde im Vergleich mit einer Standardeichkurve bestimmt. Diese Standardeichkurve wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) mit Proteinkonzentrationen von 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml und 2 mg/ml erstellt.

#### 3.5. Southern Blot (SOUTHERN, 1975)

Beim *Southern-blotting* wird DNA aus einem Gel eluiert und durch Sogwirkung auf eine feste Matrix transferiert, auf der sie sich anschließend mit einem markierten komplementären Nukleinsäure-Fragment (Sonde) hybridisieren lässt. Die Durchführung des Nukleinsäuretransfers (*blotting*) und der Hybridisierung erfolgte mit einigen Modifikationen nach dem von SAMBROOK et al. (1989) vorgeschlagenen Protokoll.

#### 3.5.1. DNA-Transfer auf Nylonmembran

Nach der Elektrophorese (3.2.6.) wurde das ungefärbte Agarosegel zur Denaturierung der zu übertragenden Nukleinsäure zunächst 2 x 15 min in einer Denaturierungslösung (2.13.) inkubiert. Anschließend wurde zum Transfer der DNA folgendes "Sandwich" aufgebaut: Ein 3 MM Whatmann-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) wurde über ein Glasplatte gelegt, so dass die beiden Enden in ein Vorratsgefäß mit Denaturierungslösung tauchten. Darauf wurde das Agarosegel gelegt, dann folgten die exakt zugeschnittene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membran, Pall, England) und zwei Lagen Whatmann-Papier, die alle in 0,1 x Denaturierungslösung äquilibriert worden waren. Das Gel wurde mit einem Passepartout aus Folie umgeben, der gesamte Aufbau mit einem Stapel Fließpapier überschichtet und mit einem Gewicht beschwert. Nach erfolgter DNA-

Übertragung bei Raumtemperatur über Nacht wurden die Geltaschen auf der Nylonmembran markiert und diese 2 x 15 min in Neutralisierungspuffer (2.13.) geschwenkt. Durch abschließendes Backen bei 80 °C für 1-2 h wurde die DNA auf der Membran fixiert, die in diesem Zustand trocken über längere Zeit aufbewahrt werden kann.

## 3.5.2. Hybridisierung mit dem "Alk Phos Direct"-Kit

Der dem "Alk Phos Direct"-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) beigefügte Hybridisierungspuffer wurde mit NaCl (Endkonzentration 0,5 M) und dem mitgelieferten blocking reagent [Endkonzentration 4 % (w/v)] versetzt und pro cm² Membran 0,125 bis 0,25 ml der Lösung auf 55 °C vorgewärmt. Die gebackene Nylonmembran (3.5.1.) wurde darin bei gleicher Temperatur für mindestens 15 min prähybridisiert. Anschließend wurde die mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelte Sonde (3.5.3.) in einer Konzentration von 5-10 ng/ml Hybridisierungspuffer zu dem Ansatz pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55 °C im Hybridisierungsofen (Hybaid, Heidelberg). Die Membran wurde bei gleicher Temperatur in einem Überschuss vorgewärmten Waschpuffers A (2.13.) inkubiert. Es folgten zwei 5-minütige Waschschritte bei Raumtemperatur in Waschpuffer B (2.13.) und die Detektion der Nukleinsäurehybride (3.5.4.).

## 3.5.3. Direktmarkierung mit Alkalischer Phosphatase

Zum Nachweis von HBV-DNA wurde das vollständige HBV-Genom, das zuvor aus dem Plasmid pRVHBV1.5 (2.4.) mit EcoRV geschnitten (3.2.3.) und in einem Agarosegel aufgetrennt und isoliert (3.2.7.) wurde, in die Markierungsreaktion eingesetzt. Die Herstellung der DNA-Sonde, die mit einer thermostabilen alkalischen Phosphatase direkt markiert war, erfolgte unter Verwendung des "Alk Phos Direct"-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Das zu koppelnde DNA-Fragment wurde mit Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/ $\mu$ l verdünnt. 10  $\mu$ l dieser DNA-Lösung wurden für 5 min im Wasserbad aufgekocht, 5 min auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden unter sachtem Mischen 10  $\mu$ l in  $H_2O$  vorverdünnter cross-linker solution (1:5) zugegeben, der Ansatz erneut kurz zentrifugiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die markierte Sonde wurde sofort zur Hybridisierung (3.5.2.) eingesetzt.

#### 3.5.4. Detektion von Sonden

Durch Einsatz der mit AP-gekoppelten Sonde zur Hybridisierung auf Nylonmembranen konnten die Hybride direkt über Chemilumieszenz nachgewiesen werden. Als Substrat

diente hierbei *CDP-Star* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), von dem 30-40 µl/cm<sup>2</sup> Membran für 5 min auf die Membranoberseite gegeben wurden. Die Nylonmembran wurde anschließend noch feucht in Folie eingeschweißt und für 30 min bis 2 Tagen auf einem Röntgenfilm (BIOMAX MR, Kodak, New Haven, USA) exponiert (3.18).

### 3.6. Präparation von Nukleokapsiden

#### 3.6.1. Anreicherung durch Saccharosegradientenzentrifugation

Zur Ernte intrazellulärer HBV-Nukleokapside erfolgte die Herstellung des klaren Zelllysats (3.4.3.). Der geklärte Überstand wurde auf einen vorbereiteten Saccharose-Gradienten [0,6 ml 60 %, 0,8 ml 45 %, 0,8 ml 30 %, 0,8 ml 15 % (w/w) Saccharose in PBS] in einem 4 ml-Zentrifugenröhrchen (S/L Tube P.A. 4 ml, Sorvall Instruments, USA) geschichtet. Nach der Zentrifugation im SW60-Rotor (Beckman, München) bei 38600 upm und 10 °C für 2 h wurde der Gradient in 5 Fraktionen á 0,8 ml aliquotiert. In der 3. Fraktion befanden sich die angereicherten Nukleokapside, die bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt oder zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden (3.4.4.).

#### 3.6.2. Anreicherung durch Nycodenzgradientenzentrifugation

Eine weitere Möglichkeit der Präparation der Nukleokapside ist die Auftrennung im Nycodenzgradienten (Röntgenkontrastmittel, Life Technologies, Eggenstein), in dem die Nukleokapside stabiler sein sollen (M. Kann, Gießen, pers. Mitteilung). Dazu wurden die Zellen lysiert (3.4.3.) und 1,5 ml geklärter Überstand auf einen Gradienten von je 1,5 ml 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % (w/v) Nycodenz in PBS in einem 12,5 ml-Zentrifugenröhrchen (S/L Tube P.A. 12,5 ml, Sorvall Instruments, USA) geschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation im SW40-Rotor (Beckman, München) bei 36000 upm und 10 °C für 24 h. Anschließend wurde der Gradient in 15 0,8 ml-Fraktionen aliquotiert. Der Brechungsindex der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch gemessen und ihre Dichte (laut Herstellerangaben) wie folgt berechnet:

Dichte  $[g/ml] = 3,287 \times Refraktionsindex - 3,383$ 

Anschließend wurde im HBcAg-ELISA (3.4.5.) untersucht, in welchen Fraktionen die Nukleokapside lokalisiert waren. Die angereicherten Nukleokapside wurden zur Immunpräzipitation (3.4.4.) eingesetzt.

### 3.6.3. Anreicherung durch isopyknische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Durch eine isopyknische CsCl-Dichtezentrifugation konzentrieren sich Partikel in dem Gradienten entsprechend ihrer Dichte. Hepatitis B Viren und Core-Partikel können dadurch aus dem Zellüberstand angereichert werden. In 10 ml Zellkulturüberstand wurden 3,88 g CsCl gelöst und in die Zentrifugenröhrchen (16 mm x 76 mm, Quick Seal Tubes, Beckman, München) gefüllt und austariert. Anschließend wurden sie mit Bayol F (Serva, Heidelberg) aufgefüllt, luftblasenfrei zugeschweißt und in einer Ultrazentrifuge (L8-M Ultrazentrifuge, Beckmann) im Tl 70.1-Rotor (Festwinkelrotor, Beckman, München) für 48 h bei 45000 upm und 20 °C zentrifugiert. Danach wurde der Gradient in 2 ml Fraktionen geteilt und der Brechungsindex mit einem Refraktometer (Zeiss, Jena) bestimmt. Daraus wurde die Dichte der Fraktionen in einer Tabelle abgelesen. Viren sedimentieren bei einer Dichte von 1,22 –1,26 g/ml und nackte Core-Partikel bei einer Dichte von 1,35 g/ml.

Fraktionen aus der isopyknischen CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, die für die Immunpräzipitation (3.4.4.) verwendet werden sollten, wurden mindestens 3 h bei Raumtemperatur gegen 2 l PBS (2.13.) dialysiert, um das CsCl zu entfernen.

## 3.7. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Proben auf einen Formvar beschichteten Probenträger aus Kupfer getropft, 60 sec inkubiert und dann vollständig abgesaugt. Anschließend wurden die Proben mit 2 % (w/v) Uranylacetat 60 sec kontrastiert und getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Transmissionsmikroskop (Jeol 1200 EX, Tokyo) von Dr. Christophe Hourioux (Universität Tours) angefertigt.

# 3.8. Peptidbindungsansatz

Es wurden pro Ansatz 5 ng rekombinante Core-Partikel mit 10 μg des jeweiligen Peptids in 100 μl 0,1x PBS über Nacht in einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Diese Ansätze wurden dann in einen HBcAg-ELISA eingesetzt.

Für diesen ELISA wurde eine Mikrotiterplatte (NUNC Maxisorp U96, Dänemark) über Nacht mit dem humanen Antiserum F1451 (2.7.), das einen hohen anti-HBc-Titer hat, in einer Verdünnung von 1:1000 in Coatingpuffer (2.14.) beschichtet. Die Platte wurde anschließend wie unter 3.4.5. beschrieben gewaschen und unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Nach Zugabe der Bindungsansätze in die Näpfe und einer Inkubationszeit für

1 h bei RT wurde die Platte 3 x mit 0,1x PBS/0,5 % (v/v) Tweeen20 gewaschen und danach mit einem POD-markiertem anti-HBc-Konjugat (2.7.), das 1:500 in 0,5 x PBS/1 % (w/v) BSA/20 % (v/v) FCS verdünnt war, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,5 x PBS/0,5 % (v/v) Tween20 wurde der Test wie unter 3.4.5. beschrieben entwickelt.

# 3.9. Radioaktive metabolische Markierung von Zellen (pulse-chase-Experimente)

Um geringe Mengen Core-Protein in der Zellkultur untersuchen zu können, war es notwendig, diese radioaktiv zu markieren. Dies geschah durch Supplementierung von Medium mit mehreren radioaktiv markierten Aminosäuren nach vorhergehender Verarmung der Zellen mit eben diesen Aminosäuren. Im Gegensatz zu Bakterien und Hefen können die meisten Säugetierzellen Methionin und Cystein nicht *de novo* synthetisieren. Dementsprechend kann zur metabolischen Markierung von Proteinen von außen ins Medium zugesetztes <sup>35</sup>S-Methionin und –Cystein benutzt werden.

Zur metabolischen Markierung von Proteinen wurden HuH7-Zellen 3 Tage nach der Transfektion mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 40 min in DMEM/Met<sup>-</sup>/Cys<sup>-</sup> (2.12.) inkubiert (3,6 ml pro 10 cm Schale). Die Markierung (*pulse*) erfolgte durch Zugabe von 500 μCi (10 cm Schale) <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein (2.10.) und anschließender Inkubation im Brutschrank für 6 h. Im Anschluss wurde der radioaktive Zellüberstand abpipettiert und durch 6 ml DMEM suppl. (2.12.) ersetzt. Bis zur Herstellung des Zelllysats (3.4.3.) erfolgte eine Inkubation (*chase*) der Zellen für 14 h.

# 3.10. Phosphorylierung von Nukleokapsiden (KANN & GERLICH, 1994; modifiziert)

Die Phosphorylierung von Nukleokapsiden erfolgte unter Zugabe von  $\gamma^{32}$ P-ATP (2.10.) in und ohne Anwesenheit von Proteinkinase C (2.5.). Dazu wurden die Nukleokapside mittels Saccharosegradientenzentrifugation (3.6.1.) präpariert und immunpräzipitiert (3.4.4.). Nach den Waschschritten wurde der Überstand vollständig mit einer ausgezogenen Glaspipette von dem Sepharosesediment entfernt. Für die Phosphorylierungsreaktion wurde folgende Mischung zusammenpipettiert:

20  $\mu$ l Nukleokapside gebunden an Sepharose-Sediment 4  $\mu$ l  $\gamma^{32}$ P-ATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) 20  $\mu$ l 5 x Proteinkinase C-Puffer (2.13.) 56  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest.

Es wurden jeweils 2 Parallelansätze angesetzt, wobei einem Ansatz 0,5 μl Proteinkinase C (0,08 U) hinzugefügt wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Ansätze bei 30 °C für 1 h. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl 0,5 M EDTA abgestoppt, und das Sepharose-Sediment mit den daran gebundenen Nukleokapsiden wurde dreimal mit PBS gewaschen, bevor es in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurde (3.4.6.). Anschließend wurde das Gel unter Vakuum und Hitze getrocknet (Geltrockner, Biotec Fischer, Reiskirchen), auf einem Röntgenfilm für 1 h bis einen Tag exponiert und die radioaktiv markierten Proteine im Gel autoradiographisch nachgewiesen (3.17.).

# 3.11. Bindung von DNA an Nukleokapside

# 3.11.1. <sup>32</sup>P-radioaktive Markierung von linearisierter Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA (pSV65; 2.4.) wurde mit Hilfe des "Random Prime Labelling Systems" (Roche, Mannheim) mit <sup>32</sup>P markiert.

100 ng linearisierte Plasmid-DNA wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis überführt. Zu der Plasmid-DNA wurden je 1  $\mu$ l 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP, 2  $\mu$ l Hexanukleotidmix (enthält Reaktionspuffer und Hexanukleotid-Primer mit zufälliger Sequenz) und 1  $\mu$ l (5 U) Klenow-Enzym zugefügt und mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 15  $\mu$ l Volumen aufgefüllt. Die Markierung erfolgte nach Zugabe von 5  $\mu$ l  $\alpha^{32}$ P-dCTP (2.10.) für 1 h bei 37 °C. Nicht eingebautes  $\alpha^{32}$ P-dCTP sowie Primer wurden mit Hilfe des "QlAquick PCR Purification Kit" (Qiagen, Hilden) aus dem Reaktionsansatz entfernt. Dazu wurde der Ansatz auf 50  $\mu$ l Volumen aufgefüllt, es wurden 250  $\mu$ l Puffer PB zum Ansatz gegeben, die Säule beladen und 60 sec zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 750  $\mu$ l Puffer PE gewaschen, der restliche Puffer durch einminütiges Zentrifugieren abgetrennt und die DNA mit 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest. und einminütiges Zentrifugieren eluiert.

Die eingebaute Menge an <sup>32</sup>P in der Probe wurde im Szintillationszähler (Typ PW4700, Philips, Hamburg) bestimmt.

#### 3.11.2. DNA-Bindungsversuch

Es wurden die DNA-Bindungseigenschaften von aus Zelllysat isolierten (3.6.1. und 3.4.4.) Nukleokapsiden untersucht. Vor der DNA-Bindung erfolgte eine Behandlung der an Sepharose gebundenen Nukleokapside mit Mikrokokkennuklease, um an den Nukleokapsiden gebundene DNA und RNA, die die Bindung der  $^{32}$ P-markierten DNA hemmen könnte, zu entfernen. Dazu wurden zu 10 µl an Sepharose gebundene Nukleokapside 5 µl Mikrokokkennuklease (10 µg/µl; 2.5.) pipettiert und das Volumen auf 30 µl mit Mikrokokkennuklease-Puffer (2.13.) aufgefüllt. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 1 h. Danach wurde die Nuklease durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA inhibiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS (2.13.) wurde die Bindung mit 6 x 10 $^5$  cpm  $^{32}$ P-radioaktiv markierter DNA (3.11.1.) in 100 µl PBS für 1 h bei 25 °C unter Schwenken durchgeführt. Nach 5 Waschschritten mit PBS wurde die Menge an  $^{32}$ P im Ansatz im Szintillationszähler (Typ PW4700, Philips, Hamburg) bestimmt.

# 3.12. Trypsinverdau der Nukleokapside

# 3.12.1. Verwendung von ungekoppeltem Trypsin (SEIFER & STANDRING, 1994; modifiziert)

Es wurden untersucht, inwieweit Trypsin Nukleokapside proteolytisch spaltet. Die aus Zelllysat präparierten Nukleokapside (3.6.1.) wurden vor dem Trypsinverdau immunpräzipiert (3.4.4.). Nach dreimaligem Waschen mit PBS (2.13.) wurden 10  $\mu$ l an Sepharose gebundene Nukleokapside mit 4  $\mu$ l frisch angesetzter Trypsin-Lösung (Konzentration je nach Versuch 9,6  $\mu$ g/ml, 48  $\mu$ g/ml und 240  $\mu$ g/ml) in 50 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer, pH 8,5 versetzt und mit 50 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer, pH 8,5 auf 30  $\mu$ l Volumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l 100 mM PMSF (in Ethanol; Sigma, Steinheim) wurden die Ansätze in 10  $\mu$ l 4 x Probenpuffer für SDS-PAGE (2.13.) 5 min kochend inkubiert und anschließend in einem SDS-Gel aufgetrennt (3.4.6.).

# 3.12.2. Verwendung von an Gold-gekoppeltem Trypsin (Au-Trypsin)

Das an 40 nm große Goldpartikel gekoppelte Trypsin wurde von PD Dr. M. Kann, Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Die Nukleokapside wurden vor der Behandlung mit Au-Trypsin durch Zentrifugation im Nycodenzgradienten angereichert (3.6.2.) und anschließend immunpräzipitiert (3.4.4.). Die gewaschenen Nukleokapside wurden mit 5 µl Au-Trypsin versetzt und mit PBS (2.13.) auf 30 µl Volumen aufgefüllt. Der

Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.12.1. beschrieben.

### 3.13. Bindung von Nukleokapsiden und Mikrosomen

#### 3.13.1. Mikrosomenpräparation (PRANGE et al., 1992)

Die in einer 10 cm-Kulturschale gewachsenen COS7-Zellen wurden mit 5 ml 1 x TBS (2.13.) gewaschen und mit 1 ml 0,1 x TBS auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Schaber von der Kulturschale abgelöst und mit einem Dounce-Homogenisator (1 ml, enge Spaltenbreite, Fa. Schütt, Göttingen) homogenisiert (40 Stöße) und anschließend nach Zugabe von 100 µl 10 x TBS 15 min bei 2500 upm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der vesikelhaltige Überstand wurde zur Abtrennung cytosolischer Proteine über ein Saccharosekissen (2,7 ml 10 % Saccharose (w/w) in 1 x TBS) gegeben und in einer Ultrazentrifuge in 4 ml-Zentrifugenröhrchen (S/L Tube P.A. 4 ml, Sorvall Instruments, USA) bei 37000 upm in einem SW60-Rotor (Beckman, München) abzentrifugiert (30 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml 1 x TBS oder Bindungspuffer (2.13.) aufgenommen, mit einer 1 ml-Spritze und einer G23-Kanüle durch 10maliges Auf- und Absaugen resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Die relative Menge wurde anschließend durch Messung der OD<sub>280</sub> bestimmt.

# 3.13.2. Bindungsansatz von Nukleokapsiden und Mikrosomen

Zur Untersuchung der Interaktion der Nukleokapside mit Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wurden aufgereinigte Core-Partikel (3.6.1.) und Mikrosomen (3.13.1.) gemischt und in Anwesenheit von 10 µg DNasel (2.5.) in einem Gesamtvolumen von 300 µl Bindungspuffer (2.13.) im Überkopfrotor für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 450 mg Saccharose zugegeben, um die Lösung auf 60 % (w/w) Saccharose einzustellen und bis zur Lösung des Zuckers (ca. 30 min) weiter in dem Rotor inkubiert.

# 3.13.3. Ultraflotationszentrifugation der Bindungsansätze

Die mit 60 % (w/w) Saccharose gemischten Bindungsansätze (3.13.2.) wurden in 4 ml-Zentrifugenröhrchen (S/L Tube P.A. 4 ml, Sorvall Instruments, USA) gegeben und mit 2 ml einer 50 % (w/w) Saccharose in Bindungspuffer (2.13.) überschichtet. Das Röhrchen wurde mit 10 % (w/w) Saccharose in Bindungspuffer aufgefüllt und im Anschluss 16-18 h bei 35000 upm und 10 °C im SW60-Rotor zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der

Gradient in fünf Fraktionen von je 800 µl von oben abpipettiert, die Saccharose-Dichten refraktometrisch bestimmt (Refraktometer, Zeiss, Jena), mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.) und in der SDS-PAGE (3.4.6.) analysiert.

# 3.14. Nachweis der endogenen Polymerase in HBV-Partikeln

In Zellkultur synthetisierte intakte Core-Partikel und Virionen haben die virale Polymerase eingeschlossen. In diesem Testsystem wird die Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen, indem  $\alpha^{32}$ P-dCTP angeboten wird, das in das HBV-Genom eingebaut wird. Der Nachweis der aktiven Polymerase ist deshalb zugleich ein indirekter Nachweis intakter Core-Partikel. Im Zellkulturüberstand können auf diese Weise Virionen nachgewiesen werden. Das immunpräzipitierte Material (3.4.4.) wurde einmal mit 1 ml 1 x inkompletten Polymerasepuffer gewaschen und 30 sec bei 14000 upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett mit einer ausgezogenen Glaspipette von dem Sepharosesediment entfernt. Pro Ansatz erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ l Polymerase-Reaktionspuffer, wobei die radioaktive Markierung des Hepatitis B Virus Genoms in Gegenwart von  $\alpha^{32}$ P-dCTP bei 37 °C über Nacht erfolgte.

| 2 x inkompl. Polymerasepuffer |                    | Polymerase-Reaktionspuffer |  |
|-------------------------------|--------------------|----------------------------|--|
| 100 mM                        | Tris-HCI, pH 7,5   | 25                         | μl 2 x inkompl. Polymerasepuffer                         |
| 150 mM                        | NH <sub>4</sub> CI | 1                          | μl 1 M MgCl <sub>2</sub>                                 |
| 2 mM                          | EDTA               | 0,5                        | μl 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol                          |
|                               |                    | 2,5                        | μΙ 10 % (v/v) Nonidet P40                                |
|                               |                    | 2                          | μl je 2 mM dGTP, dATP, dTTP                              |
|                               |                    | 1                          | $\mu$ l $\alpha^{32}$ P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 $\mu$ Ci) |
|                               |                    | 18                         | μl H <sub>2</sub> O bidest.                              |

Danach wurde der Reaktionsansatz mit 20 μl DNasel-Lösung vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 70 μl Proteinase K-Lösung für 30 min bei 37 °C. Um die DNA von Proteinen zu befreien, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.1.1.) angeschlossen. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,4 Vol. 10 M NH<sub>4</sub>-Acetat, 2,5 Vol. Ethanol und 15 min Inkubation bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach Pelletierung durch Zentrifugation für weitere 15 min bei 14000 upm und Raumtemperatur, wurde das Pellet in 100 μl TE-Puffer gelöst und eine zweite Präzipitation durchgeführt. Nachdem das DNA-Pellet getrocknet war, wurde es in 12 μl 1 x Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese (2.13.) gelöst und in einem Agarosegel elektrophoretisch

aufgetrennt (3.2.6.). Nach abgeschlossener Auftrennung der DNA erfolgte die Trocknung des Agarosegels (Geltrockner; Biotec Fischer, Reiskirchen) auf einem Stück Whatman-Filterpapier für 45 min unter Vakuum und Hitze. Die radioaktiv markierte DNA wurde durch Autoradiographie nachgewiesen (3.17.).

#### <u>DNasel-Lösung</u>

2,5 µl DNasel (2 mg/ml)

10 μl 2 x inkompl. Polymerasepuffer

7,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest.

#### Proteinase K-Lösung

65,2 µl 2 x Proteinase K-Puffer (2.13.)

4,2 µl Proteinase K (10 mg/ml)

0,6 µl tRNA (10 mg/ml)

# 3.15. Isolierung von HBV-DNA

Aus Virionen oder Nukleokapsiden, die durch Immunpräzipitation (3.4.4.) angereichert worden waren, wurde die virale DNA durch eine enzymatische Behandlung mit Proteinase K (2.5.) isoliert. Zunächst wurde die sich außerhalb der Partikel befindende DNA durch Zugabe von 10 μg DNasel (2.5.) in Gegenwart von 15 mM MgCl<sub>2</sub> in 50 μl PBS (2.13.) degradiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurden 50 μl 2 x Proteinase K-Puffer (2.13.), 3 μl Proteinase K (10 mg/ml; 2.5.) und 1 μl tRNA (10 mg/ml) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurden die Ansätze mit Phenol-Chloroform extrahiert (3.2.1.1.) und die DNA mit Ethanol gefällt (3.2.1.2.).

# 3.16. Isolierung von ccc (circular covalently closed)-DNA (SUMMERS et al., 1990)

Nach Infektion von HepG2-Zellen mit rekombinanten Baculoviren (3.3.1.3.) waren die Zellen in der Lage, cccDNA zu bilden. Diese wurde isoliert und im Southern Blot (3.5.) nachgewiesen.

Nach Abnahme des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit 5 ml PBS (2.13.) gewaschen und zur Lyse der Zellen mit 1 ml Lysispuffer (2.13.) überschichtet. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C für 30 min wurde der Zellrasen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der Protein-Detergenz-Komplexe erfolgte durch Zugabe von 0,25 ml 2,5 M KCl. Der Ansatz wurde durch Schwenken gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 14000 upm (Tischzentrifuge) bei Raumtemperatur wurde das unlösliche Material und die zelluläre, an Proteinen gebundene DNA abgetrennt. Der Überstand wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.1.1.) unterzogen und die DNA mit

Isopropanol gefällt (3.2.1.3.). Um im Ansatz befindliche Baculovirus-DNA und oc (*open circular*)-HBV-DNA abzutrennen, wurde der Ansatz mit *Plasmid Safe ATP-Dependent-DNase* (2.5.) behandelt. Dazu wurde das DNA-Pellet in folgender Lösung aufgenommen und 2 h bei 37 °C inkubiert:

1 μl 25 mM ATP

2,5 µl 10 x Plasmid Safe ATP-Dependent-DNase-Puffer

1 µl RNase A-Lösung (2.13.)

3 μl Plasmid Safe ATP-Dependent-DNase

ad 25 µI H<sub>2</sub>O bidest.

Die Inaktivierung der *Plasmid Safe ATP-Dependent-DNase* erfolgte durch Inkubation des Ansatz bei 70 °C für 1 h. Anschließend wurde der Ansatz halbiert und die eine Hälfte mit der Restriktionsendonuklease *Spel* verdaut (3.2.3.). Zum Schluss wurden beide Ansätze parallel in der Agarosegelelektrophorese (3.2.6.) aufgetrennt und einem Southern Blot (3.5.) unterzogen.

# 3.17. Immunfluoreszenzfärbung

Zur Quantifizierung Baculovirus-infizierter Zellen wurde ein Immunfluoreszenztest (IFT) durchgeführt.

Dazu wurden HepG2-Zellen mit einer Dichte von 10<sup>5</sup> Zellen pro Loch in 24-Lochplatten (Costar Corning, Bodenheim) ausgesät, in die runde Deckgläschen (Durchmesser 13 mm; Hartenstein, Würzburg) gelegt worden waren. Nach Ädhärenz der Zellen über Nacht erfolgte wie beschrieben (3.3.1.3.) die Infektion bzw. Superinfektion mit rekombinanten Baculoviren. Für den Immunfluoreszenztest wurden die Zellen nach einer Inkubation von 7 Tagen für 30 min mit 0,3 ml 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit 0,5 ml PBS gespült. Die Zellen wurden anschließend für 10 min in 0,5 ml 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS inkubiert, 5 Minuten in 1 ml PBS gewaschen und mit 0,3 ml 0,1 mg/ml Saponin, 1 % BSA in PBS (Saponin/BSA/PBS) für 1 Stunde permeabilisiert. Nach erneutem Waschen für 10 min mit 1 ml 0,1 mg/ml Saponin in PBS (Saponin/PBS) wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Kaninchen anti-HBc-Antikörper (2.7.) (1:500) in Saponin/PBS inkubiert. Dazu wurden Deckgläschen mit der Oberseite nach unten auf einen 30 μl-Tropfen der Antikörperlösung auf Parafilm gelegt. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml Saponin/PBS für jeweils 10 min wurden die Zellen für eine Stunde mit 15 μg/ml Cy2-(Carbocyanin-)konjugiertem anti-Kaninchen IgG F(ab′)<sub>2</sub> Fragment vom Esel (2.7.)

inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde danach dreimal mit 1 ml Saponin/PBS und einmal mit 1 ml PBS für jeweils 10 min gewaschen. Danach wurden die Deckgläschen kurz in entmineralisiertem Wasser gewaschen und dann mit 10 µl Mowiol-Eindeckelmedium (2.13.) pro Deckgläschen auf Objektträger gebracht. Nach dem Trocknen wurden die fertigen Präparate für einige Stunden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (Mikroskop "Leica DMR") bei 4 °C gelagert. Bei der Auswertung wurden mindestens 200 Zellen pro Ansatz ausgezählt und jeweils die Anzahl der HBcAg positiven Zellen bestimmt.

# 3.18. Autoradiographie

Zur Autoradiographie von Sequenzgelen, Proteingelen und Southern Blots wurde der Röntgenfilm BIOMAX MR (Kodak, New Haven, USA) verwendet. Nach Exposition von einer Minute bis zu zwei Wochen wurden die Filme 2 min entwickelt (Entwickler, Kodak, New Haven, USA), kurz in 5 % (v/v) Essigsäure inkubiert und 4 min fixiert (Fixierer, Kodak, New Haven, USA). Der Film wurde gut gewässert und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 4. ERGEBNISSE

# 4.1. Vergleichende Untersuchungen reifer und unreifer Nukleokapside mit proteinbiochemischen Methoden

Ein essentieller Schritt der HBV-Replikation ist die Verpackung des RNA-Prägenoms im Cytosol der Zelle in Nukleokapside. Im Laufe der Reifung des Partikels wird das Prägenom von der Reversen Transkriptase des Virus zunächst in einzelsträngige Minusstrang-DNA umgeschrieben. Dann erfolgt die partielle Synthese der DNA des Plusstrangs. Die reifen Kapside werden schließlich an einer intrazellulären Membran von den Oberflächenproteinen umhüllt und sezerniert. Die Umformung des Kapsids, das die prägenomische RNA enthält, zum DNA-haltigen Kapsid wird auch Kapsidreifung genannt. Es ist in vorangegangenen Experimenten gefunden worden, dass ausschließlich reife, d.h. DNA-haltige Kapside in der Zelle umhüllt und nachfolgend sezerniert werden, unreife Nukleokapside dagegen nicht (GERELSAIKHAN et al., 1996). Die Synthese von DNA bewirkt offenbar die Bildung eines Signals auf der Partikel-Oberfläche, das die Kapside kompetent für die Umhüllung macht. Wird die DNA-Synthese inhibiert, können die Kapside aufgrund des fehlenden Signals nicht umhüllt werden.

Ziel dieser Arbeit ist gewesen, durch biochemische Untersuchungen unreifer und reifer Kapside dieses Umhüllungssignal zu identifizieren. Als Bindungsdomäne für die Virushülle könnte der positiv geladene C-Terminus des Core-Proteins dienen. Zwar konnten verschiedene Experimente zeigen, dass dieser Bereichs des Proteins im Inneren des Partikels vorliegt (MACHIDA et al., 1991), andere Ergebnisse deuten jedoch daraufhin, dass er zum Teil auch nach außen exponiert ist (SCHLICHT et al., 1989). Möglicherweise kommt es bei unreifen und reifen Partikeln zu einer unterschiedlichen Exposition des C-Terminus auf der Oberfläche. Eine mögliche Vorstellung ist, dass nach erfolgter DNA-Synthese im Inneren der Kapside der C-Terminus durch die Poren (CROWTHER et al., 1994) nach außen Das würde bedeuten. dass bei reifen. gelangt. umhüllungskompetenten Kapsiden aufgrund der erfolgten DNA-Synthese mehr C-Termini auf der Oberfläche lokalisiert sind als bei unreifen Kapsiden. Durch den positiv geladenen C-Terminus könnte die Anlagerung des Nukleokapsids an die negativ geladene Oberfläche der ER-Membran erfolgen, an der es im weiteren Verlauf zu einer Bindung des Kapsids an die Hüllproteine kommt. Da der C-Terminus des Core-Proteins ebenfalls an der Bindung der prägenomischen RNA und der DNA-Synthese im Inneren des Kapsids beteiligt ist (NASSAL, 1992a), könnte das Core-Protein durch zwei verschiedene Faltungen mehrere Funktionen übernehmen. Desweiteren könnte der Phosphorylierungsstatus des C-Terminus der Core-Proteine ein Signal für die Umhüllung darstellen.

Die sich aus dieser Hypothese ergebenen Experimente dienten der Untersuchung des C-terminalen Core-Protein Bereichs reifer und unreifer Nukleokapside. Dazu sollten Nukleokapside der L<sup>-</sup>-Mutante (DNA-haltig, reif) und Nukleokapside der RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup>-Mutante (unreif, verpacken nur RNA, führen aber keine DNA-Synthese duch) durch Transfektion von HuH7-Zellen mit den entsprechenden genomischen Konstrukten exprimiert und aus dem Cytoplasma der Zellen durch Zelllyse und Saccharose- bzw. Nycodenzgradienten isoliert werden. Die reifen Kapside sollten durch Benutzung der L<sup>-</sup>-Mutante isoliert werden, da beim Wildtyp erwartet wurde,dass die Konzentration DNA-haltiger Kapside aufgrund der stattfindenden Umhüllung im Cytoplasma geringer ist. Aufgrund der fehlenden Synthese des großen Hüllproteins ist die L<sup>-</sup>-Mutante nicht in der Lage, Viren zu bilden, kann aber intrazellulär reife Core-Partikel synthetisieren. Die Partikelpräparationen wurden dann in folgende Experimente eingesetzt und miteinander verglichen.

# 4.1.1. Markierung von Nukleokapsiden mit $\gamma^{32}$ P-ATP

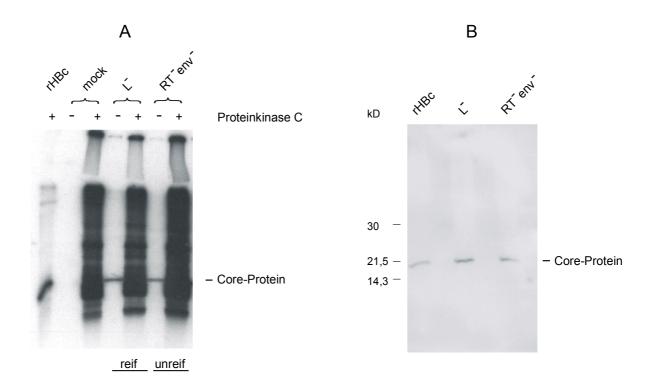
Die Interaktion von Nukleokapsiden mit Hüllproteinen des Virus könnte durch kovalente Modifikation des Kapsidproteins reguliert werden. Eine bereits bekannte Modifikation des Core-Proteins ist dessen Phosphorylierung an Serinresten des C-Terminus durch eine zelluläre Proteinkinase, die in die Core-Partikel verpackt wird (GERLICH et al., 1982; KANN et al., 1994). Desweiteren zeigten unreife, intrazelluläre Nukleokapside des DHBV eine elektrophoretische Heterogenität in der SDS-PAGE aufgrund der unterschiedlichen Phosphorylierung, während Core-Proteine aus extrazellulären Virionen nur in ihrer dephosphorylierten Form im SDS-Gel nachgewiesen werden konnten (PUGH et al., 1989). Möglicherweise stellt deshalb die Dephosphorylierung der Nukleokapside ein Signal für die Umhüllung dar.

Durch Inkubation mit <sup>32</sup>P-markiertem ATP sollte nach Unterschieden in der Markierung reifer und unreifer Nukleokapside gesucht werden. Neben der Markierung der Partikel durch die endogene Proteinkinase sollte ebenfalls ein Markierungsversuch mit exogener Proteinkinase C (PKC) erfolgen, um mögliche außen exponierte C-Termini analysieren zu können. Als Kontrolle der Phosphorylierungsspezifität und der Aufreinigungseffektivität wurde parallel ein "mock"-transfizierter Ansatz als Negativkontrolle mitgeführt.

Dazu wurden vier Schalen (10 cm Durchmesser) HuH7-Zellen transient mit den genomischen HBV-Konstrukten pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> und pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> (2.4.) transfiziert (3.3.1.2.). Daneben wurden Zellen mit dem Kontrollplasmid pSV65 (2.4.) "mock"-transfiziert. Nach 5 Tagen Inkubation der Zellen erfolgte die Zelllyse (3.4.3.). Danach wurden die im Zelllysat enthaltenen Nukleokapside durch ein zweistufiges Saccharosekissen (1 ml 40 % (w/v) und 1,3 ml 20 % (w/v) Saccharoselösung) pelletiert

(SW60-Rotor, 50000 rpm, 21,5 h, 20 °C, Ultrazentrifuge L8-M). Das Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert und die Nukleokapside im HBcAg-ELISA quantifiziert (3.4.5.). Ein Sechstel (ca. 200 ng Core-Protein) der pelletierten Proteine wurde im SDS-Gel (3.4.6.) getrennt, und die Core-Proteine wurden mit Hilfe eines HBeAg-spezifischen Antiserums (F1451; 2.7.) im Western Blot (3.4.8.) nachgewiesen (Abb. 14B). In Abb. 14B ist ein Immunblot (3.4.9. und 3.4.11.) mit Core-Partikel-Präparationen aus transfizierten HuH7-Zellen und rekombinantem Core-Protein aus E. coli (4.3.1.) gezeigt. Mit Hilfe des anti-HBe-spezifischen Serums, durch das denaturiertes Core-Protein detektiert werden konnte, wurde eine Core-Protein-spezifische Bande bei 21 kD in den Präparationen sowie das in E. coli exprimierte Protein nachgewiesen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass Core-Partikeln eine Expression von stattgefunden hat. Ein Vergleich Bandenintensitäten bestätigte, dass gleiche Mengen Core-Protein im Western Blot eingesetzt worden waren.

Parallel dazu erfolgte nach einer weiteren Aufreinigung des verbliebenen Ansatzes (ca. 950 ng Core-Partikel) durch Immunpräzipitation (3.4.5.) die Inkubation mit  $\gamma^{32}$ P-ATP. ATP ist in 100-fachem molaren Überschuss eingesetzt worden, wenn davon ausgegangen wird, dass die sieben Serinreste des Core-Proteins (von denen drei im C-Terminus lokalisiert sind) potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen. Die Ansätze wurden halbiert, und jeweils eine Hälfte wurde zusätzlich mit Proteinkinase C (2.5.) inkubiert (3.10.). Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Auftrennung der Ansätze in einem SDS-Gel (3.4.6.), von dem anschließend ein Autoradiogramm (3.18.) angefertigt wurde. Abb. 14A zeigt das Autoradiogramm der Ansätze. Ohne Proteinkinase C-Zugabe besteht kein quantitativer Unterschied zwischen der Phosphorylierung reifer und unreifer Kapside. Im "mock"-transfizierten Ansatz ist ohne PKC keine Bande zu sehen, so dass die jeweilige Bande der anderen Ansätze phosphoryliertes Core-Protein darstellten. In den Ansätzen mit Proteinkinase C konnte das Core-Protein durch den hohen Hintergrund nicht sichtbar gemacht werden. Anscheinend befanden sich trotz der Pelletierung durch die Saccharosekissen und der Aufreinigung durch Immunpräzipitation noch Proteinverunreinigungen im Ansatz, die ebenfalls phosphoryliert wurden. Auch Veränderungen bezüglich der Stringenz der Waschschritte brachte keine Verringerung des Hintergrunds (Daten nicht gezeigt). Rekombinant in E. coli hergestellte Core-Partikel wurden nur unter Zugabe von PKC phosphoryliert, da sie keine Proteinkinase beinhalteten. Die Daten zeigten, dass sich die Phosphorylierungsfähigkeit reifer DNAhaltiger und unreifer RNA-haltiger Kapside nicht unterschied. Das Ausmaß der Phosphorylierung der Partikel hatte somit keinen Einfluss auf die Umhüllung.



**Abb. 14:** Markierung von Nukleokapsiden mit γ³²P-ATP (A) und Nachweis im Immunblot (B). Aus HuH7-Zellen, die mit den Plasmiden pSVHBV1.5 L¯ und pSVHBV1.5 RT¯env¯ transfiziert worden waren, wurden reife bzw. unreife Nukleokapside isoliert. Sie wurden durch zwei übereinandergeschichtete Saccharosekissen pelletiert. Daneben wurde die gleiche Menge rekombinant in *E. coli*-exprimierten Core-Partikel (rHBc) eingesetzt.

- (A) Präparierte Nukleokapside (950 ng) wurden nach Immunpräzipition mit  $\gamma^{32}$ P-ATP inkubiert, wobei die Hälfte des Ansatzes zusätzlich mit Proteinkinase C versetzt wurde. Nach mehreren Waschschritten wurden die Ansätze in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Autoradiogramm wurde 30 min exponiert.
- (B) Präparierte Nukleokapside (200 ng) wurden denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Core-Proteine erfolgte mit anti-HBe-haltigem Serum F1451 und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Antikörper mit dem ECL-Chemilumineszenzsystem. Die Abb. zeigt ein Exponat von 1 min.

### 4.1.2. Bindung von DNA an Nukleokapside

Der argininreiche, positiv geladenen C-Terminus der Core-Proteine ist in der Lage, unspezifisch Nukleinsäuren zu binden (PETIT & PILLOT, 1985). Eine Möglichkeit, die Exposition des C-Terminus an der Partikeloberfläche zu untersuchen, könnte deshalb die Bindung radioaktiv-markierter DNA an reife bzw. unreife Nukleokapside darstellen. Um eine sequenzunspezifische DNA-Bindung zu ermitteln, wurde in den Untersuchungen ein Plasmid ohne HBV-spezifische Sequenz eingesetzt. Zuvor wurden die eingesetzten Nukleokapside mit Mikrokokkennuklease behandelt, um daran gebundene RNA und DNA zu entfernen. Die Spezifität der DNA-Bindung wurde durch Mitführen eines "mock"-transfizierten Ansatz überprüft. Desweiteren wurden rekombinant in *E. coli* exprimierte Core-Partikel (4.3.1.) zur Bindung eingesetzt.

Für die Herstellung reifer und unreifer Nukleokapside wurden jeweils vier Schalen HuH7-Zellen (Durchmesser 10 cm) mit dem Expressionsplasmid pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> (2.4.) bzw. pSVHBV1.5 RT env (2.4.) transfiziert (3.3.1.2.). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem Kontrollplasmid pSV65 (2.4.), das keine HBV-Proteine kodiert, "mock"-transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden cytosolische Nukleokapside präpariert (3.4.3.) und für den anschließenden Bindungsansatz im HBcAg-ELISA (3.4.5.) quantifiziert. Danach erfolgte eine Auftrennung der Kapside in einem Saccharose-Dichtegradienten (3.6.1.) und deren Immunpräzipitation mit anti-HBc (3.4.4.). Plasmid-DNA des Vektors pSV65 wurde mit *Eco*RI linearisiert (3.2.3.) und im Anschluss mit  $\alpha^{32}$ P-dCTP radioaktiv markiert (3.11.1.). Für die Bindungsansätze wurden 6 x 10<sup>5</sup> cpm gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA-Bindung an 800 ng Nuklease-behandelte und immunpräzipitierte Nukleokapside bzw. rekombinante Core-Partikel erfolgte für eine Stunde bei 25 °C (3.11.2.). Anschließend wurden die Ansätze mehrfach gewaschen und die Menge an Radioaktivität bestimmt. In Abb. 15 sind die Ergebnisse der Inkubationsansätze dargestellt.

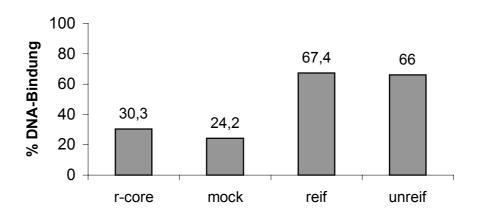


Abb. 15: DNA-Bindung an Nukleokapside.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der gebundenen radioaktiv-markierten DNA an isolierte Nukleokapside; die eingesetzte DNA-Menge pro Ansatz entsprach 100 %. Aus HuH7-Zellen, die mit den Plasmiden pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> und pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> transfiziert worden waren, wurden reife bzw. unreife Nukleokapside isoliert. Sie wurden einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen und immunpräzipitiert. Anschließend wurden sie eine Stunde bei 25°C mit linearisierter,  $\alpha^{32}$ P-dCTP radioaktiv-markierter pSV65-DNA inkubiert. Nach mehrmaligen Waschschritten wurde der Gehalt an Radioaktivität im Szintillationsmessgerät bestimmt. Als Negativkontrolle wurden mit pSV65-transfizierte Zellen als "mock"transfizierter Ansatz mitgeführt. Rekombinante, in E. coli exprimierte Kapside wurden ebenfalls in den Bindungsansatz eingesetzt (r-core).

Die Ansätze unterschieden sich deutlich hinsichtlich der DNA-Bindung, wobei von reifen und unreifen Nukleokapsiden ca. dreimal mehr DNA gebunden wurde als von der Negativkontrolle. Im dargestellten Experiment wurde eine DNA-Bindung der Präparation aus Zellen gezeigt, die mit dem Kontrollplasmid pSV65 "mock"-transfiziert worden waren. Diese Bindung musste auf eine Nukleokapsid-unabhängige Bindung zurückgeführt werden. Die Menge der gebundenen DNA der beiden Nukleokapsidpräparationen war identisch. In *E. coli* rekombinant hergestellte Core-Partikel waren ebenfalls in der Lage, 30 % der eingesetzten DNA zu binden. Aufgrund der fehlenden Verpackung des Prägenoms und der Polymerase können diese Kapside nicht mit in Zellkultur exprimierten Nukleokapsiden verglichen werden. Desweiteren enthielt die Core-Partikelpräparation aus *E. coli*-Zellen weniger Verunreinigungen (4.3.1.) als die aus Zellkultur präparierten Partikel, so dass die unspezifische DNA-Bindung an diesen Partikeln wahrscheinlich geringer war.

### 4.1.3. In vitro-Bindung von Nukleokapsiden an Mikrosomen

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass reife, DNA-haltige Nukleokapside mit aus COS7-Zellen präparierten Mikrosomen koflotierten (VIELUF, 1998). Dies deutete auf eine Assoziation der Kapside mit den Mikrosomen hin. Das Ergebnis war unabhängig davon, ob die Mikrosomen die Oberflächenproteine des HBV enthielten oder nicht. Eine mögliche Interaktion der Nukleokapside z.B. durch Exposition des C-Terminus an der Partikeloberfläche mit Membranbestandteilen wurde angenommen. Im folgenden Versuch sollten diese Ergebnisse reproduziert werden, und es sollte untersucht werden, ob unreife, RNA-haltige Kapside ebenfalls eine Interaktion mit den Mikrosomen zeigten. Das Prinzip des Versuchs beruhte darauf, dass Nukleokapside und Mikrosomen in einem Saccharose-Gradienten unterschiedliche Schwebdichten besaßen. Die Mikrosomen wiesen aufgrund ihrer Größe von ca. 100 nm und ihrer geringeren Dichte eine größere Mobilität in einem Gradienten auf als die 30 nm großen Core-Partikel, wobei die Dichte eines potentiellen Komplexes von den Mikrosomen dominiert wurde. Bei einer Interaktion zwischen Mikrosomen und Nukleokapsiden sind letztere in der Fraktion der Mikrosomen nachgewiesen worden.

Bei vorausgegangenen Untersuchungen wurden die Nukleokapside mittels PCR nachgewiesen. Da unreife Kapside keine DNA enthielten, schied ein Nachweis mittels PCR in diesem Versuch aus. Die in Zellkultur produzierten Mengen an Core-Partikeln würden nicht ausreichen, um sie in diesem Versuch im Western-Blot sichtbar zu machen. So sollten die Partikel durch Einbau radioaktiv-markierter Aminosäuren Methionin und Cystein metabolisch markiert und anschließend detektiert werden.

Je zwei Schalen HuH7-Zellen (10 cm Durchmesser) wurden mit den Expressionsplasmiden pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> (2.4.) bzw. pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> (2.4.) transfiziert

(3.3.1.2.) und metabolisch markiert (3.9.). Die im Zelllysat mit <sup>35</sup>S-Cystein/Methionin markierten Nukleokapside wurden durch ein zweistufiges Saccharosekissen (1 ml 40 % (w/v) und 1,3 ml 20 % (w/v) Saccharoselösung) pelletiert (SW60-Rotor, 50000 rpm, 21,5 h, 20 °C, Ultrazentrifuge L8-M) und in 100 μl PBS resuspendiert. Die Bindungsversuche wurden mit Mikrosomen durchgeführt, die aus COS7-Zellen gewonnen wurden (3.13.1.). Die relative Menge der verwendeten Mikrosomen wurde durch Messung bei 280 nm bestimmt. Für jeden Ansatz der Extinktion Mikrosomenkonzentration verwendet, die einer OD<sub>280</sub> von 0,0875 von einer 1:200 Verdünnung entsprach. Die Mikrosomen wurden mit den resuspendierten Core-Partikeln in einen Bindungsansatz eingesetzt (3.13.2.). Anschließend wurden die Ansätze mit Saccharose zu einer Endkonzentration von 60 % (w/w) versetzt und unter einen Saccharosegradienten geschichtet (3.13.3.). Nach Zentrifugation über 16 h bei 35000 upm und 10 °C wurde der Gradient in fünf Fraktionen aliquotiert und der Saccharose-Gehalt refraktometrisch bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.) und gebundene Nukleokapside nach mehreren Waschschritten auf ein SDS-Gel aufgetragen (3.4.6.), von dem ein Autoradiogramm angefertigt wurde (3.18.). Abb. 16 zeigt das Autoradiogramm eines SDS-Gels der Bindungsansätze reifer und unreifer Nukleokapside an Mikrosomen.

Der größte Anteil der markierten Nukleokapside befand sich in der Fraktion mit 55 bzw. 56 % Saccharose. In den leichteren Fraktionen konnten ebenfalls Partikel nachgewiesen werden. Dies deutete auf eine Assoziation mit den eingesetzten Mikrosomen hin, die bei ca. 28 % (w/w) Saccharose in Fraktion 2 lokalisiert sind. Es zeigte sich, dass eine generelle Assoziation von Mikrosomen mit den eingesetzten Nukleokapsiden vorlag, da neben der Interaktion DNA-haltiger Kapside auch Wechselwirkungen der Mikrosomen mit unreifen, RNA-haltigen Kapsiden beobachtet wurden. Möglicherweise binden Kapside aufgrund der Versuchsanordnung unabhängig vom C-Terminus an Mikrosomen. Andererseits ist es vorstellbar, dass sowohl reife als auch unreife Nukleokapside mit Membranbestandteilen interagieren und ein anderer Faktor die Umhüllung DNA-haltiger Kapside veranlaßt.

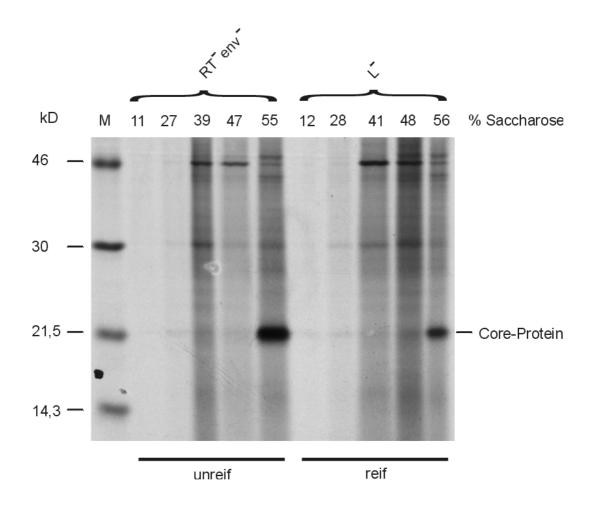


Abb. 16: Assoziation von Nukleokapsiden mit Mikrosomen aus COS7-Zellen.

HuH7-Zellen wurden mit den Plasmiden pSVHBV1.5 L und pSVHBV1.5 RT env transfiziert und metabolisch mit 35S-Cystein/Methionin markiert. Die mit 35S-markierten Nukleokapside wurden durch zwei übereinandergeschichtete Saccharosekissen pelletiert. Anschließend wurden sie mit aus COS7-Zellen präparierten Mikrosomen in Bindungspuffer gemischt. Die Bindungsansätze wurden nach einer Inkubation von 2 h mit Saccharose zu einer Endkonzentration von 60 % (w/w) versetzt, unter einen Saccharosegradienten geschichtet und über Nacht bei 35000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Gradient in 5 Fraktionen aliquotiert und diese mit anti-HBc immunpräzipitiert. Die Ansätze wurden im SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Die Abb. zeigt ein Exponat von 2 Wochen. M: Proteinstandard "Rainbow [14C]-methylierter Protein-Marker.

#### 4.1.4. Partieller Trypsin-Verdau von Nukleokapsiden

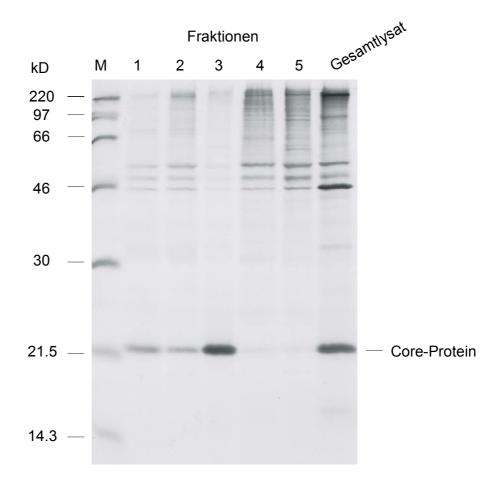
Der partielle Verdau von Nukleokapsiden mit der Protease Trypsin ist eine weitere Möglichkeit, die Lokalisation des C-Terminus der Core-Proteine zu untersuchen. Der C-Terminus des Coreproteins ist sehr argininreich, wobei die Arginine in 4 Klustern mit flankierenden Ser-Pro- oder Ser-Gln-Paaren organisiert sind (Abb. 17).



**Abb. 17:** Aminosäuresequenz des C-Terminus des Core-Proteins. In der dargestellten Sequenz sind die vier Argininkluster hervorgehoben worden. Sterne markieren jede zehnte Aminosäure, deren Nummerierung sich auf die Sequenz von VALENZUELA et al. (1980) bezieht.

Trypsin spaltet spezifisch die Peptidbindung auf der Carboxyl-Seite von Arginin- und Lysinresten. Es konnte in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden, dass bei der Behandlung von rekombinant in E. coli und Xenopus-Oocyten hergestellten Kapsiden mit Trypsin ein unvollständiger Verdau stattfand (GALLINA et al., 1989; SEIFER & STANDRING, 1994). Durch Inkubation reifer und unreifer Kapside mit Trypsin sollte festgestellt werden, ob Unterschiede in der Oberflächenexposition der C-Termini des Core-Proteins auf den Nukleokapsiden bestehen. Um die in Zellkultur produzierten Nukleokapside detektieren zu können, wurden diese zuvor metabolisch mit 35S-Cystein/Methionin markiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Nukleokapside im Saccharosedichtegradienten, um die Anwesenheit nicht-assemblierter Core-Proteine ausschließen zu können, die aufgrund der fehlenden Partikelstruktur vollständig durch Trypsin verdaut werden würden. Bei Vorliegen der Partikelstruktur hätte Trypsin nur auf die nach außen exponierten C-terminalen Erkennungssequenzen zugriff. Zur Kontrolle der Expression und der Markierungseffektivität wurde in einem Vorversuch eine Schale HuH7-Zellen (Durchmesser 10 cm) mit dem Plasmid pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> transfiziert (3.3.1.2.) und metabolisch markiert (3.9.). Nach Inkubation von 5 Tagen wurde das Zelllysat hergestellt (3.4.3.) und einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation unterzogen (3.6.1.). Anschließend wurde der Gradient in fünf Fraktionen aliquotiert und jede Fraktion mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.). Nach mehreren Waschschritten wurden die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt (3.4.6.) und autoradiografisch dargestellt (3.18.). Als Vergleich wurde das gesamte mit anti-HBc immunpräzipitierte Zelllysat einer transfizierten HuH7-Schale aufgetrennt. Das Ergebnis wurde in Abb. 18 dargestellt.

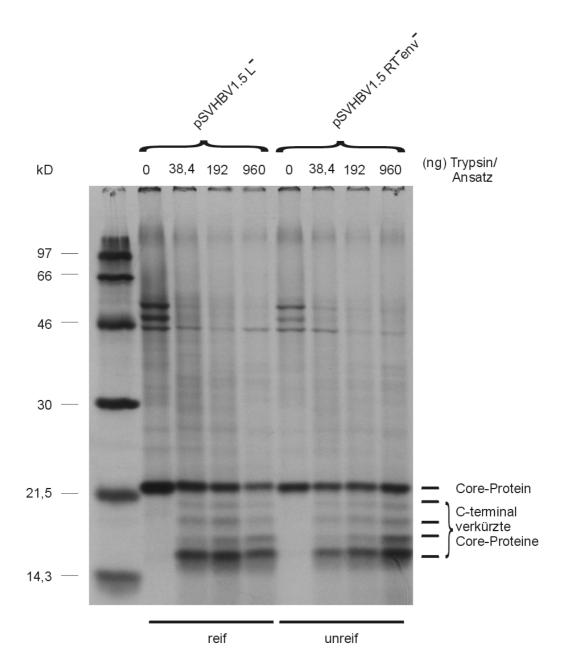
Die Abb. 18 zeigt, dass sich die Core-Partikel in der 3. Fraktion bei einer Saccharose-Konzentration von 30 % (w/w) nachweisen ließen. In den ersten beiden Fraktionen wurde ebenfalls Core-Protein detektiert. Dies war auf nicht Partikel-assoziierte, dimere Proteine zurückzuführen. Daraufhin ist für die folgenden Protease-Verdaue das Zelllysat im Saccharosegradienten sedimentiert und ausschließlich die 3. Fraktion für den Verdau verwendet worden.



**Abb. 18:** Nachweis von <sup>35</sup>S-markiertem Core-Protein.

HuH7-Zellen wurden mit dem Plasmid pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> transient transfiziert und mit <sup>35</sup>S-markiertem Methionin/Cystein metabolisch markiert. Am 5. Tag nach der Transfektion wurde das Zelllysat hergestellt und einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation unterzogen. Der Gradient wurde in 0,8 ml Fraktionen aliquotiert. Die Nukleokapside wurden mit anti-HBc immunpräzipitiert und in einem SDS-Gel aufgetrennt. In der rechten Spur wurde das Gesamtlysat eine transfizierten Schale HuH7-Zellen aufgetragen. Die Abb. zeigt ein Exponat von drei Tagen. M: Proteinstandard "Rainbow [<sup>14</sup>C]-methylierter Protein-Marker".

Je zwei Schalen HuH7-Zellen (10 cm Durchmesser) wurden mit den Expressionsplasmiden pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> (2.4.) bzw. pSVHBV1.5 RTenv<sup>-</sup> (2.4.) transfiziert (3.3.1.2.) und metabolisch markiert (3.9.). Fünf Tage nach der Transfektion wurden die Kapside aus den Zelllysaten präpariert (3.4.3.), im Saccharosedichtegradienten sedimentiert (3.6.1.), aliquotiert und die mittlere Fraktion mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.). Nach mehreren Wachschritten wurde je ein Viertel des Ansatz mit den folgenden Mengen Trypsin verdaut: 0 ng, 38,4 ng, 192 ng und 960 ng (3.12.1.). Anschließend erfolgte ein Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 mM PMSF (Endkonzentration 3,2 mM) und Auftrennen der Proben im SDS-Gel, von dem ein Autoradiogramm (3.18.) angefertigt wurde (3.4.6.). Abb. 19 zeigte den Verdau reifer und unreifer Nukleokapside mit Trypsin.



**Abb. 19:** Trypsin-Verdau reifer und unreifer Nukleokapside. HuH7-Zellen wurden mit den Plasmiden pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> und pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> transfiziert und metabolisch mit <sup>35</sup>S-Cystein/Methionin markiert. Am 5. Tag nach der Transfektion wurde das Zelllysat hergestellt und einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation unterzogen. Der Gradient wurde in 0,8 ml Fraktionen aliquotiert. Die Nukleokapside wurden aus jeweils der 3. Fraktion mit anti-HBc immunpräzipitiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den angegebenen Mengen Trypsin. Die Abb. zeigt ein Exponat von einer Woche. M: Proteinstandard "Rainbow [<sup>14</sup>C]-methylierter Protein-Marker".

Die Abbildung des Autoradiogramms zeigte, dass sowohl reife als auch unreife Nukleokapside nach Inkubation mit Trypsin partiell verdaut wurden. Das Verhältnis vollständiger Core-Proteine zu C-terminal verkürzten Core-Proteinen betrug ca. 1:1 und unterschied sich bei beiden Partikelpräparationen nicht. Es wurde beobachtet, dass geringe Mengen Trypsin von 38,4 ng ausreichen, um einen unvollständigen Verdau der

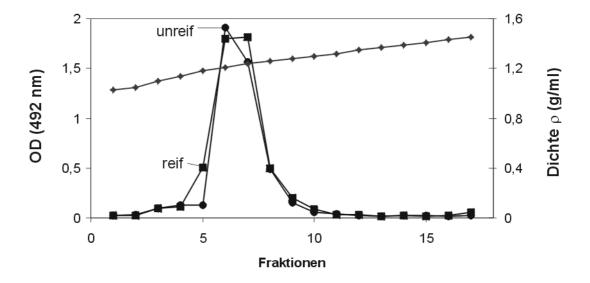
Core-Proteine zu erzeugen. Die Inkubation mit größeren Mengen Trypsin veränderte das Muster des Proteaseverdaus nicht. Auch bei Einsatz höherer Konzentrationen Trypsin (9,6 µg/Ansatz) wurde kein vollständiger Verdau beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die untere Bande mit einer Größe von 15 kD entsprach wahrscheinlich den N-terminalen 150 Aminosäuren des Core-Proteins. Das zeigte, dass die Partikelstruktur erhalten blieb, da der N-terminale Bereich der Core-Proteine, der die Partikelbildung ermöglichte, nicht angegriffen wurde. Die zwischen dem unverdauten Core-Protein und dem C-terminal verkürzten Core-Protein liegenden schwächeren Banden resultierten wahrscheinlich aus dem Verdau innerhalb der Argininkluster. Dabei entstanden größere Mengen an Proteinen, die sich in ihrer Größe nur um maximal 3 Aminosäuren unterschieden und zur Bildung distinkter Banden führten. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass kein Unterschied zwischen DNA-haltigen und RNA-haltigen Nukleokapsiden bei Behandlung mit der Protease Trypsin bestand. Es kam auch beim Einsatz größerer Mengen Trypsin nicht zum vollständigen Verdau, was darauf hindeutete, dass ein Teil der C-Termini der Core-Proteine im Inneren der Partikel vor dem Protease-Verdau geschützt und ein Teil auf der Oberfläche der Nukleokapside lokalisiert sein musste.

#### 4.1.5. Verdau von Nukleokapsiden mit Goldpartikel-gekoppeltem Trypsin

Möglicherweise kam es bei der Inkubation der Nukleokapside mit Trypsin zur Destabilisierung der Partikelstruktur, so dass auch innen gelegene C-Termini für die Protease Trypsin zugänglich waren und deshalb keine Unterschiede bei der Oberflächenexposition der C-Termini der Core-Proteine festgestellt wurden. Durch Verwendung von an 40 nm Goldpartikeln gekoppeltem Trypsin (Au-Trypsin) sollte dieser Aspekt ausgeschlossen werden können. Aufgrund der Goldpartikel sollte das Trypsin nicht in der Lage sein, durch die Poren in das Innere der Nukleokapside einzudringen (PD Dr. M. Kann, pers. Mitteilung). Eine weitere Modifikation der Protease-Behandlung stellte die Auftrennung der Partikel im Nycodenzgradienten (Röntgenkontrastmittel) dar, da sie hier stabiler sein sollten (PD Dr. M. Kann; pers. Mitteilung).

Dazu wurde in einem Vorversuch die Dichte bestimmt, bei der die Corepartikel im Nycodenzgradienten sedimentierten. Je eine Schale HuH7-Zellen wurde mit den Plasmiden pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> und pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> transfiziert (3.3.1.2.) und mit <sup>35</sup>S-Cystein/Methionin metabolisch markiert (3.9.). Nach Inkubation von 5 Tagen wurde das Zelllysat hergestellt (3.4.3.) und der Nycodenzdichtegradientenzentrifugation unterzogen (3.6.2.). Der Gradient wurde in 0,6 ml Fraktionen aliquotiert. Um zu bestimmen, welche Fraktionen des Nycodenzgradienten Core-Partikel enthielten, wurde ein HBcAg-ELISA durchgeführt (3.4.5.). Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen

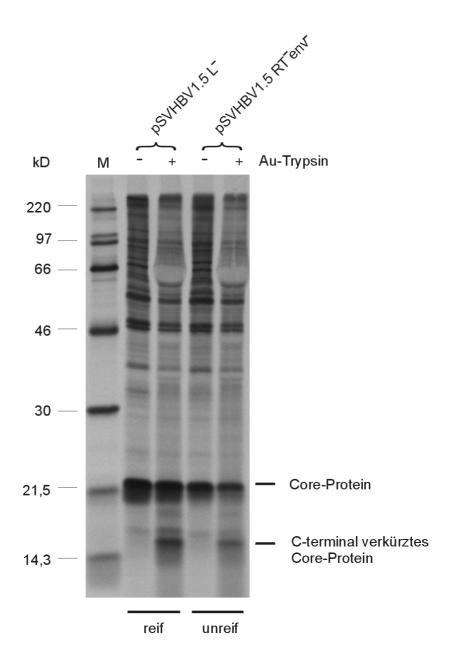
refraktometrisch analysiert und ihre Dichte berechnet (3.6.2.). Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.



**Abb. 20:** Auftrennung der Core-Partikel im Nycodenzgradienten. Mit den Expressionsvektoren pSVHBV1,5 L (reif; ■) und pSVHBV1,5 RT env (unreif; ●) transfizierte HuH7-Zellen wurden nach 5 Tagen lysiert. Die im klaren Überstand enthaltenen Core-Partikel wurden auf einen Nycodenzgradienten geschichtet und zentrifugiert. Der Gradient wurde anschließend fraktioniert und die Dichte der Fraktionen bestimmt (♦). Danach wurden die Fraktionen im HBcAg-spezifischen ELISA analysiert.

Die Abbildung 20 zeigt, dass sich die Core-Partikel in den Fraktionen 5-8 nachweisen ließen, wobei der Hauptanteil bei einer Dichte von 1,2 g/ml lag.

Für den Trypsin-Verdau wurde je eine Schale HuH7-Zellen mit den Plasmiden pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> und pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> transfiziert (3.3.1.2.) und metabolisch mit <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein markiert (3.9.). Nach 5 Tagen wurde das Zelllysat hergestellt (3.4.3.) und die im Lysat enthaltenen Core-Partikel im Nycodenzgradienten aufgetrennt (3.6.2.). Der Gradient wurde in 0,6 ml Fraktionen aliquotiert. Die Fraktionen 6 und 7 wurden vereinigt und mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Ansätze halbiert und eine Hälfte mit Au-Trypsin inkubiert (3.12.2.). Danach wurden die behandelten Proben im SDS-Gel aufgetrennt (3.4.6.), von dem anschließend ein Autoradiogramm (3.18.) angefertigt wurde (Abb. 21).



**Abb. 21:** Au-Trypsin-Verdau reifer und unreifer Nukleokapside. HuH7-Zellen wurden mit den Plasmiden pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> und pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> transfiziert und metabolisch mit <sup>35</sup>S-Cystein/Methionin markiert. Am 5. Tag nach der Transfektion wurde das Zelllysat hergestellt und einer Nycodenzdichtegradientenzentrifugation unterzogen. Der Gradient wurde in 0,6 ml-Fraktionen aliquotiert. Die Nukleokapside wurden aus jeweils der 6. und 7. Fraktion mit anti-HBc immunpräzipitiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit an Goldpartikel-gekoppeltem Trypsin. Die Abb. zeigt ein Exponat von 3 Tagen. M: Proteinstandard "Rainbow [<sup>14</sup>C]-methylierter Protein-Marker".

Die Abbildung 21 zeigt, dass beim Verdau mit Au-Trypsin die beiden Partikelstrukturen ebenfalls in gleichem Maße partiell verdaut wurden. Deutlich sichtbar ist die Bande des Cterminal verkürzten Core-Proteins bei 15 kD. Die Banden, die zwischen dem unverdauten Core-Protein und dem Cterminal verkürzten Core-Protein liegen, sind im Vergleich zu den Trypsin-Verdauen (4.1.4.) nicht so deutlich zu erkennen. Das Verhältnis zwischen vollständigem Core-Protein und verkürztem Core-Protein beträgt ca. 1:1, was ebenfalls

bei den Trypsin-Verdauen (4.1.4.) beobachtet werden konnte. Das bedeutet, dass sowohl bei den reifen als auch bei den unreifen Partikeln ein Teil der C-Termini auf der Oberfläche der Nukleokapside zugänglich ist, ein anderer Teil im Inneren geschützt ist. Es konnte mit den durchgeführten Experimenten kein Unterschied bei der Lokalisation der C-Termini DNA- und RNA-haltiger Partikel demonstriert werden. Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass der C-Terminus das Umhüllungssignal darstellt. Denkbar ist, dass über die außen lokalisierten C-Termini der Kapside eine Interaktion mit der ER-Membran erfolgt, aber ein weiterer Faktor für die Umhüllung nötig ist, der ausschließlich DNA-haltige Nukleokapside erkennt und deren Umhüllung initiiert.

# 4.2. Untersuchung der Virionbildung nach Mutation der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins

Das Nukleokapsid ist an mehreren Schritten im Vermehrungszyklus des Hepatitis B Virus beteiligt, wie z.B. der viralen DNA-Synthese und der Interaktion mit den Hüllproteinen des Virus. Diese Ereignisse erfolgen unter Mitwirkung des C-Terminus der Core-Proteine (NASSAL, 1992a), der, wie die vorausgegangen Untersuchungen zeigten, sowohl im Inneren als auch auf der Oberfläche der Core-Partikel lokalisiert ist. Die C-terminale Aminosäure der Core-Proteine, ein Cysteinrest (in Position 185 beim Subtyp *adw2*; VALENZUELA et al., 1980), ist bei allen Orthohepadnaviren konserviert und könnte bei der Virusmorphogenese von Bedeutung sein.

Cysteine sind an der Bildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken beteiligt und spielen damit eine große Rolle bei der Entstehung von Proteintertiär- und quartärstrukturen. Es ist gezeigt worden, dass Deletion oder Austausch der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins die Oberflächenexposition der Protaminregion in *Xenopus*-Oocyten-exprimierten Kapsiden erhöht (SEIFER & STANDRING, 1994). Diese Aminosäure ist möglicherweise ein notwendiger Bestandteil für die Umhüllung der Kapside an der Hüllprotein-tragenden Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Es ist denkbar, dass die schwefefelhaltige Seitenkette des Cysteins über Disulfidbrückenbildung eine Interaktion mit hydrophoben Teilen der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und den darin inserierten Hüllproteinen stabilisiert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die hydrophobe, hochreaktive Sulfhydrylgruppe mit Membranbestandteilen reagiert und auf diesem Weg die Umhüllung des Kapsids initiiert.

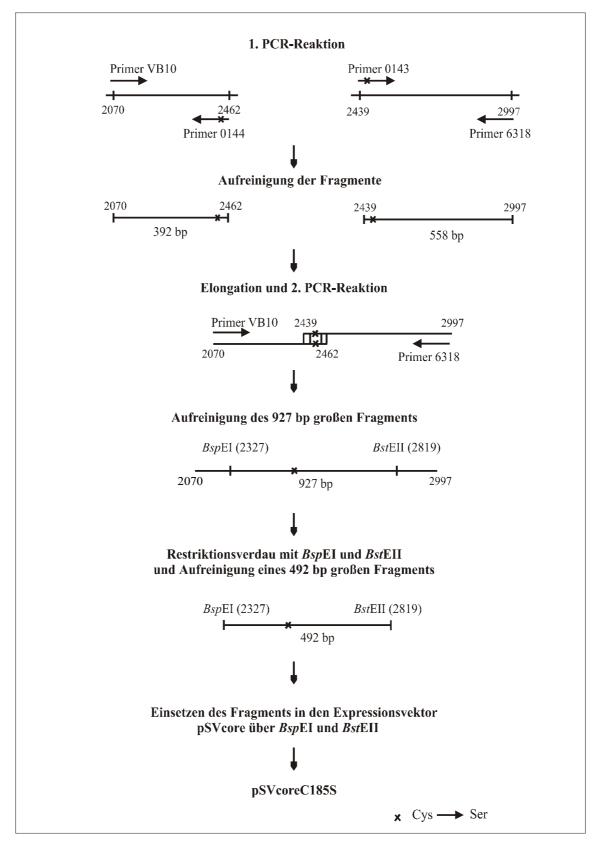
Andererseits könnte das C-terminale Cystein bei der Nukleinsäurebindung und der viralen DNA-Synthese eine Rolle spielen. Womöglich vermittelt das Cystein die sterische

Anordnung der einzelnen Komponenten zueinander und festigt deren Struktur innerhalb des Nukleokapsids.

Durch die Mutation des Cysteinrestes zu einem hydrophilen Serinrest sollte die Frage geklärt werden, ob die C-terminale Aminosäure einen Einfluss auf die DNA-Synthese und Umhüllung der Kapside hatte. Es sollte untersucht werden, ob Virionen sezerniert werden und wie die DNA in den Virionen vorlag.

#### 4.2.1. Konstruktion des Plasmids pSVcoreC185S

Der Austausch des Cysteinrests zum Serinrest wurde mittels in vitro-Mutagenese durchgeführt (3.2.5.). Es erfolgten Nukleotidaustausche an den Positionen 2452 ( $G\rightarrow C$ ) und 2453 (T→C) des HBV-Genoms. Dadurch wurde das Kodon der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins TGT (Cystein) in TCC (Serin) umgewandelt. Als Expressionsvektor für die zu erzeugende Core-Gen-Mutante diente das pSVcore-Plasmid (2.4.). Die schematische Darstellung der Herstellung des Plasmids pSVcoreC185S wird in Abb. 22 dargestellt. Das Plasmid pRVHBV1.0 (2.4.) diente als Matrize für die erste Runde der PCR, wobei jeweils ein die Mutation enthaltendes Oligonukleotid mit einem jeweiligen flankierenden Oligonukleotid eingesetzt wurde. Die amplifizierten Fragmente waren 392 bp und 558 bp groß und enthielten eine überlappende Sequenz an ihrem Ende, die die Mutation aufwies. Nach der Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel (3.2.7.) dienten sie als DNA-Template mit den flankierenden Oligonukleotiden für die zweite PCR-Runde. Nach der zweiten PCR wurde ein 927 bp großes Fragment amplifiziert und mit den Primern VB25, #0142 und #4881 (2.6.) seguenziert (3.2.13.1.). Nach der Aufreinigung (3.2.7.) wurde ein 492 bp großer DNA-Abschnitt mit den Restriktionsschnittstellen BspEI und BstEII herausgeschnitten (3.2.3.) und gereinigt (3.2.7.). Anschließend wurde das DNA-Fragment in das zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelte Expressionsplasmid pSVcore eingesetzt (3.2.8.). Die Mutationen wurde durch Sequenzierung verifiziert (3.2.13.1.).



**Abb. 22:** Schematische Darstellung der Herstellung der Cys→Ser-Mutation im Core-Gen durch *in vitro*-Mutagenese mittels überlappender PCR. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die HBV-Sequenz des Subtyps *adw2* (VALENZUELA et al., 1980).

#### 4.2.2. Einfluss der Cystein-Substitution auf die Virionbildung

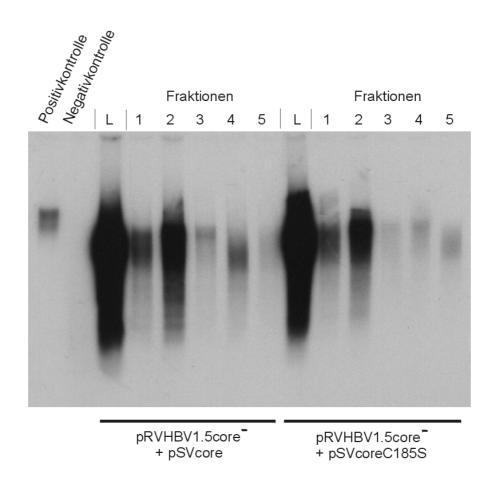
Im folgenden sollte untersucht werden, wie sich die Mutation auf die Virusbildung auswirkte. Das Vorhandensein von intakten Nukleokapsiden in Zelllysat und –medium wurde durch die endogene Polymerasereaktion (EPR, 3.14.) untersucht, in der über den Einbau von radioaktiven Nukleotiden in das HBV-Genom die Aktivität des Polymerase-Proteins nachgewiesen wurde. Dieses Enzym ist nur im Kontext eines intakten Nukleokapsids aktiv.

Dazu wurde die in den eukaroytischen Expressionsvektor eingesetzte Core-Mutante C185S sowie das Wildtyp-Core-Protein in HuH7-Zellen mit dem Plasmid pRVHBV1.5core (2.4.) kotransfiziert. Vom Plasmid pRVHBV1.5core werden, bis auf das Core-Protein, alle Virusproteine exprimiert. Durch eine Punktmutation entstand in der Core-Gensequenz ein Stop-Kodon, das die Expression dieses Proteins verhinderte (KOSCHEL et al., 2000). Das Core-Protein kann *in trans* exprimiert werden und führt zusammen mit den anderen Virusproteinen zur Bildung von Virionen.

HuH7-Zellen einer Kulturschale mit 10 cm Durchmesser wurden mit jeweils 4 µg pRVHBV1.5core und 6 µg pSVcore bzw. pSVcoreC185S kotransfiziert (3.3.1.2.). Sezernierte subvirale HBsAg-Partikel konnten im ELISA-Test (3.3.1.4.) Konzentrationen von über 75 ng/ml nachgewiesen werden. Am fünften Tag der Transfektion wurden die Zellen geerntet und das Zelllysat hergestellt (3.4.3.). Aus dem Lysat wurden die Nukleokapside mit anti-HBc-Antikörper immunpräzipitiert (3.4.4.). Die Virionen aus dem Zellüberstand wurden zur Einengung und gleichzeitigen Abtrennung nackter Nukleokapside einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (3.6.3.) unterzogen. Nach der Teilung des Gradienten in fünf Fraktionen wurde deren Dichte bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden in die Immunpräzipitation mit anti-HBs eingesetzt (3.4.4.). Vorhandene Kapside bzw. Virionen in Zelllysaten und CsCl-Gradientenfraktionen wurden durch EPR nachgewiesen (3.14.). Die Ergebnisse des Versuchs wurden in Abb. 23 dargestellt.

Die Core-Mutante C185S war weiterhin in der Lage, virale DNA zu synthetisieren und Virionen in den Zellüberstand zu sezernieren. Die im Lysat nachgewiesene Menge intrazellulär gebildeter Nukleokapside entsprach etwa der des Wildtyps. In der Abb. 23 zeigt sich, dass der Hauptanteil der in das Medium sezernierten Viren jeweils in der 2. Fraktion mit einer Dichte von 1,258 g/ml lag und mengenmäßig kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bestand. Die nackten Kapside, die von den HuH7-Zellen ebenfalls im Zellüberstand freigesetzt werden, befinden sich beim Wildtyp in der 4. Fraktion mit einer Dichte von 1,350 g/ml. Bei der Mutante dagegen konnten sie in der 4. und 5. Fraktion (Dichte 1,349 bzw. 1,386 g/ml) nachgewiesen werden. Die

charakteristische Dichte der Virionen ist 1,23 g/ml, die der nackten Nukleokapside beträgt 1,36 g/ml (GERELSAIKHAN et al., 1996). Worauf die Unterschiede der Lokalisation der nackten Kapside bei der Mutante und dem Wildtyp zurückzuführen sind, ist unklar. Die Dichtebestimmung der einzelnen Fraktionen ergab geringe Unterschiede zwischen den beiden Gradienten, was sich möglicherweise auf die Anreicherung der Kapside auswirkte. Bei der Core-Mutante C185S konnte nur ungefähr die Hälfte an nackten Nukleokapsiden im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Bei der Bildung intrazellulärer Nukleokapside und der Virussekretion sind keine Unterschiede beobachtet wurden. Folglich ist das Cystein an der Position 185 des Core-Proteins nicht essentiell für die Virusmorphogenese.

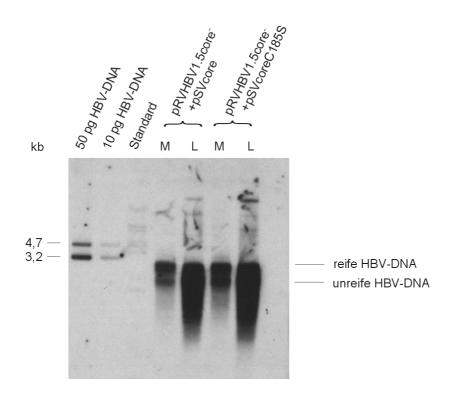


**Abb. 23:** Endogener Polymerase Nachweis in Zelllysaten (L) und Zellkulturüberständen (Fraktionen 1-5). Für die linke Spur wurde 1 μl eines humanen HBV-haltigen Serums (ca. 10<sup>6</sup> Virionen) ohne Immunpräzipitation als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle (2. Spur) wurden HuH7-Zellen nur mit pRVHBV1.5core transfiziert und das Zelllysat in die EPR eingesetzt. Das Core HBV-Konstrukt pRVHBV1.5core wurde mit pSVcore bzw. pSVcoreC185S kotransfiziert. Die HuH7-Zellen wurden am 5. Tag geerntet und die Medien wurden einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Der Gradient wurde in 2 ml Fraktionen portioniert, deren Dichte im Refraktometer bestimmt wurde (pSVcore + pRVHBV1.5core: 1. Fraktion 1,219 g/ml, 2. Fraktion 1,258 g/ml, 3. Fraktion 1,309 g/ml, 4. Fraktion 1,350 g/ml, 5. Fraktion 1,305 g/ml, 4. Fraktion 1,349 g/ml, 5. Fraktion 1,386 g/ml). Vorhandene Kapside und Virionen wurden immunpräzipitiert und anschließend in die EPR eingesetzt. Das Autoradiogramm wurde 18 h exponiert.

#### 4.2.3. Einfluss der Substitution auf den Reifungsgrad der viralen DNA

In der endogenen Polymerasereaktion können funktionsfähige Nukleokapside und Virionen nachgewiesen werden, es kann aber keine Aussage über den Reifungsgrad der darin befindlichen viralen DNA gemacht werden. Mit Hilfe der Southern Blot-Analyse sollte nun untersucht werden, in welchem Reifezustand die DNA in Nukleokapsiden und Virionen der Core-Mutante C185S vorliegt.

Dazu wurden die Zellen erneut wie unter 4.2.2. beschrieben transfiziert und geerntet. Nukleokapside wurden aus dem Zelllysat mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.). Da gezeigt wurde, dass Virionen nach Dichtegradientenzentrifugation des Zellkultur-überstands in der 2. Fraktion lokalisiert waren, wurde ausschließlich diese Fraktion mit anti-HBs immunpräzipitiert (3.4.4.). Anschließend wurde virale DNA isoliert (3.15.) und durch Southern Blot (3.5.) analysiert (Abb. 24).



**Abb. 24:** Southern Blot-Analyse der viralen DNA aus intrazellulären Nukleokapsiden (L) und sezernierten Virionen (M).

HuH7-Zellen wurden nach Kotransfektion mit den Plasmiden pRVHBV1.5core und pSVcore bzw. pSVcoreC185S am 5. Tag geerntet. Das Medium wurde einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Es wurden jeweils die 2. Fraktionen des Gradienten weiter verwendet (Dichte: pSVcore + pRVHBV1.5core 1,2599 g/ml, pSVcoreC185S + pRVHBV1.5core 1,2518 g/ml). Virionen und Nukleokapside wurden aus den Gradientenfraktionen (M) bzw. Lysaten (L) durch Immunpräzipitation mit anti-HBs bzw. anti-HBc konzentriert. Die DNA wurde nach dem Blotten durch Chemilumineszenz-Detektion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde in den ersten beiden Spuren das mit *Eco*RV geschnittene Plasmid pRVHBV1.5 WT mit den Konzentrationen von 50 bzw. 10 pg Plasmid-DNA/Spur aufgetragen. In Spur 3 wurde λ-*Bst*EII-Standard aufgetragen. Die Abb. zeigt ein Exponat von 4 h.

Die aus dem Lysat isolierten Nukleokapside vom Wildtyp und der Mutante C185S enthielten alle Formen der replikativen Intermediate. Neben unreifer ssDNA und reifer partiell dsDNA konnten auch die entstehenden Zwischenprodukte anhand des "Schmiers" unterhalb der unreifen HBV-DNA nachgewiesen werden. Quantitativ war der größte Anteil der nachgewiesenen DNA unreife HBV-DNA, deren Signal das der partiell dsDNA überlagerte.

Die in das Medium sezernierten Virionen enthielten sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante hauptsächlich reife partiell dsDNA, wobei das Mengenverhältnis von reifer zu unreifer DNA ca. 4:1 betrug.

Es wurden beim Reifungsgrad der viralen DNA zwischen Wildtyp und Mutante C185S keine phänotypischen Unterschiede beobachtet. Dies bedeutete, dass die C-terminale Aminosäure Cystein keinen Einfluss auf die Umhüllung der Nukleokapside an der ER-Membran und auf die virale DNA-Synthese im Inneren der Kapside hatte.

# 4.3. Bindung rekombinanter Core-Partikel an Peptide

1997 publizierten POISSON et al. Ergebnisse einer Bindungsstudie, die eine Interaktion zwischen HBV-Core-Partikeln und Peptiden, die zu Bereichen des L-Proteins identisch waren, zeigte. Die verwendeten Peptidsequenzen und Kapside entsprachen dem ayw-Subtyp (GALIBERT et al., 1979). Die Autoren isolierten Core-Partikel aus humanem infizierten Lebergewebe, um möglichst authentische Kapside in ausreichender Menge zu erhalten. Sie zeigten durch ihre Untersuchungen, dass durch Vorinkubation mit zwei spezifischen Peptiden Core-Partikel in einem HBcAg-ELISA nicht mehr nachgewiesen werden konnten, da die Epitope durch eine Bindung der Peptide maskiert worden waren. Die Peptidsequenzen entsprachen zum einen den AS 96-116 der PräS-Region und zum anderen den AS 56-80 der S-Domäne. Mittlerweile wurde gezeigt, dass auch rekombinante Kapside aus E. coli die Bindung vermitteln (HOURIOUX et al., 2000). Desweiteren konnte in Zellkulturexperimenten mit dem Subtyp adw gezeigt werden, dass der Austausch der Aminosäuren 98 bis 124 gegen andere willkürlich gewählte Aminosäuren die Bildung von Viruspartikeln inhibierten (BRUSS, 1997). In dieser Region führte zudem der Austausch von je zwei benachbarten Aminosäuren zu einer Blockade in der Umhüllung reifer Core-Partikel. Dieser Bereich der PräS-Region, der auch in den oben vorgestellten Bindungsstudien eine Interaktion mit Partikeln zeigte, sollte demnach eine mögliche Interaktionsstelle zwischen Nukleokapsid und L-Protein darstellen.

Es sollte nun die Bindung der Peptide an Core-Mutanten mit verminderter und blockierter Virionbildung untersucht werden. Interessant dabei war zu sehen, ob einige der Mutanten

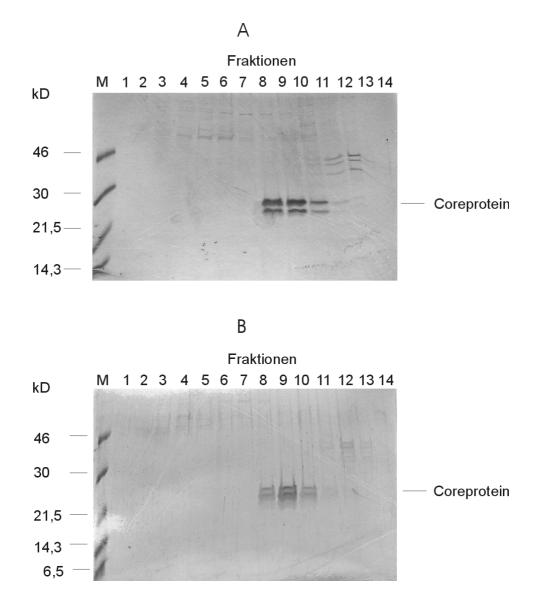
ebenfalls eine verringerte Bindung an die relevanten Peptide aufgrund der veränderten Partikelstruktur zeigten. Die Bindungsversuche sollten eine Möglichkeit darstellen, eine Region des Core-Partikels zu kartieren, die mit den Hüllproteinen in Kontakt tritt.

Da die aus *E. coli*-Bakterien aufgereinigten Core-Partikel ein identisches Bindungsverhalten wie Core-Partikel aus infizierter Leber zeigten, sollten die Mutanten in *E. coli* exprimiert und nach anschließender Reinigung in einem ELISA-Verfahren zur Bindung an die Peptide eingesetzt werden.

# 4.3.1. Expression der Core-Partikel in *E. coli* und deren Aufreinigung

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden Core-Mutanten hergestellt, die in der Lage sind, funktionsfähige Nukleokapside zu bilden, aber in der Virussekretion gestört sind. Zwei Mutanten zeigten eine partielle (T33-S35, P50-E46) und drei Mutanten eine vollständige Hemmung der Nukleokapsidumhüllung (A11-V13, R133-P135, S141-L140) (KOSCHEL et al., 2000). Desweiteren existiert eine Mutante (A11-G10), deren Nukleokapsid- und Virusbildung deutlich unter Wildtypniveau lag, das Verhältnis cytoplasmatisch gebildeter Nukleokapside zu sezernierten Virionen aber ähnlich zum Wildtyp war. Die zu exprimierenden Core-Mutanten und das Wildtyp-Core-Protein lagen im Expressionsvektor pMKVIII (2.4.) vor, was eine durch IPTG induzierbare Expression in *E. coli* ermöglichte. Der Escherichia coli-Stamm JW1 (2.1.) wurde mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert (3.1.4.). Die Anzucht und Induktion der Klone erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben. Zur Überprüfung der Expression wurde jeweils 1 ml der induzierten Kultur geerntet, in PBS suspendiert, beschallt (20 Impulse, 30 % "output level", Branson-Sonifier-250) und in einem HBc-ELISA (3.4.5.) eingesetzt. Wurde Core-Protein nachgewiesen, erfolgte die Aufreinigung und Anreicherung der Core-Partikel (3.4.2.). Im Saccharose-Gradienten wurden die Core-Partikel nach ihrer Dichte angereichert und von unassemblierten Core-Protein-Dimeren sowie löslichen E. coli-Proteinen geringerer Dichte getrennt. Die Core-Partikel-haltigen Fraktionen wurden mittels HBc-ELISA (3.4.5.) identifiziert, anschließend vereinigt, dialysiert und konzentriert. Es erfolgte eine weitere Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Dieser Gradient wurde in 14 Fraktionen aliquotiert. Jeweils 10 µl dieser Fraktionen wurden im 15 %-igen Polyacrylamidgel (3.4.6.) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des Core-Proteins erfolgte anhand einer Coomassie-Färbung (3.4.7.; Abb. 25) und zusätzlich mittels HBc-ELISA (3.4.5.). Die Core-Partikel befanden sich bei einer Saccharosekonzentration von 27 % (w/w) bis 30 % (w/w). Unterhalb der Core-Protein-Bande war eine schwächere Bande zu sehen, die auf ein N-terminal verkürztes Core-Protein zurückzuführen war (PD Dr. H. Köchel, pers.

Mitteilung) Dieses Protein wurde von einem stromabwärts liegenden Startkodon des Core-ORF exprimiert. Dieses Phänomen wurde bereits von HATTON et al. (1992) gezeigt.



**Abb. 25:** Lokalisation der Core-Partikel im Saccharosegradienten. Es wurden 2 ml Core-Protein-haltige Lösung auf einen Saccharosegradienten [10 %/ 20 %/ 30 %/ 40 %/ 50 %/ 60 % (w/w) Saccharose in TNE-Puffer] gegeben. Dieser Gradient wurde nach einer Ultrazentrifugation für 2,5 h bei 30000 upm fraktioniert. Der Nachweis der Core-Partikel erfolgte durch SDS-PAGE (10 µl jeder Fraktion) und Coomassie-Färbung. Beipielhaft ist die Lokalisation der Core-Partikel der Mutante P50-E46 (A) und des Wildtyps (B) dargestellt. M: Proteinstandard "Rainbow marker low".

Die Core-Partikel-haltigen Fraktionen wurden erneut vereinigt und dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration (3.4.12.) bestimmt (Tab. 13).

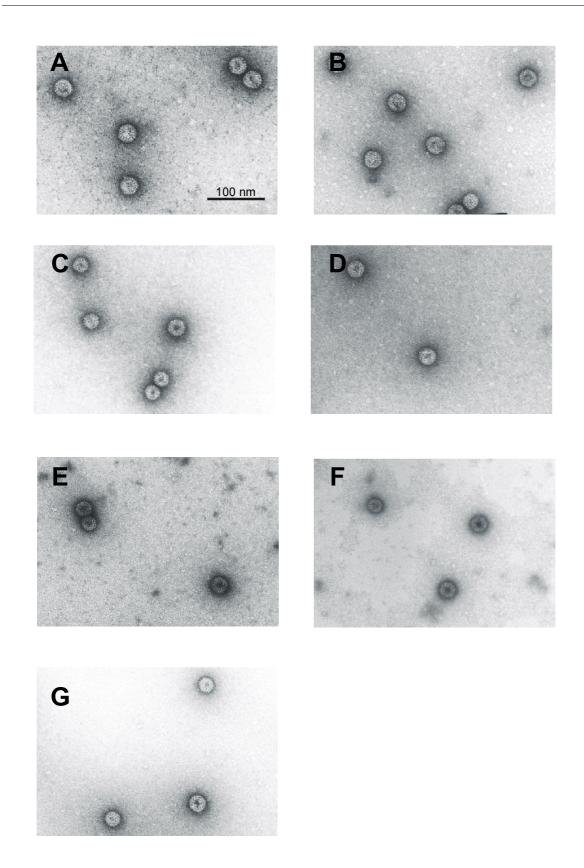
Tab. 13: Proteinkonzentration der aufgereinigten Core-Partikel.

| Mutante   | Proteinkonzentration (µg/ml) |  |
|-----------|------------------------------|--|
| WT        | 62,5                         |  |
| A11-V13   | 62,5                         |  |
| A11-G10   | 50                           |  |
| S141-L140 | 50                           |  |
| R133-P135 | 85                           |  |
| P50-E46   | 32,5                         |  |
| T33-S35   | 45                           |  |

Die präparierten Core-Partikel wurden elektronenmikroskopisch dargestellt (4.3.2.) und in Bindungsansätze eingesetzt.

### 4.3.2. Elektronenmikroskopische Darstellung der Core-Partikel

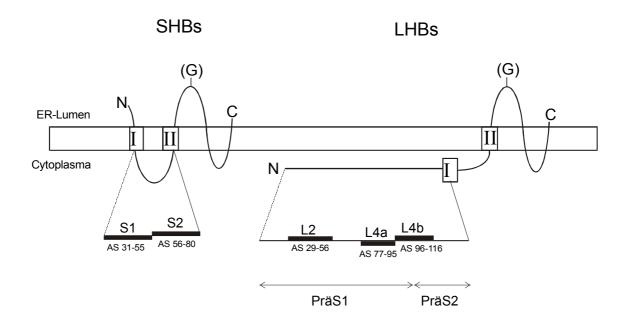
Gereinigte Core-Partikel-Präparationen wurden mit Hilfe der Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop untersucht (3.7.). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. C. Hourioux durchgeführt. So konnten die Reinheit der Präparationen und die Integrität der Partikel überprüft werden. In Abb. 26 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. In allen Proben wurden Core-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 30 nm identifiziert. Neben Partikeln mit gleichmäßig strukturierter Oberfläche waren Partikel zu sehen, die durch Einlagerung des Kontrastmittels ein elektronendichteres Zentrum aufwiesen. Vermutlich handelte es sich hierbei um Partikel, die Nukleinsäuren inkorporiert hatten, da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass in *E. coli* exprimierte Core-Partikel RNA beinhalten (HATTON et al., 1992; BIRNBAUM & NASSAL, 1990; ZLOTNICK et al., 1997). Die elektronenmikroskopische Darstellung der aus Leber isolierten DNA-haltigen Partikel zeigte ebenfalls Partikel, die im Zentrum dunkler gefärbt waren (POISSON et al., 1997). Die in den Abbildungen 26 dargestellten, gleichmäßig kontrastierten Partikel entsprachen somit leeren Core-Partikeln. Möglicherweise handelte es sich bei den stärker kontrastierten Partikeln aber auch um nicht vollständig intakte Core-Partikel, in die Kontrastmittel eindringen konnte. In den Präparationen waren keine aufgebrochenen Partikel oder Verunreinigungen durch Proteine zu erkennen.



**Abb. 26:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen gereinigter Core-Partikel. Gereinigte Core-Partikel wurden mit Hilfe der Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop untersucht. A: Wildtyp, B: A11-V13, C: T33-S35, D: A11-G10, E: S141-L140, F: P50-E46, G: R133-P135.

#### 4.3.3. Untersuchung der in vitro-Bindung

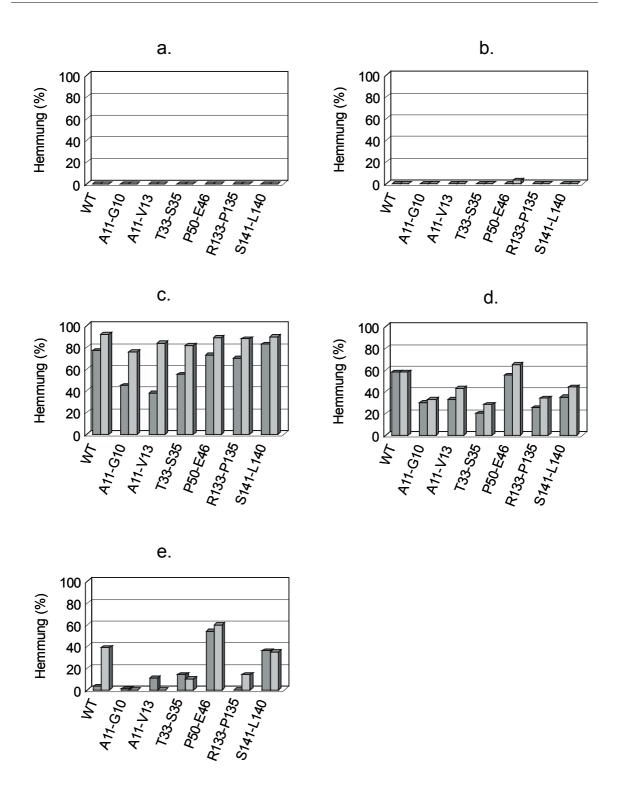
Um das Bindungsverhalten der Core-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Core-Protein zu untersuchen, wurden folgende Peptide (2.8.) verwendet (Abb. 27): Die Peptide S1 (AS 31-55 des S-Bereichs), L2 (AS 29-56 der PräS-Domäne) und L4a (AS 77-95 der PräS-Domäne) wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Interessant für die *in vitro*-Bindung an die Core-Mutanten waren die Peptide S2 (AS 56-80 des S-Bereichs) und L4b (AS 96-116 der PräS-Domäne). Das Peptid L4b umfasst die Region, die eine aufgrund genetischer Untersuchungen für die Virusmorphogenese essentielle Sequenz enthält (BRUSS, 1997).



**Abb. 27:** Schematische Darstellung der eingesetzten Peptide. Die Peptide leiten sich aus der Aminosäuresequenz des S-Bereichs bzw. der PräS-Domäne der Hüllproteine des Subtyps *ayw* ab. Die fakultative Glykosylierungsstelle der Hüllproteine ist durch "(G)" gekennzeichnet. Die Signalsequenzen sind mit I und II bezeichnet. Die Buchstaben C und N kennzeichnen die C- und N-terminalen Enden der Proteine.

Diese Peptide wurden wie unter 3.8. beschrieben mit den aus *E. coli*-aufgereinigten Core-Partikeln inkubiert. In einem kompetitiven ELISA wurde anschließend überprüft, ob die Core-Partikel noch an eine mit HBc-spezifischem Serum (F1451; 2.7.) beschichtete Mikrotiterplatte binden und mit einem entsprechenden POD-markiertem Antikörperkonjugat nachgewiesen werden konnten. Die prozentuale Hemmung der Bindung wurde wie folgt berechnet und ist in Abb. 28 dargestellt:

Hemmung (%) = 100 x ( $OD_{492}$  mit Peptid /  $OD_{492}$  ohne Peptid)



**Abb. 28:** Darstellung der prozentualen Hemmung der Core-Partikel-Bindung. Die Core-Partikel wurden mit folgenden Peptiden vorinkubiert: a. L2, b. S1, c. L4b, d. S2, e. L4a. Die zwei Messwerte wurden in unabhängigen Versuchen ermittelt.

Die als Negativkontrollen eingesetzten Peptide L2 (Abb. 28a.) und S1 (Abb. 28b.) behinderten nach Vorinkubation mit den jeweiligen Core-Partikeln nicht deren Bindung an

das HBc-spezifische Serum auf den Mikrotiterplatten. Dies wurde ebenfalls in vorangegangenen Experimenten beobachtet (HOURIOUX et al., 2000).

Es zeigte sich, dass das Peptid L4b (Abb. 28c) mit allen Core-Partikeln interagierte, da nach Vorinkubation mit diesem Peptid eine deutlich geringere Menge im ELISA nachweisbar war. Die Hemmung der Bindung des HBc-spezifischen Serums erfolgte bei allen Mutanten in annähernd gleicher Höhe wie die der Wildtyp-Core-Partikel mit Ausnahme der Mutanten A11-G10 und A11-V13. Die Bindung dieser Partikel wurde im Vergleich zum Wildtyp in einer Messreihe nur halb so stark inhibiert. Möglicherweise waren diese Messwerte auf Schwankungen des Tests zurückzuführen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Bereich der PräS-Domäne, der dem Peptid L4b entsprach, bei der Interaktion der Hüllproteine mit dem Nukleokapsid eine Rolle spielt. Obwohl eine schwach verminderte Hemmung der Partikelbindung an HBc-spezifisches Serum bei Partikeln mit Mutationen im Bereich der N-terminalen Aminosäuren 10-13 beobachtet wurde, konnte keine klare Aussage darüber getroffen werden, welche Region der Core-Partikel mit dem entsprechenden PräS-Bereich in Wechselwirkung trat.

Auch bei der Bindung der Core-Partikel des Wildtyps und der Mutanten mit dem Peptid S2 konnte eine Interaktion beobachtet werden (Abb. 28d). Eine Bindungshemmung der Core-Partikel des Wildtyps an das HBc-spezifische Serum erfolgte um ca. 50 %. Die Bindung der Mutanten wurde im Vergleich zum Wildtyp mit Ausnahme von P50-E46 nicht so stark behindert. Da keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Mutationen bezüglich der Bindungsaffinitäten zu erkennen war, konnte keine Aussage über eine spezifische Core-Protein-Interaktionsstelle gemacht werden. Die beobachteten Bindungsaffinitäten der unterschiedlichen Peptide wiesen aber darauf hin, das neben der PräS-Domäne auch ein Bereich der S-Region an der Virionmorphogenese beteiligt sein könnte.

Das Protein L4a diente ebenfalls als Negativkontrolle und zeigte auch schon in vorangegangenen Untersuchungen eine geringe Hemmwirkung im Test (POISSON et al., 1997; Abb. 28e). Die Bindung des HBc-spezifischen Antiserums nach Vorinkubation der Core-Partikel-Mutanten P50-E46 und S141-L140 mit Peptid L4a wurde am stärksten behindert. Möglicherweise interagierten diese Mutanten mit Strukturen der Hüllproteine, die nicht essentiell für die Virusmorphogenese sind.

Insgesamt konnte auf diesem Weg keine Region auf den Core-Partikeln nachgewiesen werden, die direkten Kontakt zu den aus den Hüllproteinen abgeleiteten Bereichen aufnahm. Die Peptide stellten nur sehr kurze Bereiche der in der ER-Membran inserierten Hüllproteine dar und waren eventuell anders gefaltet. Möglicherweise tolerierten deshalb die mutierten Core-Partikel die Bindung der Peptide S1 und L4b, waren aber nicht in der Lage, die entsprechenden Strukturen innerhalb der Hüllproteine zu binden.

#### 4.4. Nachweis von cccDNA

Das reife Nukleokapsid kann in der Zelle zwei verschiedenen Wegen folgen. Zum einen kann das Partikel zerfallen und sein offen-zirkuläres DNA-Genom in den Kern entlassen, wo es zur ccc-Form umgewandelt wird. Dadurch wird der Pool der transkriptionell aktiven HBV-Genome im Kern und somit die virale Expression verstärkt. Zum anderen kann das Kapsid an der ER-Membran von den Hüllproteinen umgeben werden und als Bestandteil eines Virions im ER-Lumen erscheinen. Das Virion wird dann über den Sekretionsweg der Zelle sezerniert. Die Regulation, ob das Nukleokapsid den nukleären oder den Exportweg einschlägt, ist Voraussetzung für eine hohe Virusproduktion unter Vermeidung einer Schädigung der Leberzellen. Im DHBV-Modell ist bekannt, dass die Kopienzahl der nukleären ccc-Form des viralen Genoms in der Frühphase der Infektion auf einem intrazellulären Weg zunächst amplifiziert und dann relativ konstant gehalten wird (TUTTLEMANN et a., 1986). Eine Mutante, die in der Expression des großen Hüllproteins blockiert war, zeigte diese Regulation nicht, sondern akkumulierte größere Mengen viraler cccDNA, wodurch die Zellen geschädigt worden sind (LENHOFF et al., 1999). Ein mögliches Modell für die Regulation der intrazellulären Genomkopienzahl wäre, dass ab einer bestimmten Konzentration von Kapsiden im Cytoplasma die neu entstehenden Nukleokapside aus dem Amplifikationskreislauf durch Umhüllung und Sekretion herausgenommen werden. Wie die Entscheidung über die beiden möglichen Transportwege beim humanen HBV getroffen wird, ist bisher ungeklärt. Es sollte nun ein experimentelles in vitro-System etabliert werden, in dem HBV cccDNA und damit der nukleäre Weg des Nukleokapsids detektiert werden kann. Dazu sollte die Bildung von cccDNA nach Transduktion rekombinanter Baculoviren durch ihren direkten Nachweis im Southern Blot, sowie indirekt über den Nachweis des HBe-Antigens untersucht werden.

# 4.4.1. Transduktion des HBV-Genoms mittels rekombinanter Baculoviren des Typs BlueBac4.5-RVHBV1.5

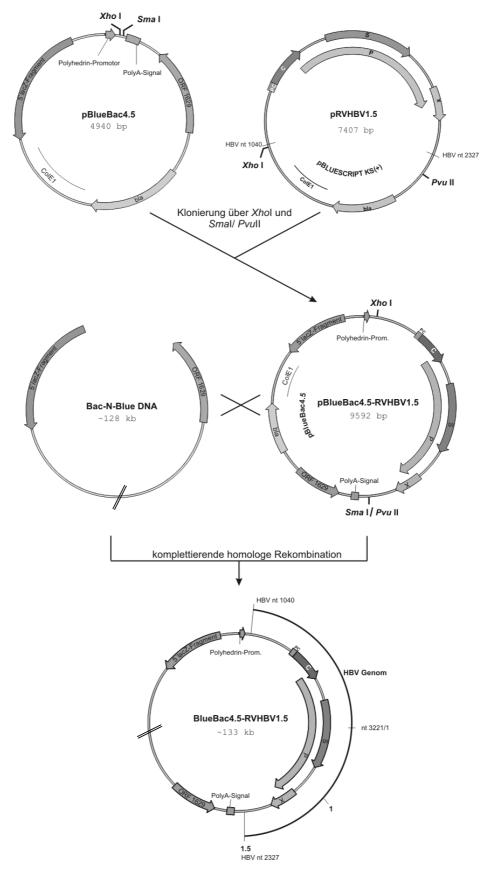
1999 wurde berichtet, dass nach Transduktion von HBV-DNA mittels rekombinanter Baculoviren in HepG2-Zellen die Bildung viraler cccDNA nachweisbar war (DELANEY & ISOM, 1999). Dazu nutzten die Autoren rekombinante Baculoviren, die das HBV-Genom in 1,3-facher Kopie enthielten. Die Baculoviren dienten als Genfähre zur Einschleusung der HBV-DNA in die Hepatomzellen, sie infizierten quasi die Hepatomzellen. Die HBV-Genexpression erfolgte vom endogenen HBV-Promotor. In dieser Arbeit sollten die Ergebnisse reproduziert und anschließend die cccDNA-Synthese einer Mutante, die keine Hüllproteine exprimiert (env<sup>-</sup>), untersucht werden. Als Negativkontrolle diente die RT-env<sup>-</sup>

Mutante, deren Polymeraseaktivität durch eine Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms zerstört ist und die keine Hüllproteine bildet. Die entsprechenden HBV-Genome sollten in 1.5-facher Kopie in das Bavulovirus-Genom inseriert werden. Nach Herstellung rekombinanter Viren sollten anschließend Untersuchungen zur cccDNA-Bildung durchgeführt werden.

## 4.4.1.1. Konstruktion und Charakterisierung von BlueBac4.5-RVHBV1.5-Baculoviren

Das komplette DNA-Genom des Baculovirus *Autographa californica* ist mit 128 kb für eine direkte Insertion fremder Gene zu groß. Deshalb erfolgte die Herstellung der rekombinanten Baculoviren in zwei Schritten. Zuerst wurde das 1,5-fache HBV-Genom aus den entsprechenden pRVHBV1.5-Derivaten in den Transfervektor pBlueBac4.5 (2.4.) zwischen die flankierenden baculoviralen Gensequenzen (5′-Ende des *lacZ*-Gens und ORF1629) hinter den Polyhedrin-Promotor inseriert (Abb. 29). Hierzu wurden die pRVHBV1.5-Derivate mit *Xho*I und *Pvu*II gespalten (3.2.3.), gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.2.4.), das 1,5-fache HBV-Genom eluiert und gereinigt. Anschließend wurden die Fragmente in den mit *Xho*I und *Sma*I gespaltenen Vektor pBlueBac4.5 ligiert (3.2.8.). Die Endonuclease *Sma*I erzeugte wie *Pvu*II glatte DNA-Enden, die ligiert werden konnten. Nach der Transformation von *E. coli* DH5α (2.1.) wurde die Plasmid-DNA isoliert (3.2.9.). Durch Restriktionsanalyse wurden positive Klone identifiziert und mit pBlueBac4.5-RVHBV1.5, pBlueBac4.5-RVHBV1.5 env und pBlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env bezeichnet. Die env bzw. RT -Mutation wurde bei den entsprechenden Klonen durch Sequenzierung mit den Primern #r5 bzw. #6574 überprüft (3.2.13.2.).

Im zweiten Schritt wurden die klonierten HBV-Genome durch homologe Rekombination über die flankierenden DNA-Sequenzen des 5'-lacZ-Fragments und ORF1629 in das Baculovirus-Genom "Bac-N-Blue" (Invitrogen, Groningen) eingeführt. Hierzu wurde die Insektenzelllinie *Spodoptera frugiperda* 9 (SF9), wie unter 3.3.3.1. beschrieben, mit den pBlueBac4.5-RVHBV1.5-Vektoren und der linearisierten Bac-N-Blue DNA, die aufgrund einer Deletion im ORF1629 replikationsinkompetent ist, kotransfiziert. Durch Rekombination wurde die Deletion im ORF1629 des verwendeten Baculovirus-Genom sowie das *lacZ*-Gen komplettiert. Zur Isolierung einzelner rekombinanter Baculoviren wurde ein *Plaque-assay* (3.3.3.4.) durchgeführt. Die mit rekombinanten Baculoviren infizierten Zellen waren wegen des funktionellen *lacZ*-Genprodukts anhand der blauen Farbe der Virusplaques zu erkennen. Zur Vermehrung einzelner Virusklone wurden 1.5 x 10<sup>6</sup> SF9-Zellen mit ausgestanzten Virusplaques in 35 mm Kulturschalen infiziert.



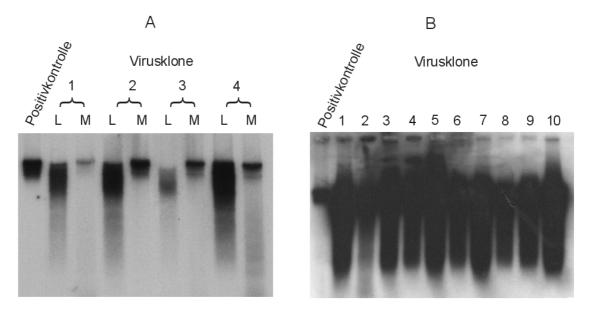
**Abb. 29:** Konstruktion der rekombinanten Baculoviren des Typs BlueBac4.5-RVHBV1.5. Legende siehe folgende Seite.

Legende zur Abb. 29.

Die 1,5-fache Kopie des HBV-Genoms wurde mit den Endonukleasen *Xh*ol und *Pvu*II aus den entsprechenden pRVHBV1.5-Derivaten herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pBlueBac4.5 eingesetzt. Die erzeugten Plasmide wurden hier als pBlueBac4.5-RVHBV1.5 zusammengefasst. Durch komplettierende homologe Rekombination mit replikationsinkompetenter Bac-N-Blue DNA entstanden die unter BlueBac4.5-RVHBV1.5 zusammengefassten rekombinanten Baculovirusgenome. bla: Gen für die β-Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, PolyA-Signal: Polyadenylierungssignal, ORF1629: den Polyhedrin-Promotor flankierender offener Leserahmen des Baculovirus, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, PC: Leserahmen des Präcore-Bereichs des HBV, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV, P: Leserahmen der Polymerase des HBV.

Der Nachweis der rekombinanten Baculoviren erfolgte durch Inkubation je einer Schale HepG2-Zellen (10 cm Durchmesser) mit 1 ml Baculovirusüberstand. Nach 5 Tagen Inkubation der Zellen wurden bei aus dem Wildtyp-Genom abgeleiteten Virusklonen die HBsAg- und HBeAg-Konzentration (3.3.1.4.) bestimmt, sowie das Vorhandensein von intakten Nukleokapsiden und Virionen im Zelllysat bzw. Medium durch die EPR (3.14.) untersucht.

Zellen der HBV Wildtyp-Infektionsvariante konnte HBe-Bei und HBsAg Zellkulturmedium nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Desweiteren wurde nach Inkubation der Zellen mit den rekombinanten Baculoviren BlueBac4.5-RVHBV1.5 Virionen ins Medium sezerniert (Abb. 30A). Baculoviren, die aus dem Hüllprotein-negativen Genom (env) abgeleitet waren, wurden durch Bestimmung von HBeAg (3.3.1.4.) und Nachweis von funktionsfähigen Nukleokapsiden im Zelllysat mittels EPR (3.14.) identifiziert. Auch hier sezernierten die Zellen HBeAg (Daten nicht gezeigt) und es erfolgte die Synthese von intakten Nukleokapsiden im Zelllysat (Abb. 30B). Viren der RT env - Mutante wurden durch Bestimmung von HBeAg (3.3.1.4.) im Zellkulturüberstand und HBcAg-ELISA im Zelllysat (3.4.5.) analysiert (Daten nicht gezeigt).



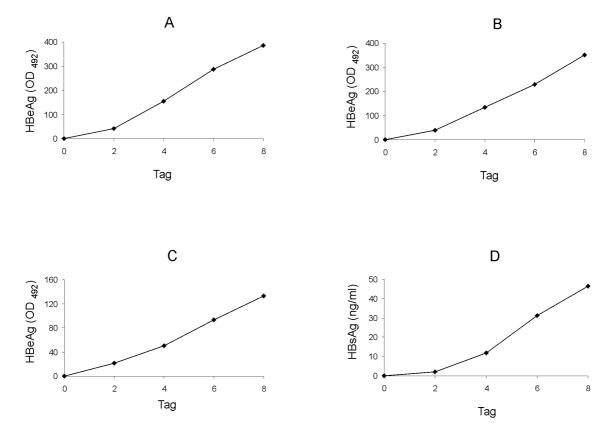
**Abb. 30:** Nachweis der Endogenen Polymerase nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren. Legende siehe folgende Seite.

Legende zur Abb. 30.

In jeweils der 1. Spur ist 1 µl eines humanen HBV-haltigen Serums (ca. 10<sup>6</sup> Virionen) ohne Immunpräzipitation als Positivkontrolle eingesetzt worden. HepG2-Zellen wurden mit Baculoviren des Typs BlueBac4.5-RVHBV1.5 (A) und Baculoviren des Typs BlueBac4.5-RVHBV1.5 env⁻ (B) eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Am 5. Tag wurden die Zellen geerntet. Vorhandene Kapside und Virionen wurden mit anti-HBc aus dem Zelllysat (L) und anti-HBs aus dem Zellkulturüberstand (M) immunpräzipitiert und danach in die EPR eingesetzt. In (B) wurden ausschließlich aus dem Zelllysat immunpräzipitierte Nukleokapside in die EPR eingesetzt. Die Autoradiogramme wurden 18 h exponiert.

Jeweils einer der auf diese Weise isolierten Virusklone wurde erneut im *Plaques-assay* (3.3.3.4.) aufgereinigt und anschließend mittels HBs- und HBe-Antigenbestimmung sowie EPR verifiziert. Insgesamt konnten auf diesem Weg rekombinante Baculoviren isoliert werden, die nach Inkubation mit HepG2-Zellen je nach inseriertem HBV-Genom die entsprechenden Virusproteine, Nukleokapside bzw. Virionen bildeten. Die Viren wurden mit BlueBac4.5-RVHBV1.5, BlueBac4.5-RVHBV1.5 env und BlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env bezeichnet.

Zur weiteren Charakterisierung der Baculovirus-Infektionen wurden die HBeAg-Konzentration und im Fall von BlueBac4.5-RVHBV1.5 zusätzlich Konzentration nach Inkubation mit hochtitrigen Baculovirusstocks bestimmt. Dazu wurden die Baculoviren in größerem Maßstab hergestellt (3.3.3.1.) und auf ein kleines Volumen konzentriert (3.3.3.3.). Anschließend erfolgte die Titration der Virusstocks (3.3.3.4.). Die Infektion je einer Schale HepG2-Zellen (6 cm Durchmesser) erfolgte mit einer MOI von 50. Am 4. Tag nach Infektion erfolgte die Superinfektion der Zellen ebenfalls mit einer MOI von 50 (3.3.1.3.). An den Tagen 2 und 6 nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versehen. Es wurden jeweils am Tage 2, 4, 6 und 8 nach der Infektion die Konzentration von HBe- und HBsAg in den Zellkulturüberständen bestimmt (3.3.1.4.). Die Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt. Es zeigte sich, dass die HBe-Antigenproduktion bei den BlueBac4.5-RVHBV1.5 env - und BlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env -infizierten Zellen annähernd gleich war. Die HBeAg-Konzentration der Zellen, die mit BlueBac4.5-RVHBV1.5-Viren inkubiert worden waren, war um den Faktor 3 geringer. Desweiteren wurde bei lichtmikroskopischen Untersuchungen der mit BlueBac4.5-RVHBV1.5-infizierten Zellen eine erhöhte Anzahl toter Zellen festgestellt. Worauf diese Effekte zurückzuführen waren, konnte nicht geklärt werden.



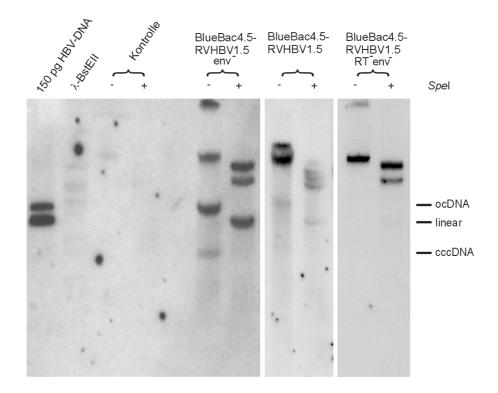
**Abb. 31:** Darstellung von HBe- und HBsAg nach Infektion von HepG2-Zellen mit rekombinanten Baculoviren. HepG2-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 50 infiziert und am 4. Tag nach der Infektion mit einer MOI von 50 superinfiziert (A: BlueBac4.5-RVHBV1.5 env<sup>-</sup>, B: BlueBac4.5-RVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup>, C+D: BlueBac4.5-RVHBV1.5). An den Tagen 2 und 6 nach der Infektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die Antigenkonzentrationen wurden an den Tagen 2, 4, 6 und 8 nach der Infektion im Zellkulturüberstand bestimmt.

#### 4.4.1.2. cccDNA-Nachweis im Southern Blot

Bei Untersuchungen von DELANEY & ISOM (1999) konnte nach Transduktion von HepG2-Zellen mittels rekombinanter Baculoviren HBV cccDNA nachgewiesen werden. Eine Reproduktion des Ergebnisses sollte im folgenden Experiment versucht werden. Interessant war zudem, ob nach Transduktion des env-Genoms aufgrund des fehlenden Exports der im Cytoplasma gebildeten Nukleokapside eine Anreicherung von nukleärer cccDNA ähnlich wie beim DHBV erfolgte (LENHOFF et al, 1999).

Je eine Schale mit HepG2-Zellen (Durchmesser 6 cm) wurde mit den rekombinanten Baculoviren BlueBac4.5-RVHBV1.5, BlueBac4.5-RVHBV1.5 env und BlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env mit einer MOI von 50 infiziert und am 4. Tag nach Infektion mit einer MOI von 50 superinfiziert (3.3.1.3.). Am 2. und 6. Tag nach Infektion wurden die Zellen mit frischem Medium versehen. Die Isolierung der cccDNA erfolgte am 8. Tag nach Erstinfektion (3.16.). Um die im Ansatz noch vorhandene und geschert vorliegende Baculovirus-DNA zu beseitigen, wurden die Ansätze mit Plasmid-Safe ATP Dependent

DNase (2.5.) behandelt, was zu einer Degradation nicht-zirkulärer DNA führt. Anschließend wurden die Ansätze halbiert Hälfte mit der und eine Restriktionsendonuklease Spel, die einmal im HBV-Genom schneidet, inkubiert (3.2.3.). Dabei wird die offen zirkuläre (oc) und die zirkulär, kovalent geschlossene (ccc) HBV-DNA linearisiert. Die linearisierte DNA-Form ist nach der Auftrennung im Agarosegel zwischen den beiden zirkulären DNA-Formen lokalisiert. Zur Kontrolle des Laufverhaltens der einzelnen DNA-Formen wurde der 3,3 kb große Vektor pSV65 (2.4.) mit dem Enzym EcoRI linearisiert. Der unverdaute und linearisierte Vektor pSV65 wurde parallel mit den Spel-behandelten und den unbehandelten Ansätzen im Agarosegel aufgetrennt (3.2.6.). Das Laufverhalten des pSV65-Vektors wurde durch Ethidiumbromid-Färbung und Durchleuchten mit UV-Licht sichtbar gemacht (Daten nicht gezeigt). Die Ansätze wurden durch Southern Blot analysiert (3.5.) und das Laufverhalten der Banden mit denen des Vektors pSV65 verglichen.



**Abb. 32:** Southern Blot-Analyse der cccDNA nach Infektion von HepG2-Zellen mit rekombinanten Baculoviren.

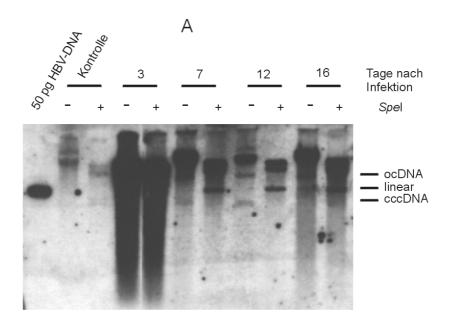
HepG2-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 50 infiziert und am 4. Tag nach der Infektion mit einer MOI von 50 superinfiziert. An den Tagen 2 und 6 nach der Infektion erfolgte ein Mediumwechsel. Am 8. Tag nach der Infektion wurde die cccDNA isoliert. Die Ansätze wurden halbiert und eine Hälfte wurde mit dem Restriktionsenzym Spel behandelt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Ansätze im Agarosegel. Die DNA wurde nach dem Blotten durch Chemilumineszenz-Detektion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde in der ersten Spur das mit EcoRV geschnittene Plasmid pRVHBV1.5 mit einer Konzentration von 150 pg verwendet. In der 2. Spur wurde  $\lambda$ -BstEII-Standard aufgetragen. Als Negativkontrolle (Kontrolle) wurden mit dem Plasmid pBlueBac4.5 "mock"-transfizierte Zellen eingesetzt. Die Abb. zeigt ein Exponat von 16 h.

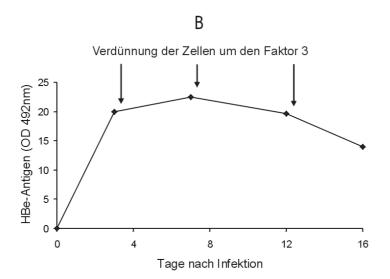
Abbildung 32 zeigt, dass mit dem Wildtyp HBV-Genom transduzierte Zellen nur geringe Mengen offen zirkuläre und lineare HBV-DNA bildeten. Das Signal der cccDNA war im Southern Blot nur sehr schwach. In Zellen, die mit dem Hüllprotein-negativen Genom transduziert wurden, konnten alle drei DNA-Formen detektiert werden. Deutlich ist die Linearisierung der ocDNA und cccDNA nach Spel-Verdau zu erkennen. Es zeigte sich, dass die Intensität der cccDNA nach Transduktion des Wildtyp- und env -HBV-Genoms mit der HBeAg-Konzentration (4.4.1.1.) in Korrelation stand. Bei den infizierten Zellen waren im oberen Bereich des Southern Blots Signale sichtbar, die vom HBV-DNA enthaltenden Baculovirus-Genom stammten. Soweit anhand dieser Ergebnisse beurteilt werden konnte, kam es nicht zur Anreicherung von cccDNA bei der Hüllprotein-negativen Mutante, da das Verhältnis von ocDNA zu cccDNA nach Transduktion des Wildtyp- und des env-negativen Genoms annähernd gleich war. Das Signal der cccDNA-Bande entsprach ca. 10 pg DNA, was in etwa 3 x 10<sup>6</sup> HBV-Genomen entspricht. Bei einer Infektion von 10<sup>6</sup> Zellen pro Schale wurden also im Mittel drei cccDNA-Moleküle pro Zelle gebildet. Obwohl in diesen Experimenten die Nachweisgrenze für die cccDNA knapp erreicht werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass für das eigentliche Ziel der Transkomplementation von Core-Mutanten der Nachweis zu unempfindlich war. Aus diesem Grund wurde die Nachweismethode als ungeeignet eingeschätzt, Mutanten auf cccDNA-Bildung hin zu untersuchen.

#### 4.4.1.3. Untersuchung der Persistenz der cccDNA

Da die cccDNA nach Transduktion des Hüllprotein-negativen Genoms (env<sup>-</sup>) gut nachweisbar war, wurde im folgenden Experiment die Persistenz der cccDNA untersucht. Dazu wurden zwei Schalen HepG2-Zellen (Durchmesser 6 cm) mit BlueBac4.5-RVHBV1.5 env<sup>-</sup> mit einer MOI von 50 infiziert. An den Tagen 3, 7, 12 und 16 wurden die Zellen einer Schale um den Faktor 3 verdünnt und subkultiviert (3.3.1.1). Von der zweiten Schale wurde HBeAg im Zellkulturüberstand bestimmt (3.3.1.4.) und anschließend cccDNA präpariert (3.16.). In Abb. 33 ist der Southern Blot der cccDNA-Nachweis der infizierten und subkultivierten Zellen sowie deren HBeAg-Konzentration dargestellt.

Die cccDNA war bis zu 12 Tage nach Infektion in passagierten Zellen nachweisbar. Am 3. Tag nach Infektion wurde das Signal wahrscheinlich durch den hohen Hintergrund der Baculovirus-DNA überlagert. Das Signal der cccDNA in einfach infizierten und passagierten Zellen (Verdünnung der Zellen insgesamt um den Faktor 9) nach 12 Tagen entsprach dem Signal der doppelt infizierten Zellen nach 8 Tagen (4.4.1.2.). Das HBeAg war im Zeitraum von 3 bis 12 Tagen nach Infektion annähernd konstant.





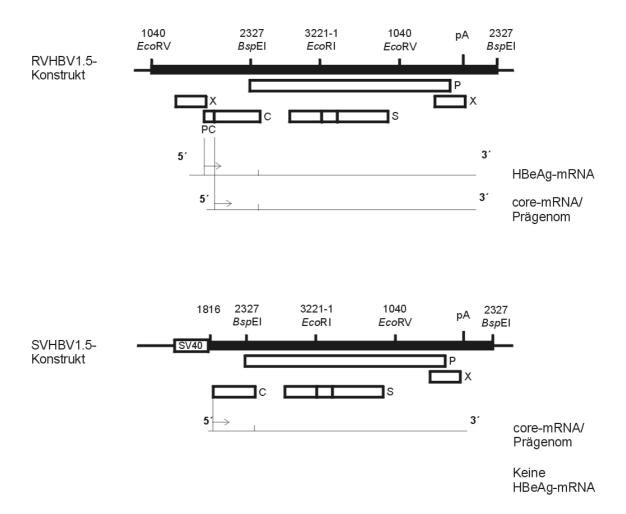
**Abb. 33:** Southern Blot-Analyse der cccDNA (A) und Bestimmung des HBeAg (B) nach Infektion von HepG2-Zellen mit BlueBac4.5-RVHBV1.5 env.

HepG2-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 50 infiziert. An den Tagen 3, 7, 12 und 16 nach der Infektion wurden die Zellen um den Faktor 3 verdünnt. Von einer weiteren Schale wurde zu den selben Zeitpunkten HBeAg bestimmt und cccDNA präpariert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Ansätze im Agarosegel. Die DNA wurde nach dem Blotten durch Chemilumineszenz-Detektion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde in der ersten Spur das mit *Eco*RV geschnittene Plasmid pRVHBV1.5 mit einer Konzentration von 50 pg verwendet. Als Negativkontrolle (Kontrolle) wurden mit dem Kontrollplasmid pBlueBac4.5 "mock"-transfizierte Zellen eingesetzt. Die Abb. zeigt ein Exponat von 16 h.

## 4.4.2. Transduktion des HBV-Genoms mittels rekombinanter Baculoviren des Typs BlueBac4.5-SVHBV1.5

Da die unter 4.4.1. beschriebene Methode des Southern Blots nur bedingt zur Untersuchung der cccDNA-Bildung geeignet ist, sollte nun die Bildung indirekt über Bestimmung von HBeAg untersucht werden. Dazu sollte ein HBV-exprimierendes Konstrukt in die Zellen gebracht werden, bei dem der Präcore-Bereich unvollständig war und deshalb keine HBeAg-Sezernierung erfolgte. Dem indirekten cccDNA-Nachweis durch HBeAg-Bestimmung lag folgende Idee zugrunde:

Zur Einfachheit werden in Abb. 34 das in 4.4.1. verwendete HBV-exprimierende Konstrukt (RVHBV1.5-Konstrukt) und das im folgenden zur indirekten Bestimmung der cccDNA eingesetzte Konstrukt (SVHBV1.5-Konstrukt) miteinander verglichen. Von der oberen abgebildeten HBV-Sequenz wird neben der prägenomischen RNA eine am 5'-Ende verlängerte RNA (HBeAg-mRNA) gebildet (1.2.). Als erstes Startkodon trägt diese nicht den Start des Core-Proteins wie das Prägenom, sondern den Start für das Präcore-Protein, aus dem HBeAg prozessiert wird (1.5.). Da HBeAg aber für die Replikation des Virus nicht notwendig ist, wurde das SVHBV1.5-Konstrukt (untere Darstellung) hergestellt. Bei diesem Konstrukt ist ein heterologer Promoter (SV40-early promotor) so vor das Core-Gen fusioniert, dass von diesem Promotor aus die prägenomische RNA gebildet wird. HBeAg kann aber nicht mehr synthetisiert werden, da der Präcore-Bereich unterbrochen ist.



**Abb. 34:** Schematische Darstellung der HBV-Konstrukte. Schwarze Balken zeigen das HBV-Genom, wobei die Positionszahlen darüber die Nukleotide relativ zur *Eco*RI-Erkennungssequenz bezeichnen. Weiße Rechtecke unterhalb des HBV-Genoms stellen die kodierten offenen Ableserahmen dar. pA: Polyadenylierungssignal, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, PC: Leserahmen des Präcore-Bereichs des HBV, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV, P: Leserahmen der Polymerase des HBV.

Im Fall der heterologen Promotorexpression der prägenomischen RNA durch das SVHBV1.5-Konstrukt werden alle viralen Proteine bis auf HBeAg translatiert (Abb. 35). Es kommt zur Bildung von Nukleokapsiden, die zur reversen Transkription befähigt sind und die HBV-DNA zurück in den Zellkern rekrutieren können (1.4.). Im Zellkern wird die offen zirkuläre DNA in cccDNA überführt. Durch Bildung der zirkulären, kovalent geschlossenen Form findet eine Wiederherstellung des Präcore/Core-Leserahmens statt, so dass ab diesem Zeitpunkt die HBeAg-Bildung erfolgt. Bildung von HBeAg kann demnach in diesem Versuchsansatz als indirekter Marker des erfolgreichen Kernimports mit anschließender cccDNA-Bildung des viralen Genoms verstanden werden. Dieses Konstrukt lag in einem Plasmid vor und wurde desweiteren in das Baculovirusgenom inseriert, da gezeigt wurde, dass HepG2-Zellen nach Infektion mit rekombinanten

Baculoviren in der Lage sind, cccDNA zu bilden (4.4.1.2. und 4.4.1.3.). Damit wurden die Untersuchungen bezüglich der HBe-Antigenbildung durchgeführt.

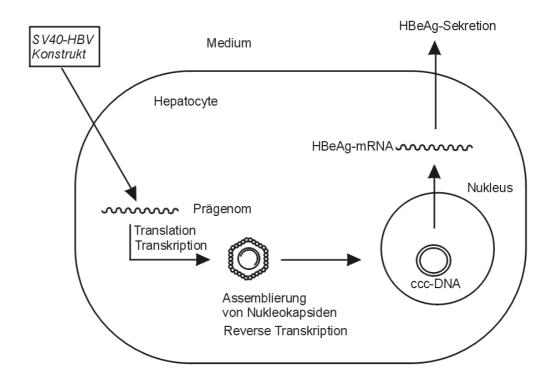


Abb. 35: Modell zur HBeAg-Synthese nach Transkription des SVHBV1.5-Konstrukts.

#### 4.4.2.1. Transfektion von pSVHBV1.5-Konstrukten

Zunächst wurde die HBeAg-Bildung nach Transfektion der Plasmide, von dem das HBV-Prägenom unter der Kontrolle des SV40-early promotors transkribiert wird, untersucht. In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass nach Transfektion des SV40HBV1.5-Konstrukts die Bildung von Virionen erfolgte (BURGER, 2000) und die Transkription des Prägenoms an der identischen Position wie vom autologen prägenomischen Promotor aus startete (PD Dr. V. Bruß, persönliche Mitteilung). Neben dem Wildtyp-Genom wurden auch die HBV-Mutanten L<sup>-</sup> und RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> untersucht. Die L<sup>-</sup>-Mutante exprimierte kein großes Hüllprotein, es fand keine Nukleokapsidumhüllung statt. Die RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup>-Mutante diente als Negativkontrolle. Sie sollte aufgrund der Mutationen im Polymerase- und env-Gen nicht in der Lage sein, virale DNA und Hüllproteine zu synthetisieren. Es entstanden hier nur unreife Kapside.

Zur Bestimmung des HBeAg wurden je eine Schale HuH7-Zellen und HepG2-Zellen (Durchmesser 10 cm) mit den Plasmiden pSVHBV1.5, pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> und pSVHBV1.5 RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup> (2.4.) transfiziert (3.3.1.2.). Am 5. Tag nach der Transfektion wurde

HBe- und HBsAq im Zellkulturüberstand bestimmt (3.3.1.4.). Die Werte wurden mit Zellen verglichen, die mit dem Plasmid pRVHBV1.5, bei dem sowohl prägenomische RNA als auch HBeAg-mRNA vom autologen Promotor aus gebildet werden, transfiziert worden waren (2.4., Abb. 34 oben). In Abb. 36 sind die gemessenen Antigenkonzentrationen graphisch dargestellt.

Es wurden sehr niedrige und annähernd gleiche Mengen HBeAg von den getesteten SVHBV1.5-Konstrukten (WT, L, RT env) nachgewiesen. Die mit dem Plasmid pRVHBV1.5 transfizierten Zellen sezernieren vergleichsweise deutlich größere Mengen HBeAg. Dieses Ergebnisse legte nahe, dass bei der Transfektion der pSVHBV1.5-Derivate keine mit dieser Technik nachweisbare cccDNA gebildet wurde. Das gemessene HBeAg konnte vermutlich durch nicht-assembliertes Core-Protein erzeugt worden sein.

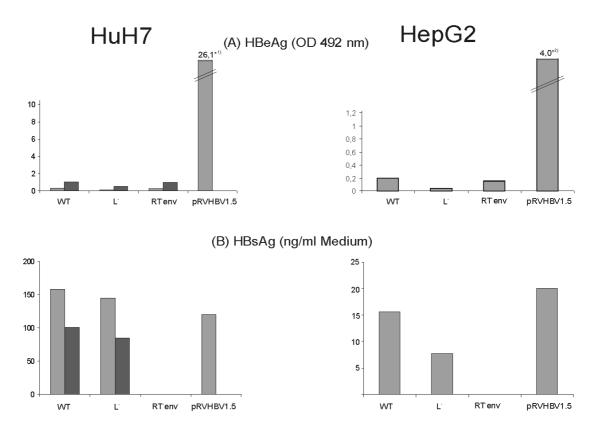


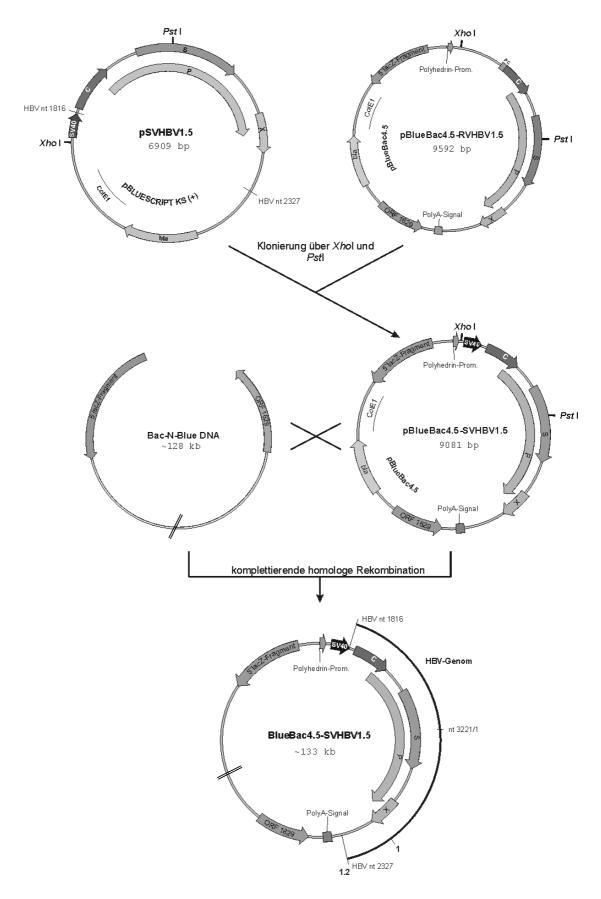
Abb. 36: Nachweis von HBeAg (A) und HBsAg (B) nach Transfektion mit pSVHBV1.5-Derivaten. HuH7 bzw. HepG2 Zellen wurden mit den Plasmiden pSVHBV1.5 (WT), pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> (L<sup>-</sup>), pSVHBV1.5 RT env (RT env) und pRVHBV1.5 transfiziert. Am 5. Tag nach Transfektion wurde HBe- und HBsAg im Zellkulturüberstand bestimmt. Die zwei Messwerte bei den HuH7-Zellen wurden in unabhängigen Versuchen ermittelt. \*1) 0,261 von einer 1:100 Verdünnung, \*2) 0,400 von einer 1:100 Verdünnung.

### 4.4.2.2. Konstruktion und Charakterisierung von BlueBac4.5-SVHBV1.5-Baculoviren

Es sollten rekombinante Baculoviren konstruiert werden, die das SVHBV1.5-Konstrukt inseriert hatten. Nach Transduktion eines derartigen rekombinanten Baculoviruskonstrukts sollte dann cccDNA-Bildung indirekt über HBeAg nachweisbar werden. Neben dem HBV Wildtyp-Genom wurde die RT<sup>-</sup>env<sup>-</sup>-Mutante als Negativkontrolle in das Baculovirus-Genom integriert.

Die Herstellung der rekombinanten Baculoviren erfolgte wiederum in zwei Schritten (Abb. 37). Zuerst wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Pst*I der SV40-early promotor und das HBV-Genom in das ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid (2.2.3.) pBlueBac-RVHBV1.5 bzw. pBlueBac-RVHBV1.5 RT env (2.4.) inseriert (3.2.8.). Nach Transformation von *E. coli* DH5α wurden positive Isolate durch Restriktionsanalyse identifiziert. Sie wurden mit pBlueBac4.5-SVHBV1.5 und pBlueBac-SVHBV1.5 RT env bezeichnet. Die env und RT Mutation wurde bei den entsprechenden Plasmiden durch Sequenzierung mit den Primern #r5 und #6574 überprüft (3.2.13.2.).

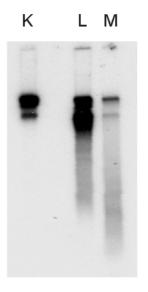
Im zweiten Schritt wurden die klonierten SVHBV40-Konstrukte durch homologe Rekombination über die flankierenden DNA-Sequenzen 5'-lacZ-Fragment und ORF1629 in das Baculovirus-Genom "Bac-N-Blue" (Invitrogen, Groningen) eingeführt. Dazu wurden SF9-Zellen (2.2.) mit den pBlueBac4.5-SVHBV1.5-Vektoren und der linearisierten Bac-N-Blue DNA, die aufgrund einer Deletion im ORF1629 replikationsinkompetent ist, kotransfiziert (3.3.3.1.). Durch Rekombination wurde die Deletion im ORF1629 des verwendeten Baculovirus-Genom komplettiert. Zur Isolierung einzelner Virusplagues wurde ein *Plaque-assay* durchgeführt (3.3.3.4.). Anschließend erfolgte die Vermehrung einzelner Baculovirus-HBV-Chimäre durch Infektion von SF9-Zellen (3.3.3.2.). Virusklone, die aus dem Wildtyp-Genom abgeleitet waren, wurden durch Nachweis intakter Nukleokapside im Zelllysat und Virionen im Zellkulturüberstand durch EPR analysiert (3.14.). Viren der RT env - Mutante wurden durch Bestimmung von HBcAg im Zelllysat (3.4.5.) identifiziert (Daten nicht gezeigt). Nach einem weiteren Plaque-assay wurden die isolierten Klone mit BlueBac4.5-SVHBV1.5 und BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env bezeichnet. In Abb. 38 ist die EPR mit einem gereinigten Virusstock von BlueBac4.5-SVHBV1.5 dargestellt.



**Abb. 37:** Konstruktion der rekombinanten Baculoviren des Typs BlueBac4.5-SVHBV1.5. Legende siehe folgende Seite.

Legende zur Abb. 37.

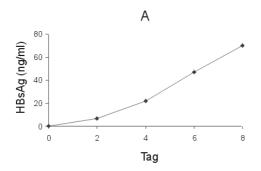
Der SV40-early promotor und Teile des HBV-Genoms wurden mit den Endonukleasen *Xho*I und *Pst*I aus dem Plasmid pSVHBV1.5 herausgeschnitten und in das Plasmid pBlueBac4.5-RVHBV1.5 bzw. pBlueBac4.5-RVHBV1.5 RT env eingesetzt. Die erzeugten Plasmide wurden hier als pBlueBac4.5-SVHBV1.5 zusammengefasst. Durch komplettierende homologe Rekombination mit replikationsinkompetenter Bac-N-Blue DNA entstanden die unter BlueBac4.5-SVHBV1.5 zusammengefassten rekombinanten Baculovirusgenome. bla: Gen für die β-Lactamase, ColE1: Replikationsursprung, PolyA-Signal: Polyadenylierungssignal, ORF1629: den Polyhedrin-Promotor flankierender offener Leserahmen des Baculovirus, X: Leserahmen des X-Proteins des HBV, PC: Leserahmen des Präcore-Bereichs des HBV, C: Leserahmen des Core-Proteins des HBV, S: Leserahmen der Hüllproteine des HBV, P: Leserahmen der Polymerase des HBV, SV40: SV40-Promotor.

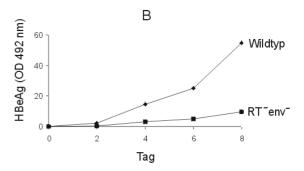


**Abb. 38:** Endogener Polymerase Nachweis nach Infektion von SF9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren. HepG2-Zellen wurden mit Baculoviren des Typs BlueBac4.5-SVHBV1.5 eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Am 5. Tag wurden die Zellen geerntet. Vorhandene Kapside und Virionen wurden mit anti-HBc aus dem Zellkysat (L) und anti-HBs aus dem Zellkulturüberstand (M) immunpräzipitiert und danach in die EPR eingesetzt. In Spur K ist 1 µl eines humanen HBV-haltigen Serums (ca. 10<sup>6</sup> Virionen) ohne Immunpräzipitation als Positivkontrolle eingesetzt worden. Die Autoradiogramme wurden 18 h exponiert.

Zur weiteren Charakterisierung der Baculovirus-Infektionen wurden die HBeAg-Konzentration und von BlueBac4.5-SVHBV1.5 zusätzlich die HBsAg-Konzentration nach Inkubation mit hochtitrigen Baculovirusstocks bestimmt. Dazu wurden die in größerem Maßstab hergestellten Baculoviren (3.3.3.1.) in einem kleinen Volumen konzentriert (3.3.3.3.). Anschließend wurde der Virustiter bestimmt (3.3.3.4.). Die Infektion je einer Schale HepG2-Zellen (6 cm Durchmesser) erfolgte mit einer MOI von 50. Am 4. Tag nach Infektion erfolgte die Superinfektion der Zellen ebenfalls mit einer MOI von 50 (3.3.1.3.). Am 2. und 6. Tagen nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versehen. Am Tag 2, 4, 6 und 8 nach Infektion wurde die Konzentration von HBe- und HBsAg im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt (3.3.2.). Die Ergebnisse der HBeAg- und HBsAg-Bestimmung sind in Abb. 39 dargestellt. Die mit dem SV40-Wildtyp HBV-Genom transduzierten Zellen waren in der Lage, HBswie auch HBeAg zu synthetisieren. Entgegen der Erwartung synthetisierten aber auch die

mit dem RT env Genom transduzierten Zellen HBeAg. Die Menge entsprach ca. 1/5 des Wildtyps. Das gebildete HBeAg konnte demzufolge nicht nur auf die Bildung von cccDNA zurückgeführt werden. Möglicherweise beeinflusst Core-Protein den HBeAg-Nachweis. Der deutliche Unterschied der sezernierten HBeAg-Menge könnte auf eine cccDNA-Bildung hinweisen.





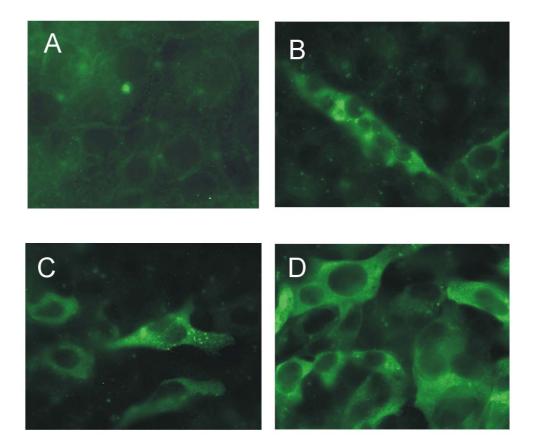
**Abb. 39:** Bildung von HBe- und HBsAg nach Infektion von HepG2-Zellen mit rekombinanten Baculoviren. HepG2-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren mit einer MOI von 50 infiziert und am 4. Tag nach der Infektion mit einer MOI von 50 superinfiziert. An den Tagen 2 und 6 nach der Infektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die Antigenkonzentrationen wurden an den Tagen 2, 4, 6 und 8 nach der Infektion im Zellkulturüberstand bestimmt. (A: BlueBac4.5-SVHBV1.5, B: BlueBac4.5-SVHBV1.5 (Wildtyp) + BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env (RT env))

#### 4.4.2.3. Untersuchungen zur Infektionseffizienz mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die Infektionseffizienz nach Inkubation von HepG2-Zellen mit BlueBac4.5-SVHBV1.5 mit verschiedener MOI wurde im weiteren mit HBcAg-spezifischer Immunfluoreszenz (3.17.) untersucht. Hierfür wurden 10<sup>5</sup> Zellen pro Napf in einer 24-Lochplatte auf Glasträgern ausgesät und mit jeweils einer MOI von 10 und 50 infiziert. Zusätzlich wurden Zellen mit einer MOI von 50 infiziert und mit ebenfalls einer MOI von 50 superinfiziert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen fixiert und das Core-Protein mit Hilfe des anti-HBc-Antikörpers und eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (2.7.) nachgewiesen. Zur Bestimmung der Infektionseffizienz wurden mindestens 200 Zellen pro Ansatz ausgezählt und jeweils die Anzahl der HBcAg positiven Zellen bestimmt. Als Kontrolle für die Spezifität der HBc-Immunfluoreszenz wurde eine Fluoreszenzfärbung mit Zellen ohne Zugabe von rekombinanten Baculoviren durchgeführt.

In Abb. 40 sind die Fluoreszenzpräparate der HepG2-Zellen dargestellt. Das HBcAg ließ sich im Cytoplasma der Zellen nachweisen. Im Zellkern konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden. Bei Infektion der Zellen mit einer MOI von 10 zeigten 3 % der Zellen Fluoreszenz (Abb. 40B). 4,5 % HBcAg positive Zellen wurden nach Infektion der Zellen mit einer MOI von 50 nachgewiesen (Abb. 40C). Der Anteil der infizierten Zellen wurde

deutlich nach Superinfektion der Zellen (Abb. 40D) gesteigert und betrug 30 %. In der Negativkontrolle war keine spezifische Fluoreszenz sichtbar (Abb. 40A).



**Abb. 40:** Immunfluoreszenznachweis von HBcAg in HepG2-Zellen nach Infektion mit BlueBac-SVHBV1.5. Dargestellt sind Präparate von HepG2-Zellen, die mit unterschiedlicher MOI infiziert wurden. Das Core-Protein wurde mit einer anti-HBc-Antikörper nachgewiesen, der von einem zweiten Cy2-gekoppeltem Kaninchenantikörper erkannt wurde. (A: Negativkontrolle, B: Infektion mit einer MOI mit 10, C: Infektion mit einer MOI von 50, D: Infektion und Superinfektion mit einer MOI von 50).

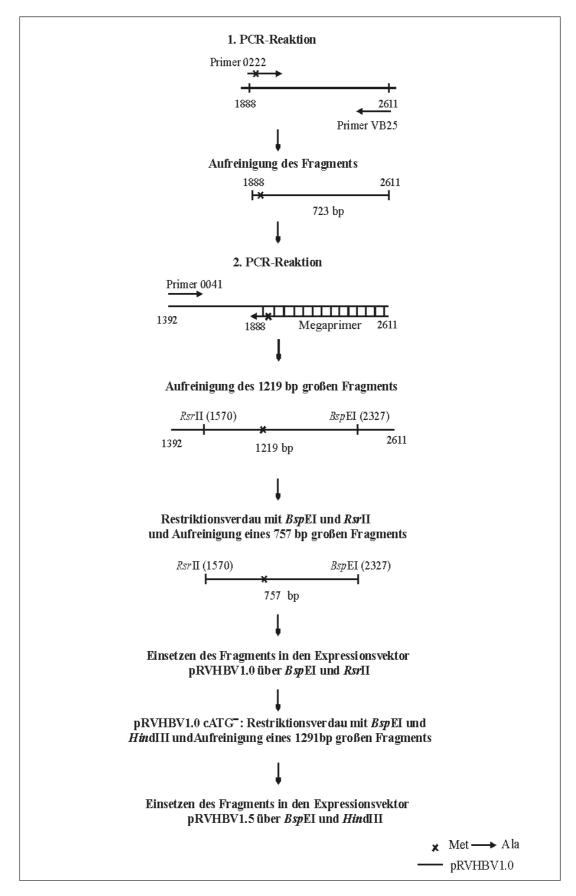
#### 4.4.2.4. cccDNA-Nachweis mittels HBeAg im Western Blot-Nachweis

Da im ELISA auch nach Transduktion des SVHBV RT env Konstrukts HBeAg bestimmt wurde und nicht auszuschließen war (4.4.2.2.), dass es sich dabei um nicht assembliertes Core-Protein handelte, sollte nun das HBeAg im Zellkulturüberstand durch Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Sezerniertes HBeAg hat eine Größe von 17 kD. In der Literatur wurde beschrieben, dass bei der Expression von HBV in Zellkultur Subtypabhängig mehrere anti-HBeAg-reaktive Proteine gebildet wurden (SALFELD et al., 1989). Zur Identifikation dieser reaktiven Proteine in HepG2-Zellen wurden Transfektionen mit verschiedenen Plasmidkonstrukten durchgeführt und die HBeAg-Synthese im Zellkulturüberstand der transduzierten Zellen mittels Western Blot untersucht.

#### 4.4.2.4.1. Konstruktion des Plasmids pRVHBV1.5 cATG

Um die HBeAg-spezifischen Proteine zuordnen zu können, wurde ein Plasmid konstruiert, das in der Lage ist, HBeAg, aber nicht HBcAg zu exprimieren. Da sich HBe- und HBcAg in der Größe nicht stark unterscheiden, sollte dadurch ein Zuordnen der entsprechenden Banden im Western Blot vereinfacht werden.

Im folgenden wurde ein genomisches HBV-exprimierendes Konstrukt pRVHBV1.5 cATG erstellt, bei dem das Startkodon (ATG) des Core-Proteins durch in vitro-Mutagenese zu einem Alaninrest (GCC) mutiert wurde. Es erfolgte ein Nukleotidaustausch an den Positionen 1898 (A $\rightarrow$ G), 1899 (T $\rightarrow$ C) und 1900 (G $\rightarrow$ C) des HBV-Genoms. Als Expressionsvektor für die zu erzeugende Core-negative Mutante diente das Plasmid pRVHBV1.5 (2.4.). Die Herstellung der Mutante erfolgte in zwei Schritten (Abb. 41). Da der zu mutierende Bereich auf dem Expressionsplasmid pRVHBV1.5 doppelt vorlag, wurde als erstes die Mutation in das Plasmid pRVHBV1.0 eingeführt und anschließend ein die Mutation umfassender Bereich in das Plasmid pRVHBV1.5 inseriert. Die Herstellung der Mutante erfolgte mit Modifikation wie unter 3.2.5. beschrieben, wobei nur ein die Mutation tragendes Oligonukleotid benötigt wurde. Das Plasmid pRVHBV1.0 diente als Matrize für die erste Runde der PCR. Dabei wurde ein die Mutation enthaltendes Oligonukleotid mit einem flankierenden Oligonukleotid eingesetzt. Das amplifizierte Fragment war 723 bp groß und wies die Mutation auf. Nach der Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel (3.2.7.) wurde das Fragment als sogenannter "Megaprimer" zusammen mit einem flankierenden Oligonukleotid in die zweite PCR-Runde eingesetzt. Durch die zweite PCR wurde ein 1219 bp großes Fragment amplifiziert und mit den Oligonukleotiden #0070, #0135 und #0152 sequenziert. Aus dem Fragment wurde nach Aufreinigung (3.2.7.) ein 757 bp großer DNA-Abschnitt mit den Restriktionsschnittstellen RsrII und BspEI herausgeschnitten (3.2.3.) und gereinigt (3.2.7.). Anschließend wurde das Fragment in das zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelte Plasmid pRVHBV1.0 eingesetzt (3.2.8.). Die Mutation wurde durch Sequenzierung mit dem Oligonukleotid #0152 verifiziert (3.2.13.2.).



**Abb. 41:** Schematische Herstellung des Plasmids pRVHBV1.5 cATG<sup>-</sup>. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die HBV-Sequenz des Subtyps *adw2* (VALENZUELA et al., 1980).

Das entstandene Plasmid wurde mit pRVHBV1.0 cATG bezeichnet. Anschließend erfolgte die Umklonierung des mutationstragenden Bereichs in den Expressionsvektor pRVHBV1.5. Dazu wurde aus dem Plasmid pRVHBV1.0 cATG ein 1219 bp großer DNA-Abschnitt mit den Restriktionenzymen *Bsp*EI und *Hin*dIII herausgeschnitten (3.2.3.) und über ein Agarosegel aufgereinigt (3.2.7.). Danach erfolgte die Insertion des Fragments in das zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelte Plasmid pRVHBV1.5. Anschließend wurde die Mutation ebenfalls durch Sequenzierung mit dem Oligonukleotid #0152 überprüft (3.2.13.2.). Das so entstandene Plasmid wurde mit pRVHBV1.5 cATG bezeichnet.

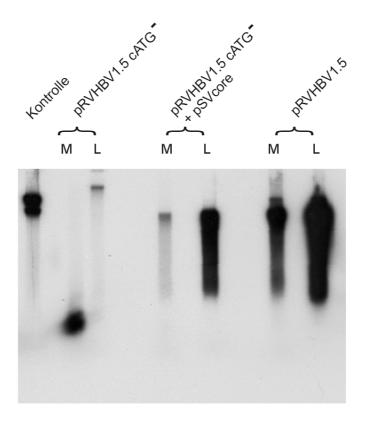
Im weiteren Verlauf wurden untersucht, ob die cATG-negative HBV-Mutante mit dem Aminosäureaustausch an Position 30 im Präcore-Protein (Methionin zu Alanin) in der Lage war, HBeAg zu bilden und ob die Substitution im Leserahmen *in trans* komplementiert werden konnte. Dazu wurde je eine Schale HepG2-Zellen mit 5 µg pRVHBV1.5 cATG<sup>-</sup> zum einen mit und zum anderen ohne Zugabe von 5 µg pSVcore transfiziert (3.3.1.2.). Als weitere Positivkontrolle wurden daneben auch Zellen mit dem Wildtyp HBV-Genom exprimierenden Plasmid pRVHBV1.5 transfiziert. Am 5. Tag nach der Transfektion wurden die HBs-, HBe- und HBcAg-Konzentration im ELISA bestimmt (3.3.1.4. und 3.4.5.). Anschließend wurden die Zellen geerntet und ein Zelllysat hergestellt (3.4.3.). Aus dem Lysat wurden die Nukleokapside mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.). Der Zellkulturüberstand wurde zur Immunpräzipitation mit anti-HBs eingesetzt (3.4.4.). Der Nachweis vorhandener Kapside und Virionen erfolgte durch die EPR. Die Ergebnisse der Antigenbestimmung sind in Tab. 14 und die der EPR in Abb. 42 dargestellt.

Tab. 14: Bestimmung der HBs-, HBe- und HBcAg-Konzentration am 5. Tag nach Transfektion.

|   | HBsAg (ng/ml) | HBeAg (OD <sub>492</sub> ) | HBcAg (ng/Schale) |
|---|---------------|----------------------------|-------------------|
| pRVHBV1.5 cATG                          | 41,1          | 2,7                        | < 0,2             |
| pRVHBV1.5 cATG <sup>-</sup><br>+pSVcore | 23,6          | 1,8                        | 7,0               |
| pRVHBV1.5                               | 16,4          | 1,9                        | 6,3               |

Es zeigte sich, dass die Mutante pRVHBV1.5 cATG in der Lage war, HBeAg zu bilden. HBcAg wurde erwartungsgemäß nicht gebildet. Nukleokapside und Virionen wurden aufgrund der fehlenden Expression des Core-Proteins nicht nachgewiesen. Durch Expression des Core-Proteins *in trans* kommt es zusammen mit allen anderen vom cATG-

negativen HBV-Genom gebildeten Virusproteinen zur Bildung von Virionen, die in der EPR nachgewiesen wurden.

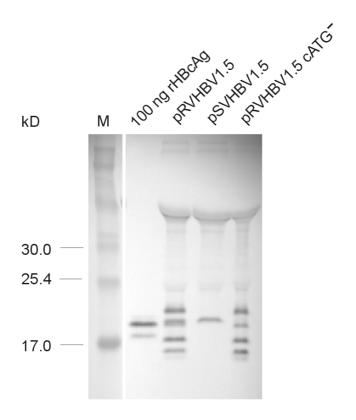


**Abb. 42:** Komplementation der cATG¯-Mutante *in trans* durch pSVcore, Endogener Polymerase Nachweis in Zelllysaten (L) und Zellkulturüberständen (M). In der linken Spur ist 1 µl eines humanen HBV-haltigen Serums (ca. 10<sup>6</sup> Virionen) ohne Immunpräzipitation dargestellt. HepG2-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert und am 5. Tag nach Transfektion geerntet. Vorhandene Kapside und Virionen wurden mit anti-HBc aus dem Zellkulturüberstand (M) immunpräzipitiert und danach in die EPR eingesetzt. Das Autoradiogramm wurde 18 h exponiert.

#### 4.4.2.4.2. Identifikation von HBeAg im Western Blot

Zur Identifikation der HBeAg-Banden im Western Blot wurden Zellen mit Plasmidkonstrukten transfiziert, die zum einen alle Virusproteine außer Core-Protein (pRHBV1.5 cATG<sup>-</sup>) und zum anderen alle Virusproteine außer HBeAg (pSVHBV1.5, 2.4.) oder die Expression beider Proteine (pRVHBV1.5, 2.4.) erlaubten. Zu diesem Zweck wurde je eine Schale HepG2-Zellen (Durchmesser 10 cm) mit den Plasmiden pSVHBV1.5, pRVHBV1.5 cATG<sup>-</sup> und pRVHBV1.5 transfiziert (3.3.1.4.). Fünf Tage nach der Transfektion wurden 5 ml des Zellkulturüberstands in die Immunpräzipitation mit anti-HBc/e-haltigem Serum F2760 (2.7.) eingesetzt. Die immunpräzipitierten Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt (3.4.6.) und mit dem identischen Antiserum im Western Blot (3.4.8.) nachgewiesen. Abb. 43 zeigt einen Immunblot (3.4.9. und 3.4.10.) mit

spezifischem Antiserum gegen HBc- und HBeAg transfizierter HepG2-Zellen und gegen rekombinantes Core-Protein aus *E. coli* (4.3.1.).



**Abb. 43:** Nachweis von HBc- und HBeAg nach Transfektion im Immunblot. Aus dem Zellkulturüberstand von HepG2-Zellen, die mit den Plasmiden pRVHBV1.5, pSVHBV1.5 und pRVHBV1.5 cATG transfiziert worden waren, wurden HBc- und HBeAg mit anti-HBe/c-haltigem Serum F2760 immunpräzipitiert. Daneben wurden 100 ng rekombinant in *E. coli*-exprimierte Core-Partikel (rHBcAg) eingesetzt. Der Nachweis von HBc- und HBeAg erfolgte ebenfalls mit Serum F2760 und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Antikörper. Anschließend erfolgte die Detektion des Peroxidase-markierten Antikörpers mit DAB. M: Proteinstandard "Rainbow standard low".

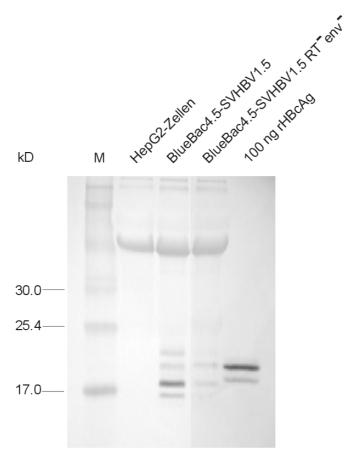
Mit Hilfe des Serums F2760, durch das HBeAg und denaturiertes Core-Protein detektiert werden konnte, wurde nach Transfektion des Plasmids pSVHBV1.5 Core-Protein mit einer Größe von 21 kD nachgewiesen. Das Protein stammt wahrscheinlich von toten, lysierten Zellen, da Core-Proteine ohne Virushülle nicht aus intakten HepG2-Zellen sezerniert werden konnten. Die vier Banden, die nach Transfektion mit dem Plasmid pRVHBV1.5 cATG<sup>-</sup> detektiert wurden, entsprachen den von HepG2-Zellen sezernierten Proteinen mit anti-HBe-Aktivität. Dabei befand sich die 2. Bande von oben auf annähernd gleicher Höhe wie Core-Protein. pRVHBV1.5 transfizierte Zellen zeigten sowohl eine Bande auf Höhe des Core-Proteins als auch die vier Banden des HBe-Antigens.

## 4.4.2.4.3. HBeAg-Nachweis durch Western Blot nach Transduktion mittels BlueBac4.5-SVHBV1.5-Baculoviren

Im folgenden Experiment wurde die Bildung von HBeAg nach Transduktion der SVHBV1.5-Konstrukte in HepG2-Zellen durch Western Blot untersucht. Damit sollte geklärt werden, worauf das nach Transduktion des SV40-HBV RT env Genoms gemessene HBeAg zurückzuführen war (4.4.2.2.).

Dazu wurde je eine Schale HepG2-Zellen (Durchmesser 6 cm) mit BlueBac4.5-SVHBV1.5 und BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env mit einer MOI von 50 infiziert. Am 4. Tag nach Infektion erfolgte die Superinfektion der Zellen ebenfalls mit einer MOI von 50 (3.3.1.3.). Am 2. und 6. Tag nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, aufbewahrt und die Zellen mit frischem Medium versehen. Nach 8 Tagen wurden die einzelnen Zellkulturüberstände der entsprechenden Infektionen vereint und mit antiHBc/e-haltigem Serum F2760 immunpräzipitiert (3.4.4.). Anschließend wurden die immunpräzipitierten Proteine im SDS-Gel aufgetrennt (3.4.6.) und mit dem identischen Serum im Western Blot (3.4.8.) nachgewiesen. Unspezifische Reaktionen von Bestandteilen des Serums mit Komponenten des Zellüberstands konnten durch Mitführen einer nicht transduzierten Zellkulturüberstand-Kontrolle von HepG2-Zellen ausgeschlossen werden. Abb. 44 zeigt einen Immunblot (3.4.9. und 3.4.10.) mit spezifischem Antiserum gegen HBc- und HBeAg infizierter HepG2-Zellen und gegen rekombinantes Core-Protein aus *E. coli* (4.3.1.).

Bei den mit dem Wildtyp SV40-HBV1.5-Genom transduzierten Zellen sind deutlich die vier HBeAg-Banden zu erkennen, wobei im Vergleich zu Abb. 43 die dritte Bande von oben eine stärkere Intensität besitzt als die übrigen Banden. Bei mit der Mutante SVHBV1.5 RT env transduzierten Zellen wurde eine Bande auf Höhe des Core-Proteins nachgewiesen. Desweiteren war aber auch die intensivere Bande des HBeAg zu erkennen, die aber deutlich schwächer als beim Wildtyp SV40-HBV-Genom gewesen ist. Der als Negativkontrolle eingesetzte Zellkulturüberstand nicht transduzierter HepG2-Zellen zeigte keine spezifische Reaktion mit dem Serum F2760. Die Ergebnisse zeigten, dass aufgrund des HBeAg-spezifischen Signals der RT env -Mutante die Bildung von HBeAg nicht ausschließlich auf die cccDNA-Synthese zurückgeführt werden konnte. Der Unterschied der Bandenintensität zwischen SVHBV1.5- und SVHBV1.5 RT env transduzierter Zellen ist möglicherweise auf die cccDNA-Synthese des Wildtyp SVHBV1.5-Genoms zurückzuführen.



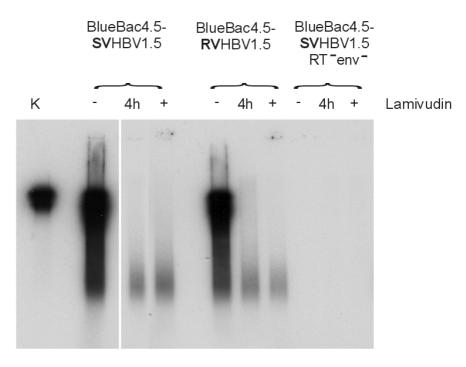
**Abb. 44:** Nachweis von HBc- und HBeAg nach Infektion im Immunblot. Aus HepG2-Zellen, die mit BlueBac4.5-SVHBV1.5 und BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env mit einer MOI von 50 infiziert und superinfiziert worden waren, wurden aus dem Zellkulturüberstand HBc- und HBeAg mit anti-HBe/c-haltigem Serum F2760 immunpräzipitiert. Daneben wurden 100 ng rekombinant in *E. coli-*exprimierte Core-Partikel (rHBcAg) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde der Zellüberstand kultivierter HepG2-Zellen eingesetzt (HepG2-Zellen). Der Nachweis von HBc- und HBeAg erfolgte ebenfalls mit Serum F2760 und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Antikörper. Anschließend erfolgte die Detektion des Peroxidasemarkierten Antikörpers mit DAB. M: Proteinstandard "Rainbow marker low".

## 4.4.2.4.4. HBeAg-Nachweis nach Transduktion mittels BlueBac4.5-SVHBV1.5-Baculoviren und Lamivudin-Behandlung

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob das gebildete HBeAg nach Transduktion des SVHBV1.5-Genoms auf cccDNA-Bildung zurückgeführt werden konnte. Dazu sollte parallel zur Infektion von HepG2-Zellen ein Ansatz gemacht werden, bei dem nach Infektion der Reverse Transkriptase-Hemmer Lamivudin zugesetzt wurde. Lamivudin ist ein Nukleosidanalogon, das nach Einbau durch die Reverse Transkriptase zum Abbruch der DNA-Synthese führt. Dadurch sollte die reverse Transkription und folglich auch die cccDNA-Bildung verhindert werden. Das gebildete HBeAg wurde im Western Blot untersucht. Als Positivkontrolle wurden BlueBac4.5-RVHBV1.5-transduzierte Zellen mitgeführt, die HBeAg-mRNA bildeten (vgl. 4.4.2). Die Wirksamkeit des Lamivudins wurde zunächst durch die EPR sichergestellt. Zu diesem Zweck wurde die Präsenz

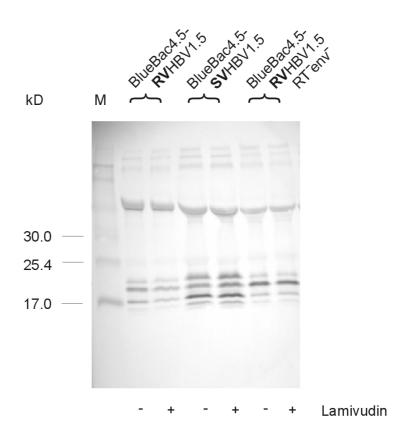
intakter Nukleokapside im Zelllysat ohne Lamivudin-Zugabe, nach sofortiger Lamivudin-Zugabe und Lamivudin-Zugabe nach 4 Stunden nach Infektion untersucht. Im Zellkulturüberstand wurde die Bildung von HBeAg nach Transduktion der entsprechenden HBV-Genome in HepG2-Zellen und anschließender Lamivudin-Behandlung analysiert.

Dazu wurden je drei Schalen HepG2-Zellen (Durchmesser 6 cm) mit BlueBac4.5-RVHBV1.5, BlueBac4.5-SVHBV1.5 und BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env mit einer MOI von 50 infiziert. Eine dieser Schalen wurde sofort nach Infektion mit Lamivudin (Endkonzentration 10 μM) versetzt. Zu einer weiteren Schale wurde nach 4 h die gleiche Menge Lamivudin gegeben. Am 4. Tag nach Infektion erfolgte die Superinfektion der Zellen ebenfalls mit einer MOI von 50 (3.3.1.3.) und Lamivudin-Behandlung in identischer Weise. 8 Tage nach Infektion wurden die Zellen geerntet und das Zelllysat hergestellt (3.4.3.). Aus dem Lysat wurden die Nukleokapside mit anti-HBc immunpräzipitiert (3.4.4.) und die Kapside wurden durch EPR detektiert (Abb. 45). Die Zellkulturüberstände wurden mit anti-HBc/e-haltigem Serum F2760 immunpräzipitiert (3.4.4.). Anschließend wurden die immunpräzipitierten Proteine im SDS-Gel aufgetrennt (3.4.6.) und mit Serum F2760 im Western Blot (3.4.8.) nachgewiesen. Abb. 46 zeigt einen Immunblot (3.4.9. und 3.4.10.) mit spezifischem Antiserum gegen HBc- und HBeAg infizierter HepG2-Zellen.



**Abb. 45:** Endogener Polymerase Nachweis in Lamivudin-behandelten Zellen. HepG2-Zellen wurden mit BlueBac4.5-RVHBV1.5, BlueBac4.5-SVHBV1.5 und BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env mit einer MOI von 50 infiziert und am 4. Tag nach Infektion mit einer MOI von 50 superinfiziert. Die Lamivudin-Behandlung erfolgte sofort (+) bzw. 4 h (4 h) nach Infektion. Bei den mit (-) gekennzeichneten Spuren erfolgte keine Lamivudinzugabe. Vorhandene Kapside wurden mit anti-HBc aus dem Zelllysat immunpräzipitiert und danach in die EPR eingesetzt. In der Spur K ist 1 μI eines humanen HBV-haltigen Serums (ca. 10<sup>6</sup> Virionen) ohne Immunpräzipitation dargestellt. Das Autoradiogramm wurde 18 h exponiert.

Ohne Lamivudin-Behandlung wurden nach Infektion der Zellen mit BlueBac4.5-RVHBV1.5 und BlueBac4.5-SVHBV1.5 im Gegensatz zu BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env - infizierten Zellen intakte Nukleokapside im Zelllysat nachgewiesen. Bei den behandelten Ansätzen wurden in den Zellen keine funktionsfähigen Nukeokapside mehr detektiert, unabhängig davon, ob die Lamivudin-Zugabe nach 4 Stunden oder sofort nach der Infektion erfolgte. Das schwache Signal, das nach 4 h und sofort nach Lamivudinzugabe im unteren Bereich des Autoradiogramms zu sehen war, war möglicherweise auf Einbau von  $\alpha^{32}$ P-dCTP in DNA-Abbruchstränge rückzuführen, die bis zu dem Zeitpunkt synthetisiert wurden an dem Lamivudin zum Abbruch der DNA-Synthese führte. Zusätzlich konnte zu Beginn der Infektion eine Synthese kurzer DNA-Stränge in den Nukleokapsiden erfolgen, da die Lamivudin-Zugabe erst nach einstündiger Inkubation der Zellen mit den Baculoviren stattfand.



**Abb. 46:** Nachweis von HBc- und HBeAg nach Infektion im Immunblot. HepG2-Zellen wurden mit BlueBac4.5-RVHBV1.5, BlueBac4.5-SVHBV1.5 und BlueBac4.5-SVHBV1.5 RT env mit einer MOI von 50 infiziert und am 4. Tag nach Infektion mit einer MOI von 50 superinfiziert. Die Lamivudin-Behandlung erfolgte sofort (+) nach Infektion. Bei den mit (-) gekennzeichneten Spuren erfolgte keine Lamivudinzugabe. Der Zellkulturüberstand wurde mit HBeAg mit anti-HBe/c-haltigem Serum F2760 immunpräzipitiert. Der Nachweis von HBc- und HBeAg erfolgte ebenfalls mit F2760 und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Antikörper. Anschließend erfolgt die Detektion des Peroxidase-markierten Antikörpers mit DAB. M: Proteinstandard "Rainbow standard low".

Die Analyse der Zellkulturüberstände im Western Blot zeigte, dass sich die HBeAg-Menge nach Transduktion des SVHBV1.5-Genoms mit und ohne Lamivudin-Zugabe nicht unterschied. In den Ansätzen der SVHBV1.5 RT env transduzierten Zellen waren in beiden Fällen HBeAg-spezifische Banden und eine stärkere Bande (2. Bande von oben) auf Höhe des Core-Proteins zu erkennen. Dies ließ vermuten, dass trotz fehlender Synthese des HBV-Genoms, eine nachweisbare Expression des Core-Proteins von der inserierten HBV-DNA im Baculovirusgenom erfolgte. Die Transduktion des RVHBV1.5-Genoms, von dem die HBeAg-mRNA Synthese erfolgen konnte, zeigte unabhängig von der Lamivudin-Zugabe HBeAg-Expression. Insgesamt wurde gezeigt, dass das nach Transduktion des SVHBV1.5-Genoms mit Hilfe der Baculoviren gebildete HBeAg nicht auf gebildete cccDNA zurückgeführt werden konnte. Diese Methode ist demzufolge so nicht geeignet, um cccDNA nachzuweisen.

#### 5. DISKUSSION

Das Hepatitis B Virus vermehrt sich über ein RNA-Replikationsintermediat (Prägenom), das vom DNA-Virusgenom transkribiert wird. Nach der Synthese und folgendem Transport ins Cytoplasma (JUNKER-NIEPMANN et al., 1990) wird es an die virale Polymerase gebunden und zusammen mit einer zellulären Proteinkinase (KANN & GERLICH, 1994) ins virale Nukleokapsid verpackt (BARTENSCHLAGER & SCHALLER, 1992). Im Cytosol der infizierten Zelle findet die nachfolgende Genomreifung, d.h. die reverse Transkription der RNA in (-)-Strang-DNA und die folgende (+)-Strang-DNA-Synthese innerhalb des Nukleokapsids statt (SUMMERS & Mason, 1982).

Die Umhüllung des Nukleokapsids ist auf zwei Ebenen reguliert. Zum einen können unreife Nukleokapside nicht umhüllt und exportiert werden (GERELSAIKHAN et al., 1996; WEI et al., 1996). Vielmehr ist die Synthese von viraler DNA im Lumen der Partikel notwendig für die Entstehung einer Umhüllungskompetenz. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass ausschließlich Kapside umhüllt werden, die das reife Genom enthalten. Zum anderen wird davon ausgegangen, dass die Entscheidung, ob das reife Nukleokapsid den nukleären oder den Exportweg einschlägt, reguliert ist. Diese Regulation ist eine Voraussetzung für die bei zahlreichen Infektionen beobachtete hohe persistierende Virusproduktion ohne sichtbare Schädigung der Leberzellen. Für die Aufrechterhaltung dieses Zustands ist eine ausreichend hohe intrazelluläre Kopienzahl der viralen cccDNA notwendig, um eine effektive Virusproduktion zu erlauben. Gleichzeitig darf die Kopienzahl allerdings nicht zu stark steigen, da hiermit zumindestens im DHBV-Modell cytotoxische Effekte verbunden sind (LENHOFF et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden die dem Umhüllungssignal zugrunde liegenden Strukturen näher charakterisiert. Desweiteren sollte ein experimentelles *in vitro-*System zur Untersuchung der nukleären Virus-DNA etabliert werden.

### 5.1. Vergleichende Untersuchungen reifer und unreifer Nukleokapside

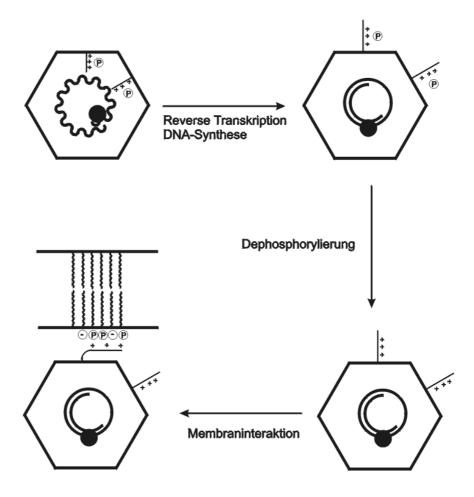
Die Morphogenese der Hepadnaviren wie auch der Pararetroviren beginnt mit der Umhüllung des RNA-Prägenoms, welches anschließend in DNA umgeschrieben wird. Diese Viren haben Mechanismen entwickelt, die die Umhüllung von Nukleokapsiden, die unreife Genome tragen, ausschließen. Umhüllte Viren erhalten ihre äußere Hülle durch Knospung an zellulären Membranen (budding). Während die Hepadnaviren, ebenso wie die Coronaviren, an der ER-Membran assemblieren, findet dieser Vorgang z.B. bei Bunyaviren in den Cisternae des Golgiapparates oder bei Herpesviren an der Kernmembran statt. Die reifen Viruspartikel werden dann über den konstitutiven Weg aus

der Zelle transportiert. Alphaviren, Retroviren und weitere Virusfamilien assemblieren an der Zellmenbran, in die die viralen Glykoproteine integriert sind und werden auf diesem Weg direkt freigesetzt (GAROFF et al., 1998).

Es wird davon ausgegangen, dass das Budding von der Interaktion zwischen viralen Hüllproteinen, interner Matrix und Nukleokapsid-Komponenten abhängig ist. Allgemein können cytoplasmatisch lokalisierte Domänen der Hüllproteine Interaktionen zum Nukleokapsid vermitteln. Beim Hepatitis B Virus ist das große Hüllprotein (L-Protein) für das Budding und die Sekretion der Viruspartikel essentiell (BRUSS & GANEM, 1991; SUMMERS et al., 1991). Der große N-terminale Bereich des L-Proteins ist auf der cytosolischen Seite des ER lokalisiert, und deshalb existiert die Vorstellung, dass Nukleokapside durch Anheftung an die cytosolisch exponierte präS-Domäne in den Exportweg eintreten.

Intrazelluläre Core-Partikel beinhalten virale Genome in verschiedenen Reifungsphasen, während sezernierte Viren nur reife, partiell dsDNA-Genome enthalten (SUMMERS & MASON, 1982). Diese Beobachtung weist daraufhin, dass durch die Genomreifung ein Signal generiert wird, durch das die selektive Umhüllung der reifen Nukleokapside erfolgt. Das Vorhandensein des Reifungssignals wurde durch Untersuchungen von Mutanten, in denen durch Inaktivierung der viralen Polymerase keine DNA-Synthese erfolgte und die Virusproduktion gehemmt wurde, bestätigt (GERELSAIKHAN et al., 1996; WEI et al., 1996). Es wurde vermutet, dass die Genomreifung zur Veränderung der Nukleokapsidstruktur führt, wodurch es zur Exposition der L-bindenden Seite auf der Partikeloberfläche kommen könnte (WEI et al., 1996; SUMMERS & MASON, 1982). Die Natur des Reifungssignals ist jedoch unklar. Unterschiedliche Vorstellungen sind vorstellbar: (i) Die Reifung könnte mit einer Exposition des C-Terminus an der Partikeloberfläche verbunden sein. Zwar konnten verschiedene Experimente zeigen, dass dieser Bereich des Proteins im Inneren des Partikels vorliegt (MACHIDA et al., 1991), andere Ergebnisse deuten jedoch daraufhin, dass er zum Teil auch nach außen exponiert ist (SCHLICHT et al., 1989). Der luminal gelegene C-Terminus ist von Bedeutung bei der endogenen Phosphorylierung der Core-Proteine (MACHIDA et al., 1991). Zum anderen sind die C-terminal gelegenen Arginin-reichen Kluster an der Verpackung des RNA-Prägenoms und der DNA-Synthese beteiligt (SCHLICHT et al., 1989; GALLINA et al., 1989; Yu & SUMMERS, 1991; HATTON et al., 1992; NASSAL, 1992a; ZHOU & STANDRING, 1992; BEAMES & LANFORD, 1993). (ii) Ein anderer Kandidat für das Umhüllungssignal wäre die kovalente Modifikation des Core-Proteins durch Phosphorylierung von Serinresten, die typisch für intrazelluläre Kapside ist, aber in sezernierten Virionen fehlt (Pugh et al., 1989; Schlicht et al., 1989).

Es ist z.B. vorstellbar (Abb. 47), dass nach erfolgter DNA-Synthese im Inneren der Kapside der C-Terminus durch die Poren (CROWTHER et al., 1994) nach außen gelangt und anschließend dephosphoryliert wird. Dadurch könnte die Anlagerung des Nukleokapsids an die negativ geladene Oberfläche der ER-Membran erfolgen, an der es im weiteren Verlauf zu einer Bindung des Kapsids an die Hüllproteine kommt. Durch das L-Protein könnte die Membranassoziation der Nukleokapside stabilisiert werden. Da der C-Terminus des Core-Proteins, wie schon erwähnt, ebenfalls an der Bindung der prägenomischen RNA und der DNA-Synthese im Inneren des Kapsids beteiligt ist, könnte das Core-Protein durch zwei verschiedene Faltungen mehrere Funktionen übernehmen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der C-Terminus oder dessen Phosphorylierungsstatus das Umhüllungssignal darstellt. Dazu wurden unreife und reife Nukleokapside durch proteinbiochemische Methoden miteinander verglichen.



**Abb. 47:** Der nach außen lokalisierte C-Terminus als mögliches Umhüllungssignal reifer Nukleokapside. Im Cytoplasma entstehen Kapside, die das virale RNA-Prägenom und die Polymerase enthalten. Im Inneren des Kapsids erfolgt die Reverse Transkription des Prägenoms und die Synthese der partiell doppelsträngigen DNA. Denkbar ist, dass während dieses Prozesses der C-Terminus nach außen gelangt und anschließend dephosphoryliert wird. Der positiv geladene C-Terminus wäre nun in der Lage, mit Phospholipiden oder zellulären Membranproteinen zu interagieren.

#### 5.1.1. Untersuchungen der Core-Protein-Phosphorylierung

Die Bedeutung der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung viraler Strukturproteine bei der Virusmorphogenese wurde für mehrere Viren nachgewiesen, wie z.B. für das Core-Protein V des Adenovirus (WEBER & KHITTO, 1983), das M-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (CHANG et al., 1994) oder das Virus-Protein VP11 des Vaccinia Virus (KAO & BAUER, 1987). Beim Rausher Murine Leukemia Virus wurde eine Auswirkung der Phosphorylierung auf die virale Genomreplikation gezeigt. Bei diesem Virus reguliert die Phosphorylierung des Strukturproteins p12 die virale Replikation und Transkription (SEN et al., 1977).

Das Core-Protein des HBV ist an Serinresten des C-Terminus phosphoryliert (MACHIDA et al., 1991; LIAO et al., 1995). Vermutlich ist eine zelluläre Proteinkinase, die in die Core-Partikel verpackt wird, dafür verantwortlich (YEH & OU, 1991; KANN & GERLICH, 1994; KAU & TING, 1998). Proteinkinase-Aktivität wurde außer in Core-Partikeln des HBV auch in denen des DHBV (PUGH et al., 1989), WHV (HANTZ et al., 1988) und GSHV (FEITELSON et al., 1982) gefunden.

Studien mit dem DHBV zeigten Unterschiede im Phosphorylierungsstatus des Core-Proteins intrazellulärer und extrazellulärer Kapsidproteine, wobei intrazelluläre Nukleo-kapside unterschiedlich stark phosphoryliert vorlagen, wohingegen die extrazellulären Nukleokapside ausschließlich dephosphoryliert waren (PUGH et al., 1989). Es wurde deshalb vermutet, dass die Dephosphorylierung ein Signal für die Umhüllung darstellt. Desweiteren wurde bei Studien mit dem DHBV festgestellt, dass bestimmte Phosphorylierungsmuster mit Konformationsänderungen assoziiert sind. Möglicherweise sind die verschiedenen Funktionen des Core-Proteins auf ein unterschiedliches Ausmaß der Phosphorylierung zurückzuführen (Yu & SUMMERS, 1994).

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob ein Unterschied in der Markierung reifer und unreifer Nukleokapside mit endogener bzw. exogener Proteinkinase bestand, der eventuell einen Hinweis für das Umhüllungssignal oder eine Konformationsänderung darstellte. Dazu wurden reife und unreife Nukleokapside aus den Zelllysaten isoliert, mit  $\gamma^{32}$ P-ATP sowie mit und ohne Zugabe von Proteinkinase C inkubiert. Die Experimente zeigten, dass eine Markierung reifer und unreifer Partikel mit endogener Proteinkinase erfolgte, aber kein quantitativer Unterschied zwischen der Phosphorylierung der beiden Kapsidspezies bestand. In den Ansätzen mit Proteinkinase C-Zugabe, die der Analyse möglicher nach außen exponierter C-Termini dienen sollte, konnte das Core-Protein durch den hohen Hintergrund nicht sichtbar gemacht werden. Auch eine Erhöhung der Stringenz der Waschschritte brachte keine Verminderung des Hintergrunds. Rekombinant in *E. coli* hergestellte Core-Partikel, die ebenfalls in die Markierungsexperimente eingesetzt worden

waren, wurden nur unter Zugabe von PKC phosphoryliert, da sie keine eigene Proteinkinase beinhalten. Da die Menge der phosphorylierten Core-Proteine aus reifen und unreifen Nukleokapsiden vergleichbar war, konnte nicht gezeigt werden, dass das Ausmaß der Phosphorylierung der Core-Proteine mit dem Reifegrad der Nukleokapside korrelierte. Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass das Ausmaß der Phosphorylierung das Umhüllungssignal darstellt.

KANN & GERLICH (1994) vermuteten, dass die Phosphorylierung des Core-Proteins erst stattfindet, wenn das RNA-Prägenom, die Polymerase und die Protein-Kinase in das Nukleokapsid verpackt sind. Ihrer Hypothese nach sollte sich der C-Terminus im Inneren befinden, wo die Phosphorylierung stattfindet. Die Phosphorylierung soll so die DNA-Bindung auflösen, wodurch DNA-Synthese erfolgen kann, und ebenso die Freilassung des C-Terminus, der zuvor an das Prägenom gebunden hat. In Immunpräzipitationsexperimenten mit einem monoklonalen Antikörper gegen die phosphorylierte C-terminale Domäne konnten keine Core-Partikel nachgewiesen werden. Erst nach Zerlegen intrazellulärer Nukleokapside, war ein Nachweis phosphorylierter Core-Proteine möglich (MACHIDA et al., 1991; HATTON et al., 1992). Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten wurde die Vermutung aufgestellt, dass die C-terminale Domäne unreifer Nukleokapside phosphoryliert vorliegt, um die DNA-Synthese im Inneren des Nukleokapsids zu ermöglichen. Demzufolge gelangt der C-terminale Teil der Core-Proteine nur in unphosphoryliertem Zustand an die Oberfläche. In dieser Arbeit wurde gezeigt, das sowohl bei reifen als auch bei unreifen Kapsiden nicht alle Serinreste im Inneren der Nukleokapside in phosphorylierter Form vorliegen. Vorstellbar ist, dass immer ein Teil der potentiellen Phosphorylierungsstellen Stabilisierung Partikelstruktur zur der unphosphoryliert sind.

Neben der RNA-Verpackung und DNA-Synthese spielt die Phosphorylierung eine weitere Rolle beim Kerntransport des Nukleokapsids. Es wurde gezeigt, dass nur phosphorylierte Kapside in den Zellkern gelangen, d.h. die Phosphorylierung des Core-Proteins könnte z.B. nötig sein, um ein Kernbindungssignal auf der Oberfläche zu exponieren (KANN et al., 1999).

#### 5.1.2. Untersuchungen zur Konformationsänderung des Core-Proteins

In Bindungsexperimenten konnte eine Assoziation reifer DNA-haltiger Nukleokapside mit aus COS7-Zellen präparierten Mikrosomen gezeigt werden (MABIT & SCHALLER, 2000; VIELUF, 1998). Daraufhin wurde eine mögliche Interaktion der Nukleokapside, z.B. über der Partikeloberfläche exponierten C-Terminus oder einen über eine Konformationsänderung des Core-Proteins. mit Bestandteilen der Membran

angenommen. Eine mögliche Vorstellung ist, dass der C-Terminus im Laufe der Genomreifung nach außen gelangt und das Umhüllungssignal darstellt. In unreifen Kapsiden dagegen sollte er im Inneren vorliegen (5.1.).

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit folgende Ansätze verwendet, mit denen die Topologie des C-Terminus in reifen und unreifen Nukleokapsiden verglichen wurde: 1. Membranbindung

- 2. DNA-Bindung
- 3. partieller Trypsin-Verdau.

#### 1. Membranbindung

Membranbindungsstudien beim Vesiculären Stomatitis Virus zeigten, dass das Matrixprotein M mit intrazellulären Membranen assoziiert, unabhängig von der Verteilung des Glykoproteins G, das Bestandteil der Hüllmembran ist (BERGMAN & FUSCO, 1988). Zhou et al. (1994) beschrieben eine ähnliche Assoziation zwischen dem Matrixprotein des HIV und der Zellmembran der Wirtszelle. Dabei bindet der positiv geladene N-Terminus des Matrixproteins an der Zellmembran. Die Anwesenheit von Hüllproteinen ist dafür nicht notwendig. Diese Studien legen die Vermutung nahe, dass virale Proteine, die in der Membran inseriert sind, die Selektivität der Zielmembran steuern, ohne direkt an der Bindung der Proteine beteiligt zu sein.

Die Membranbindung diente dazu, eine mögliche Assoziation DNA- und RNA-haltiger Nukleokapside zu Membranbestandteilen in Abwesenheit der Hüllproteine zu zeigen, die durch das Vorliegen einer bestimmten Konformation der Core-Proteine oder den an der Oberfläche lokalisierten C-Terminus vermittelt werden könnte. Dazu wurden beide Nukleokapsidspezies in Membranbindungsansätze eingesetzt und anschließend einer Flotationszentrifugation unterzogen. Der Nachweis der Kapside erfolgte im Gegensatz zu dem von VIELUF (1998) beschriebenen Protokoll durch metabolische Markierung der Proteine mit <sup>35</sup>S-Cystein/Methionin radioaktiv. Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass der Großteil der eingesetzten Nukleokapside sowohl in reifem als auch in unreifem Zustand in der schwersten Fraktion nachgewiesen wurde. Daneben koflotierte jeweils ein geringer Anteil mit den aus COS7-Zellen präparierten Mikrosomen. Dies deutete auf eine Bindung sowohl der DNA-haltigen als auch der RNA-haltigen Nukleokapside mit Membranen hin. Quantitativ unterschieden sich die Mengen der membranassoziierten DNA- und RNA-haltigen Nukleokapsiden nicht. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ein geringer Teil der Nukleokapside unabhängig vom Reifungsgrad und Vorhandensein viraler Hüllproteine in der Lage ist, an Mikrosomen zu binden.

Studien beim DHBV zeigten, dass eine selektive Membranbindung intrazellulärer Kapside an Membranen in Abwesenheit des großen Hüllproteins abhängig von den verschiedenen Reifungsstufen der Core-Partikel war. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen koflotierte die Hälfte der aus dem Zelllysat isolierten DHBV-Kapside mit Mikrosomen. Diese Nukleokapside enthielten überwiegend reife dsDNA und waren nicht phosphoryliert (MABIT & SCHALLER, 2000). Beides sind Merkmale, die charakteristisch für sezernierte Virionen sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten dagegen, dass beim HBV nur ein sehr geringer Teil der Kapside unabhängig vom Reifezustand mit der Zielmembran interagierte. Es ist unwahrscheinlich, dass die gezeigte Membranbindung der Kapside mit der Umhüllung in Zusammenhang steht, da nur DNA-haltige Kapside sezerniert werden. Denkbar wäre, dass beim HBV andere Faktoren mit den reifen Nukleokapsiden interagieren und in Assoziation mit Membrankomponenten und Hüllproteinen deren Umhüllung initiieren.

### 2. DNA-Bindung

Arginin-reiche Motive sind bei zahlreichen viralen Proteinen an der Bindung von Nukleinsäuren beteiligt, so z.B. bei den retroviralen RNA-Bindeproteinen HIV1 Rev und Tat (BURD & DREYFUSS, 1994) und dem Gag-Protein des HFV ("Human Foamy Virus"; YU et al., 1996).

Das HBV Core-Protein ist ebenfalls in der Lage, unspezifisch Nukleinsäuren zu binden (PETIT & PILLOT, 1985). Die DNA-Bindung erfolgte an denaturierten Core-Partikeln in wesentlich größerem Maße als an intakten Partikeln (MATSUDA et al., 1988). Durch Expression von C-terminal verkürztem Core-Protein und Wildtyp Core-Protein in *E. coli* wurde gezeigt, dass die Nukleinsäure-Bindung abhängig vom Vorhandensein des C-Terminus ist (GALLINA et al., 1989). Die Nukleinsäurebindungs-Motive liegen in diesem Bereich in vier Wiederholungen vor, von denen drei sogenannte SPRR-Motive darstellen. Diese Motive gehören zur SPXX-Familie und sind in DNA-Bindeproteinen wie z.B. Histonen vorhanden (HATTON et al., 1992).

Die DNA-Bindung an Core-Partikel bot demnach eine weitere Möglichkeit, die Exposition des C-Terminus an der Partikeloberfläche zu untersuchen. Dazu wurde radioaktivmarkierte DNA mit reifen und unreifen Nukleokapsiden inkubiert und nach mehreren Waschschritten die Radioaktivität in den Ansätzen bestimmt. Zur Ermittlung der Nukleokapsid-unabhängigen Bindung wurde ein mock-Ansatz als Negativkontrolle mitgeführt. Von den reifen und unreifen Nukleokapsiden wurde ca. dreimal mehr DNA gebunden als von der Negativkontrolle (24,2 %). Die Menge der an reife (67,4 %) und unreife Nukleokaspide (66,0 %) gebundenen DNA war identisch. In *E. coli* exprimierte

Partikel banden ca. 30 % der eingesetzten DNA. Diese Partikel konnten aber nicht mit den in Zellkultur exprimierten Kapsiden verglichen werden, da sie keine HBV-spezifische RNA und Polymerase verpacken und die Partikelpräparation weniger Verunreinigungen enthielt, so dass die unspezifische DNA-Bindung wahrscheinlich geringer war. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass hinsichtlich der DNA-Bindung kein Unterschied zwischen reifen und unreifen Nukeokapsiden bestand und sich diese Ansatz somit nicht zur Untersuchung der Lokalisation des C-Terminus eignete.

Untersuchungen mit dem DHBV-Core-Protein aus verschiedenen Expressionssystemen ließen darauf schließen, dass die dephosphorylierten, aber nicht die phosphorylierten Core-Proteine Nukleinsäuren binden (MACHIDA et al., 1991; HATTON et al., 1992). Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass sowohl RNA- als auch DNA-haltige Nukleokapside DNA binden, liegen die C-Termini, die diese Bindung vermitteln, möglicherweise dephosphoryliert vor.

### 3. Trypsin-Verdau

Der Trypsin-Verdau stellte möglicherweise eine zusätzliche Technik dar, Unterschiede in der Oberflächenexposition der C-Termini der Core-Proteine zwischen reifen und unreifen Nukleokapsiden zu identifizieren. In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei der Behandlung von rekombinant in *E. coli* und *Xenopus*-Oocyten hergestellten Kapsiden mit Trypsin ein unvollständiger Verdau stattfand (GALLINA et al., 1989; SEIFER & STANDRING, 1994). Bei der Behandlung von rekombinant in *E.coli* erzeugten Core-Partikeln mit Trypsin konnte eine begrenzte Proteolyse von Wildtyp Core-Partikeln nachgewiesen werden, wohingegen Partikel aus C-terminal verkürzten Core-Proteinen vor und nach Trypsin-Behandlung keine Unterschiede aufwiesen. Dies deutete darauf hin, dass die protaminähnliche Region teilweise an der Oberfläche zugänglich war (GALLINA et al., 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurden <sup>35</sup>S-Cystein/Methionin-markierte Nukleokapside mit jeweils 0 ng, 38,4 ng, 192 ng und 960 ng Trypsin inkubiert. Geringe Mengen Trypsin von 38,4 ng reichten aus, um einen unvollständigen Verdau der Core-Proteine beider Kapsidspezies zu erzeugen. Die Inkubation mit größeren Mengen Trypsin veränderte das Muster oder das Ausmaß des Proteaseverdaus nicht. Zwischen unreifen und reifen Kapsiden bestand kein Unterschied. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich bei Trypsin-Verdauen der Core-Partikel aus *E. coli* und aus *Xenopus*-Oocyten, wo eine Erhöhung der Inkubationszeit oder die Zugabe frischer Protease keinen Effekt auf das Verdaumuster bzw. auf die Vollständigkeit des Verdaus hatte (GALLINA et al., 1989; SEIFER & STANDRING, 1994).

Das Verhältnis vollständiger Core-Proteine zu C-terminal verkürzten Core-Proteinen betrug sowohl bei unreifen als auch bei reifen Nukleokapsiden ca. 1:1. Neben einem Hauptprodukt, dass mit einer Größe von 15 kD wahrscheinlich den N-terminalen 150 Aminosäuren des Core-Proteins entsprach, traten mehrere Zwischenprodukte auf. Zwischenprodukte resultierten möglicherweise aus der verschiedenen Argininklustern im C-Terminus. Analysen der Partikel aus Xenopus-Oocyten zeigten, dass 30-50 % der Core-Proteine verdaut wurden, wobei ein 16,9 kD großes Hauptfragment und mehrere Nebenfragmente nachgewiesen werden konnten (SEIFER & STANDRING, 1994). Dagegen wurde ein wesentlich geringerer Teil der Core-Proteine der Partikel aus E. coli unvollständig verdaut, und es waren keine Nebenprodukte nachweisbar. Diese Unterschiede sind vermutlich auf die verschiedenen Expressionssysteme zurückzuführen. Gemeinsam war den verschieden exprimierten Partikeln, dass kein Verdau der N-terminalen Domäne der Core-Proteine durch Trypsin erfolgte, wahrscheinlich blieb die Partikelstruktur bei allen erhalten.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass kein Unterschied zwischen DNA-haltigen und RNA-haltigen Nukleokapsiden bei Behandlung mit der Protease Trypsin bestand. Es kam auch beim Einsatz größerer Mengen Trypsin nicht zum vollständigen Verdau, was darauf hindeutete, dass ein Teil der C-Termini der Core-Proteine im Inneren der Partikel vor dem Protease-Verdau geschützt und ein Teil auf der Oberfläche der Nukleokapside lokalisiert sein musste.

Untersuchungen mit HBV Core-Partikeln aus N-terminal verlängerten Core-Proteinen, die in *E. coli* exprimiert wurden, zeigten eine unterschiedliche Topologie des C-Terminus im Vergleich zu Wildtyp-Kapsiden. Bei Kapsiden, die sich aus N-terminal um 14 Aminosäuren verlängerten Core-Proteinen zusammensetzten, wurden ähnlich wie in *Xenopus*-Oocyten und Hepatocyten exprimierten Kapsiden die Hälfte der Core-Proteine verdaut und dabei Zwischenprodukte gebildet (MAASSEN et al., 1994).

Die C-terminale Domäne des HBV-Core-Proteins konnte durch Epitope der Hüllproteine des HBV oder des HIV ersetzt werden. Bei der Expression dieser Core-Partikel in *E. coli* wurden die substituierten Domänen auf der Oberfläche der Kapside präsentiert und wirkten immunogen (STAHL & MURRAY, 1989). Diese Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass zumindestens ein Teil der C-terminalen Domänen der Core-Proteine im Core-Partikel nach außen gerichtet sind.

Trypsin-sensitive Bereiche wurden ebenfalls bei Untersuchungen von Kapsidstrukturen anderer Viren identifiziert. Die Abtrennung der Proteindomänen beeinflußte in diesen Fällen ebenfalls nicht das Vorliegen der Partikelstruktur. Ähnlich wie bei HBV Core-Partikeln wurden rekombinante Kapside des HPV ("Human Papillomavirus") Typ11 nach

Trypsin-Behandlung am C-Terminus gespalten. Das Hauptkapsid-Protein L1 des HPV assembliert in Pentamere, von denen nach Protease-Verdau die C-terminalen 86 Aminosäure-Reste des L1-Proteins abgetrennt wurden. Durch Sedimentationsversuche und Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die Pentamerstruktur erhalten blieb (LI et al., 1997). Bei rekombinanten VP1-Capsomeren des Polyomavirus wurden dagegen die N-terminalen 28 Aminosäuren des VP1-Proteins nach Trypsin-Inkubation entfernt, die Kapsomerstruktur lag aber auch in diesem Fall weiterhin vor (MORELAND et al., 1991). Es wurde in Betracht gezogen, dass bei der Inkubation der HBV-Nukleokapside mit Trypsin eine Diffusion ins Lumen erfolgen könnte, so dass auch innen gelegene C-Termini für die Protease zugänglich würden und deshalb keine Unterschiede bei der Oberflächenexposition der C-Termini der beiden Core-Partikelpräparationen festgestellt wurden. Durch Verwendung von an 40 nm Goldpartikeln gekoppeltem Trypsin (Au-Trypsin) wurde dieser Aspekt ausgeschlossen. Aufgrund der Goldpartikel sollte das Trypsin nicht in der Lage sein, durch die Poren in das Innere der Nukleokapside einzudringen (PD Dr. M. Kann, pers. Mitteilung). Eine weitere Modifikation der Protease-Behandlung stellte die Auftrennung der Partikel im Nycodenzgradienten (Röntgenkontrastmittel) dar, da sie hier stabiler sein sollten (PD Dr. M. Kann; pers. Mitteilung). Der Hauptanteil der reifen und unreifen Nukleokapside sedimentierte bei einer Dichte von 1,2 g/ml in Nycodenz. In der Literatur wurde beschrieben, dass dsDNA in Nycodenz leichter bandiert als ssRNA oder ssDNA (RICKWOOD, 1989). Beim Sendai-Virus ist es zudem gelungen, frühe und späte Formen in Nycodenz-Dichtegradienten voneinander zu trennen (NYCOMED, 1996). In dieser Arbeit wurden keine Unterschiede in der Sedimentation zwischen RNA- und DNA-haltigen Nukleokaspiden beobachtet. Der Verdau der beiden Partikelstrukturen mit Au-Trypsin zeigte, dass sie ebenfalls in gleichem Maße partiell verdaut wurden. Deutlich sichtbar war das C-terminal verkürzte Core-Protein mit einer Größe von 15 kD. Die Banden, die zwischen dem unverdauten Core-Protein und

Insgesamt konnte in dieser Arbeit kein Unterschied im Hinblick auf die Lokalisation der C-Termini oder die Konformation DNA- und RNA-haltiger Partikel gezeigt werden.

Protease-Verdau geschützt ist.

dem C-terminal verkürzten Core-Protein lagen, waren im Vergleich zu den Trypsin-Verdauen ohne Gold nicht so deutlich zu erkennen. Das Verhältnis zwischen vollständigem Core-Protein und verkürztem Core-Protein betrug ca. 1:1, was ebenfalls bei den Trypsin-Verdauen beobachtet werden konnte. Die Experimente zeigten, dass sowohl bei den reifen als auch bei den unreifen Partikeln ein Teil der C-Termini auf der Oberfläche der Nukleokapside zugänglich ist, ein anderer Teil im Inneren vor dem

Bezüglich der Ergebnisinterpretation der Partikelkonformation muss berücksichtigt werden, dass nach Transfektion von pSVHBV1.5 L<sup>-</sup> in Zellkultur nicht ausschließlich reife Nukleokapside, vielmehr auch frühere unreife Stadien mit prägenomischer RNA und einzelsträngiger DNA, vorlagen. Der Anteil reifer, ds DNA-haltiger Kapside betrug in Präparationen schätzungsweise 50 %. Möglicherweise diesen wurden unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich der Präparationen reifer und unreifer Kapside beobachtet, weil die Präparationen reifer Kapside immer auch unreife Kapside enthielten. Das tatsächliche Verhältnis dieser beiden Partikelarten zueinander ist nicht klar. Aus diesem Grund ist es schwierig zu beurteilen, ob ein unterschiedliches Verhalten reifer zu unreifer Kapside hätte sichtbar werden müssen. Da weiterhin gezeigt wurde, dass sowohl bei RNA-haltigen als auch bei DNA-haltigen Nukleokapsiden nur ein Teil der C-Termini an der Oberfläche exponiert ist, ist es unwahrscheinlich, dass der C-Terminus das Umhüllungssignal darstellt. Denkbar wäre, dass die außen lokalisierten C-Termini der Kapside an der Interaktion mit der ER-Membran beteiligt sind, aber ein zusätzlicher, bislang unbekannter Faktor nur reife DNA-haltige Nukleokapside erkennt und deren Umhüllung initiiert.

# 5.2. Einfluss der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins auf die Virionbildung

Das Nukleokapsid ist im Infektionszyklus des HBV von zentraler Bedeutung, da es bei vielen Schritten, wie z.B. der DNA-Synthese und Umhüllung an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, direkt beteiligt ist. Diese Morphogeneseschritte erfolgen unter Mitwirkung des C-Terminus der Core-Proteine (NASSAL, 1992a). Die C-terminale Aminosäure der Core-Proteine, ein Cysteinrest (in Position 185 beim Subtyp adw2; VALENZUELA et al., 1980), ist bei allen Orthohepadnaviren konserviert. Durch Immunpräzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass sich durch Deletion oder Substitution der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins die Oberflächenexposition der Protamin-ähnlichen Region in Xenopus-Oocyten-exprimierten Kapsiden erhöhte. Hierbei kam der Antikörper MAb T-2212 zum Einsatz, der lediglich die phosphorylierten Core-Protein Aminosäuren 165-175 erkannte. Eine Bindung konnte sowohl an Partikeln aus C-terminal verkürztem Core-Protein als auch an die Core-Proteinmutante, deren Cystein 185 durch ein Serin ersetzt wurde, nicht aber an Wildtyp Core-Partikel beobachtet werden (SEIFER & STANDRING, 1994). Es wurde angenommen, dass der C-Terminus über eine Disulfidbrückenbindung im Inneren der Partikel zurückgehalten wurde. In dieser Arbeit ist untersucht worden, ob das Cystein bei der Virusmorphogenese von Bedeutung

ist. Cysteine spielen durch Bildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken eine große Rolle bei der Entstehung von Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen. Daneben sind sie an der Nukleinsäurebindung von Zinkfingerproteinen oder Cystein-Histidin-Boxen retroviraler Nukleokapsidproteine (KATZ & JENTOFT, 1989) und im Cauliflower Mosaic Virus (COVEY, 1986) beteiligt.

Da die vorausgegangenen Untersuchungen zeigten, dass der C-Terminus sowohl im Inneren als auch auf der Oberfläche der Core-Partikel lokalisiert ist, ist es denkbar, dass die schwefelhaltige Seitenkette des Cysteins über Disulfidbrückenbildung eine Interaktion mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und den darin inserierten Hüllproteinen stabilisiert. Andererseits könnte das C-terminale Cystein bei der Nukleinsäurebindung und der viralen DNA-Synthese eine Rolle spielen. Womöglich vermittelt das Cystein die sterische Anordnung der einzelnen Komponenten zueinander und festigt deren Struktur innerhalb des Nukleokapsids.

Durch die Mutation des Cysteinrestes zu einem hydrophilen Serinrest sollte die Frage geklärt werden, ob die C-terminale Aminosäure einen Einfluss auf die DNA-Synthese und Umhüllung der Kapside hat. Es wurde untersucht, ob Virionen sezerniert wurden und in welchem Reifezustand die DNA in den Virionen vorlag. Die Mutante war in der Lage, virale DNA zu synthetisieren und Virionen in den Zellkulturüberstand zu sezernieren. Die im Lysat und im Zellkulturüberstand nachgewiesene Menge intrazellulär gebildeter Nukleokapside und sezernierter Virionen entsprach etwa der des Wildtyps. Die von den HuH7-Zellen ebenfalls im Zellüberstand freigesetzten nackten Kapside waren nach Dichtegradientenzentrifugation beim Wildtyp in einer Fraktion höherer Dichte lokalisiert als bei der Mutante C185S. Worauf die Unterschiede der Verteilung der nackten Kapside bei der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation zurückzuführen waren, blieb unklar. Bei der Core-Mutante C185S konnte nur ungefähr die Hälfte an nackten Nukleokapsiden im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden, wobei bei der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp mehr reife dsDNA nachgewiesen wurde, beim Wildtyp dagegen überwiegend unreife DNA. Denkbar ist, dass die Virus-Mutanten instabiler als der Wildtyp sind, und sie während der Aufarbeitung ihre Hülle verlieren und im CsCl-Gradienten als nackte Core-Partikel erscheinen. Bei der Bildung intrazellulärer Nukleokapside und der Virussekretion wurden keine Unterschiede beobachtet.

Die Untersuchung des Reifezustands der viralen DNA intra- und extrazellulärer Nukleokapside erfolgte durch Southern Blot-Analyse. Es wurde gezeigt, dass die Menge der nachgewiesenen DNA aus intrazellulären Nukleokapsiden und sezernierten Virionen im Vergleich zu der Kotransfektion mit dem Wildtyp Core-Protein unverändert war. Die aus dem Lysat isolierten Nukleokapside vom Wildtyp und der Mutante C185S enthielten

alle Formen der replikativen Intermediate. Quantitativ war der größte Anteil der nachgewiesenen DNA unreife HBV-DNA, deren Signal das der partiell dsDNA überlagerte. Die in das Medium sezernierten Virionen enthielten sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante hauptsächlich reife partiell dsDNA.

Es konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp Core-Protein und der Core-Mutante C185S bei der Virusbildung nachgewiesen werden. Folglich ist das Cystein an der Position 185 des Core-Proteins nicht essentiell für den untersuchten Teil des viralen Lebenszyklus: Die Core-Partikel assemblieren zu Partikeln, die das virale Prägenom und die Polymerase verpacken. In den Core-Partikeln findet DNA-Synthese statt und es erfolgt die Umhüllung der DNA-haltigen Partikel an der Membran des ER, was zur Sezernierung von Viren in den Zellkulturüberstand führt. Die Konservierung der C-terminalen Aminosäure innerhalb der Orthohepadnaviren muss daher eher auf andere Funktionen zurückzuführen sein. Möglicherweise ist die Stabilität der Mutante C185S im Vergleich zum Wildtyp geringer, was zu einem schnelleren Verlust der lipidhaltigen Hülle führt.

Im Unterschied zum HBV ist die C-terminale Aminosäure des DHBV Core-Proteins ein Alanin. Eventuell sind deshalb die C-Termini der Core-Proteine von DHBV-Kapsiden nicht über Disulfidbrücken miteinander verbunden und leichter an der Oberfläche zugänglich. So konnten DHBV-Partikel mit einem Antikörper, der gegen die C-terminalen 13 Aminosäurereste gerichtet ist, immunpräzipitiert (SCHLICHT et al., 1989) und Kapside nach Phosphatase-Behandlung an den Phosphat-Resten des C-Terminus modifiziert werden (PUGH et al., 1989).

Untersuchungen mit einem genomischen HBV Konstrukt des Suptyps *ayw*, das unter Kontrolle eines CMV ("Cytomegalovirus")-Promotors stand und bei dem alle vier Cysteinreste des C-Terminus des Core-Proteins individuell oder in Kombination gegen Serinreste ausgetauscht wurden, zeigten ebenfalls keine Unterschiede in der Endogenen Polymerasereaktion im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt (NASSAL, 1992b).

### 5.3. Bindung rekombinanter Core-Partikel an Peptide

POISSON et al. (1997) konnten in einem Peptidbindungsansatz eine Interaktion zwischen HBV Core-Proteinen und Peptiden zeigen, die zu Regionen des großen Hüllproteins identisch waren. Die Peptidsequenzen entsprachen zum einen den AS 96-116 der PräS-Region und zum anderen den AS 56-80 der S-Domäne. Dazu benutzten sie Peptide, die nach Konjugation mit BSA an eine Mikrotiterplatte gekoppelt waren. Neben diesem direkten Nachweis zeigten sie zusätzlich auf indirektem Weg, dass nach Vorinkubation mit den Peptiden eine Antikörperbindung an die Kapside blockiert wurde. Die Autoren

verwendeten Core-Partikel aus humanem infizierten Gewebe, um replikationskompetente Kapside einzusetzen. Hourioux et al. (2000) zeigten, dass auch rekombinant in *E. coli* hergestellte Kapside diese Bindung vermittelten.

Der Bereich der PräS-Region, der in der Bindungsstudie eine Interaktion mit Partikeln zeigte, war auch in Zellkulturexperimenten essentiell für die Virusbildung. Es wurde gezeigt, dass der Austausch der Aminosäuren 98 bis 124 der PräS-Region gegen andere willkürlich gewählte Aminosäuren die Bildung von Viruspartikeln inhibierte (BRUSS, 1997). In dieser Arbeit sollte die Bindung der Peptide an Core-Mutanten mit verminderter und blockierter Virionbildung untersucht werden. Die Bindungsversuche sollten eine Möglichkeit darstellen, eine Region des Core-Partikels zu kartieren, die mit den Hüllproteinen in Kontakt tritt. In den Bindungsstudien wurden Core-Mutanten eingesetzt, die in der Lage sind, funktionsfähige Nukleokapside zu bilden, aber in der Virussekretion gestört sind (KOSCHEL et al., 2000). Da auch eine Bindung zu in *E. coli* hergestellten Partikeln gezeigt worden, wurden die Mutanten in Form von rekombinanten Kapsiden, die Mutationen auf der Oberfläche tragen, hergestellt.

Neben den Peptiden (S2 und L4b), die eine Interaktion mit den Wildtyp Core-Partikeln zeigten, wurden drei weitere Peptide (S1, L2 und L4a) als Negativkontrollen eingesetzt. Das Peptid L4b, dass die AS 96 bis 116 der PräS-Region umfasst, interagierte mit den Core-Mutanten in ähnlich starker Weise wie der Wildtyp mit Ausnahme der Mutanten A11-V13 und A11-G10. Diese Mutanten zeigten eine niedrigere Bindungshemmung. Es ist denkbar, dass dieser N-terminale Bereich eine Rolle bei der Interaktion mit dem L-Protein spielt. Da aber die Mutante A11-G10 im Gegensatz zu A11-V13 noch in der Lage ist, intrazellulär gebildete Nukleokapside zu umhüllen und als Viren zu sezernieren, wird diese Vermutung nicht bekräftigt. Die Menge an gebildetem Virus liegt bei der Mutante A11-G10 deutlich unter Wildtyp Niveau, aber das Verhältnis intrazellulär gebildeter Core-Partikel zu sezernierten Viren ist ähnlich wie beim Wildtyp Core-Protein. So können Mutationen in diesem Bereich nicht allein auf die fehlende Interaktion mit dem großen Hüllprotein und der demzufolge nicht stattfindenden Umhüllung zurückgeführt werden. Alle Core-Mutanten zeigten ebenfalls eine Bindungshemmung an das HBcAgspezifische Serum nach Inkubation mit dem Peptid S2. Dabei konnten keine deutlichen Unterschiede für die verschiedenen Mutationen nachgewiesen werden. Die als Negativkontrollen verwendeten Peptide L2 und S1 zeigten wie erwartet keine Hemmwirkung im Test. Das Peptid L4a, das ebenfalls als Negativkontrolle verwendet wurde, wies eine Bindungshemmung nach Vorinkubation der Core-Partikel-Mutanten P50-E46 und S141-L140 auf. Denkbar ist, dass diese Bereiche aufgrund der vorliegenden Mutationen mit Strukturen der Hüllproteine in Kontakt treten, die nicht an der Virusmorphogenese beteiligt sind.

Insgesamt konnte, in dem in dieser Arbeit verwendeten indirekten Bindungsansatz, eine Interaktion zwischen rekombinant in *E. coli* hergestellten Kapsiden und synthetischen Peptiden gezeigt werden, unabhängig von den Mutationen des Core-Proteins. Es konnte auf dem Weg aber kein Bereich auf den Core-Partikeln identifiziert werden, der Kontakt zu den aus den Hüllproteinen abgeleiteten Regionen aufnahm. In dem hier beschriebenen *in vitro*-Bindungsansatz wurden Peptide mit einer Größe von 18 bis 27 Aminosäuren verwendet, deren Faltung variabel ist. Die Peptide stellten nur sehr kurze Bereiche der in der ER-Membran inserierten Hüllproteine dar, die eventuell anders gefaltet waren. Möglicherweise tolerierten deshalb die mutierten Core-Partikel die Bindung der Peptide S1 und L4b, waren aber nicht in der Lage, die entsprechenden Strukturen *in vivo* innerhalb der Hüllproteine zu binden.

Es wurde beobachtet, dass neben der Region in der PräS-Domäne (AS 96-116 der PräS-Region), die auch in Zellkulturexperimenten kartiert wurde (BRUSS, 1997), auch ein Bereich in der S-Domäne eine spezifische Bindung zeigte (AS 56-80 der S-Region). Dieser Bereich der S-Domäne liegt in der cytosolischen Schleife des S-Proteins und in der internen PräS-Form des L-Proteins vor. In dieser Region liegt an Position 79 ein Argininrest, von dem in Mutageneseexperimenten gezeigt wurde, dass er essentiell für die Virussekretion ist (LÖFFLER-MARY, et al., 2000).

Eine Assoziation zweier distinkter Bereiche innerhalb des großen Hüllproteins an rekombinanten Nukleokapsiden konnten TAN et al. (1999) in Ko-Immunpräzipitations-experimenten zeigen. Ein Bereich war innerhalb der PräS-Domäne und ein weiterer innerhalb der S-Region lokalisiert.

Bislang ist nicht bekannt, ob bei der Umhüllung DNA-haltiger Partikel noch weitere Mechanismen von Bedeutung sind. Denkbar wäre, dass DNA-haltige Kapside mit einem zellulären Faktor, wie z.B. Chaperonen, oder Elementen des Cytoskeletts interagieren. Damit übereinstimmend wäre die Beobachtung von ROINGEARD & SUREAU (1998), dass nach Transfektion von HepG2-Zellen mit HBV-DNA eine Anreicherung von Nukleokapsiden an spezifischen Regionen von Wirtszellkompartimenten stattfand, durch die eventuell der Transport DNA-haltiger Core-Partikel erfolgte. Möglicherweise ist der Bereich, der diese Interaktion vermittelt, bei den Core-Mutanten derart verändert, dass die Bindung gestört ist und deshalb keine Umhüllung der Nukleokapside erfolgte. Die Interaktion mit dem L-Protein hingegen, die bei allen Mutanten gezeigt wurde, könnte bei Wildtyp-Kapsiden diese Bindung stabilisieren.

### 5.4. Nachweis von cccDNA

In der frühen Phase der Infektion mit dem HBV wird das offen-zirkuläre partiell doppelsträngige virale DNA-Genom in den Zellkern der infizierten Hepatocyte transportiert und dort zur kovalent geschlossenen, zirkulären Form, der sogenannten cccDNA repariert. Dieses Episom dient als Template zur Synthese der viralen mRNAs einschließlich der prägenomischen RNA und ist damit Ausgangspunkt für die Vermehrung des Virus. Daneben wird cccDNA auch auf einem zweiten endogenen Weg gebildet: Nachdem das virale Genom vollständig transkribiert, die prägenomische RNA in Kapside verpackt und durch die virale reverse Transkriptase in die offen-zirkuläre DNA umgeschrieben wird, liegen im Cytoplasma Nukleokapside vor. Diese sind identisch aufgebaut wie das primär infizierende Nukleokapsid, können an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums umhüllt werden oder die Virus-DNA ebenfalls in den Zellkern entlassen, wo sie zur cccDNA überführt wird. Dieser endogene Prozess der cccDNA-Bildung lässt sich aus unbekannten Gründen nicht in transfizierten Zellen beobachten, wenn in den Zellen die Bildung der prägenomischen RNA veranlasst wird, obwohl nach Transfektion mit genomischen HBV DNA-Konstrukten infektiöses Virus in diesen Zellen gebildet werden kann. Weitere Schwierigkeiten bei der Untersuchung der cccDNA-Bildung beim HBV ergeben sich daraus, dass humane permanente Leberzelllinien aus ungeklärter Ursache vom HBV nicht infizierbar sind und die Kultivierung primärer Hepatocyten, die mit HBV infiziert werden können, äußerst schwierig ist. Beim DHBV dagegen sind Untersuchungen zur Regulation der cccDNA-Synthese und Mutantenanalysen leichter durchführbar, da cccDNA nach Infektion von primären Hepatocyten (Summers & Mason, 1982; Tuttlemann et al., 1986; Civitico & Locarnini, 1994) und Transfektion der aus Vögeln abgeleiteten Hepatomzelllinie LMH (Suммеrs et al., 1991; LENHOFF & SUMMERS, 1994a und b) nachgewiesen worden ist.

### 5.4.1. Nachweis von cccDNA im Southern Blot nach Transduktion des HBV-Genoms unter Kontrolle des endogenen Promotors

DELANEY & ISOM (1998) konnten nach Transduktion von HBV-DNA (Suptyp *ayw*) mittels rekombinanter Baculoviren in HepG2-Zellen die Bildung viraler cccDNA nachweisen. Damit bot sich eine Möglichkeit, Hepatomzellen durch Nutzung von Baculoviren als Genfähre zur Einschleusung der HBV-DNA *in vitro* quasi zu infizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Methode reproduziert und neben dem HBV Wildtyp-Genom auch bei einer Hüllprotein-negativen Mutante cccDNA nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle des Nachweis diente die RT-env-Mutante. Zur Charakterisierung der Baculovirus-

Infektionen wurden HBV-Antigenkonzentrationen zu mehreren Zeitpunkten nach Infektion bzw. Superinfektion der Zellen mit einer MOI von 50 bestimmt. Es zeigte sich, dass nach Transduktion der env- und RT env-Varianten vergleichbare Mengen HBeAg sezerniert wurden, wohingegen die Menge nach Transduktion des Wildtyp-Genoms um den Faktor 3 geringer war. Interessanterweise konnten DELANEY & ISOM (1998) weitaus größere Mengen HBsAg nach Transduktion von HepG2-Zellen nachweisen. Die in dieser Arbeit nach Infektion und Superinfektion mit einer MOI von 50 sezernierte Menge HBsAg ist mit der Menge an HBsAg nach Infektion mit einer MOI von 25 in der Arbeit von DELANEY & vergleichbar. & NASSAL (2001) benutzten rekombinante ISOM (1998) REN replikationsinkompetente Adenoviren, die das 1,3-faches HBV-Genom inseriert hatten, um primäre Tupaia-Hepatocyten und HuH7-Zellen zu transduzieren. Dabei entsprach die von Tupaia-Hepatocyten sezernierte Menge HBsAg annähernd der von DELANEY & ISOM (1998) nach Transduktion der HepG2-Zellen nachgewiesenen Menge bei gleicher MOI. HuH7-Zellen sezernierten deutlich weniger HBsAg. Die HBeAg-Konzentrationen der einzelnen Studien waren nicht miteinander vergleichbar, da verschiedene Testsysteme benutzt wurden.

Der Nachweis der cccDNA im Southern Blot zeigte, dass in Zellen einer 10 cm Schale, die mit dem Hüllprotein-negativen HBV-Genom transduziert wurden, ca. 10 pg cccDNA nachgewiesen werden konnten. In mit Wildtyp-Genom transduzierten Zellen waren die Signale sowohl der offen-zirkulären (oc)DNA als auch der cccDNA um ca. den Faktor 10 schwächer, aber das Verhältnis der beiden DNA-Formen zueinander identisch zu env-transduzierten Zellen. Anhand der Extraktionsmethode der cccDNA sollte keine offen-zirkuläre DNA, die Protein-assoziiert in neu synthetisierten Nukleokapsiden vorlag, in der Präparation vorhandensein. Möglicherweise wurde ein Teil der cccDNA während der Behandlung durch einen Einzelstrangbruch in ocDNA umgewandelt. In Korrelation mit den HBsAg-Mengen konnten Delaney & Isom (1998) ebenfalls größere Mengen cccDNA als in dieser Arbeit nachweisen. cccDNA konnte auch nach Transduktion von HBV-DNA mittels replikationsinkompetenter Adenoviren in primären Tupaia-Hepatocyten und HuH7-Zellen (REN & NASSAL, 2001) sowie primären humanen Hepatocyten (SPRINZL et al., 2001) detektiert werden. Wird die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene cccDNA-Menge in Relation zur Anzahl transduzierter Zellen gesetzt, lägen drei Kopien cccDNA pro Zelle vor. Die gleiche Anzahl wurde bei der Transduktion von HuH7-Zellen mittels rekombinanter Adenoviren gezeigt, wohingegen in Tupaia-Hepatocyten ca. sechs cccDNA-Moleküle pro Zelle vorlagen (REN & NASSAL, 2001). Nach in vitro-Infektion primärer Hepatocyten mit dem DHBV wurden nach Infektion 10 bis 50 cccDNA-Kopien pro Zelle nachgewiesen (TUTTLEMANN et al., 1986; WU et al., 1990).

Im DHBV-Modell ist bekannt, dass die Kopienzahl der cccDNA in der Frühphase der Infektion auf einem intrazellulären Weg zunächst amplifiziert und dann relativ konstant gehalten wird (TUTTLEMANN et al., 1986). Es ist gezeigt worden, dass das L-Protein einen Einfluss auf das Level der viralen cccDNA hat: Mutanten, bei denen die Expression des großen Hüllproteins blockiert war oder durch Mutationen im L-Protein in der Virusmorphogenese gehemmt waren, zeigten diese Regulation nicht, sondern akkumulierten größere Mengen an viraler cccDNA, wodurch die Zellen schließlich geschädigt wurden (SUMMERS et al., 1990; SUMMERS et al., 1991; LENHOFF & SUMMER; 1994b; LENHOFF et al., 1999). Dieser Effekt wurde auch gezeigt, wenn die Virionbildung durch Mutagenese des C-terminalen Bereichs der Prä-S-Region blockiert wurde, nicht hingegen bei Mutagenese des N-terminalen Bereichs, der keine Auswirkungen auf Virionbildung hatte (LENHOFF & SUMMERS, 1994a). Diese Beobachtung hat beim DHBV zu der Annahme geführt, dass die Menge an L-Protein über den intrazellulären Weg des Nukleokapsids mit entscheidet: Steigt die Konzentration des großen Hüllproteins, so entstehen vermehrt Buddingstellen in der Zelle, die neu synthetisierte Nukleokapside binden und exportieren und somit den nukleären Transport verhindern. Wie schon erwähnt, konnte in dieser Arbeit keine Akkumulation von cccDNA nach Transduktion des Hüllprotein-negativen HBV-Genoms beobachtet werden. Das Verhältnis der offenzirkulären DNA zur cccDNA war bei der env-Mutante mit dem Wildtyp vergleichbar, lediglich die Menge der nachgewiesenen DNA war verschieden. Diese Beobachtung stand in Übereinstimmung mit Untersuchungen der cccDNA-Bildung einer HBV-Mutante, die kein großes Hüllprotein exprimierte und durch rekombinante Adenoviren in Zellen transduziert wurde. Auch in diesem Fall kam es nicht zur Überamplifikation von cccDNA wie beim DHBV (SPRINZL et al., 2001). LING & HARRISON (1997) gelang nach Transfektion von HBV-Genomen der Nachweis von cccDNA im Southern Blot. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass die fehlende Expression jeweils eines Hüllproteins das cccDNA-Level nicht beeinflusste. Anscheinend findet beim HBV die Regulation des nukleären Transports des Nukleokapsids unabhängig von den Hüllproteinen statt. Denkbar wäre, dass die Regulation im Gegensatz dazu über Strukturen auf den Core-Partikeln erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass cccDNA nach Transduktion des Hüllprotein-negativen HBV-Genoms bis zu 12 Tage in passagierten Zellen persistierte. Dabei wurden die Zellen um den Faktor 9 verdünnt. Die Menge der nachgewiesenen cccDNA war am 7. und 12. Tag annähernd gleich und entsprach der Menge der doppelt infizierten Zellen nach 8 Tagen. Sezerniertes HBeAg war im Zeitraum von 3 bis 12 Tagen ebenfalls annähernd konstant. Da Hepatitis B Viren HepG2-Zellen nicht infizieren können, muss davon ausgegangen werden, dass die episomale Form (cccDNA) des HBV-Genoms

in dem Zeitraum durch intrazelluläre Amplifikation vermehrt und durch Zellteilung transduzierter Zellen weiterverbreitet wurde. Bei Studien mit dem WHV wurde beobachtet, dass cccDNA ebenfalls durch Weitergabe an die Tochterzellen die Behandlung mit einem Inhibitor der viralen DNA-Synthese (L-FMAU) in infizierten primären Woodchuck-Hepatocyten über einen Zeitraum von bis zu 30 Wochen überleben konnte (ZHU et al., 2001). Die Abnahme der cccDNA nach dem 12. Tag ist wahrscheinlich auf das Absterben cccDNA-haltiger Zellen zurückzuführen.

## 5.4.2. Indirekter Nachweis von cccDNA durch HBeAg nach Transduktion des HBV-Genoms unter Kontrolle des SV40-Promotors

Die Transduktion bzw. Transfektion eines HBV-Genoms, bei dem der prägenomische Promotor durch den SV40-Promotor ersetzt ist und der anschließende Nachweis von HBeAg sollte eine sensitive, schnell durchzuführende Nachweismethode von cccDNA und damit eine Alternative zum Southern Blot darstellen. Dem indirekten Nachweis von cccDNA mittels HBeAg lag folgende Vorstellung zugrunde: Durch Expression der prägenomischen RNA vom heterologen SV40-Promotor aus werden alle viralen Proteine translatiert mit Ausnahme von HBeAg, da der Präcore-Leserahmen unvollständig ist und deshalb keine HBeAg-mRNA gebildet wird. Die im Cytosol nach reverser Transkription und Translation gebildeten Nukleokapside sollten ihre DNA in den Zellkern entlassen und cccDNA auf diesem Weg intrazellulär amplifiziert werden. Infolge dessen käme es zur Wiederherstellung des Präcore/Core-Leserahmens von dem aus HBeAg-Bildung erfolgen könnte (Abb. 34 und 35). Demzufolge würde HBeAg einen indirekten Marker für cccDNA-Bildung darstellen. Wurde das SV40-HBV-Konstrukt in Form des Wildtyp-Genom, des L-Genoms und des RT env-Genoms (Negativkontrolle) in Hepatomzellen transfiziert, wurden bei den drei Konstrukten annähernd gleiche Mengen HBeAg nachgewiesen. Dieses Ergebnis führte zur Annahme, dass bei der Transfektion mit dieser Technik keine nachweisbare cccDNA gebildet wurde. Der Nachweis von cccDNA nach Transfektion von Zellen ist bislang nur von wenigen Arbeitsgruppen (LING & HARRISON, 1997) beschrieben worden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass nach einer Transfektion in den Zellen eine größere Menge an HBV-DNA vorliegt, so dass die viralen Proteine direkt von dieser DNA translatiert werden können und keine cccDNA-Bildung stattfindet. Bei einer Infektion dagegen, bei der nur wenige HBV-Genome in die Zelle gelangen, werden diese dann zunächst auf intrazellulärem Weg amplifiziert. Interessanterweise bildeten transgene Mäuse, die infektiöses HBV synthetisierten, ebenfalls keine cccDNA (Guidotti et al., 1995). Allerdings wurde im letzten Jahr beschrieben, dass eine transgene Maus, die

keinen Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  exprimiert, cccDNA bildete (RANEY et al., 2001), was auf eine veränderte Transkriptionsregulation der viralen DNA hinweist.

Der Nachweis intakter Nukleokapside und extrazelluläre Hepatitis B Virionen nach Transduktion rekombinanter Baculoviren des Typs BlueBac4.5-SVHBV1.5 wurde erwartet, da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass nach Transfektion des SVHBV1.5-Konstrukts Bildung von Virionen erfolgte (BURGER, 2000) und die Transkription des Prägenoms an derselben Position wie vom autologen Promotor aus startete (PD Dr. V. Bruß, persönliche Mitteilung).

Der Anteil BlueBac4.5-SVHBV1.5-transduzierter HepG2-Zellen wurde mittels HBcAgspezifischer Immunfluoreszenz in den Zellen untersucht. Dabei ließ sich HBcAg im Cytoplasma der Zellen nachweisen. Die Infektionseffiziens erhöhte sich mit Zunahme der eingesetzten MOI und betrug in mit einer MOI von 50 doppelt infizierten Zellen 30 %. DELANEY & ISOM (1998) konnten eine deutlich höhere Infektionseffizienz nach Transduktion von HepG2-Zellen mittels rekombinanter Baculoviren beobachten, bei einer MOI von 100 waren 75-85 % der Zellen HBcAg-positiv. Bei Verwendung des adenoviralen Vektors zur Transduktion von HBV-Genomen mit einer MOI von 100 in primäre humane Hepatocyten zeigten 5 % der Zellen HBcAg-spezifische Fluoreszenz (SPRINZL et al., 2001).

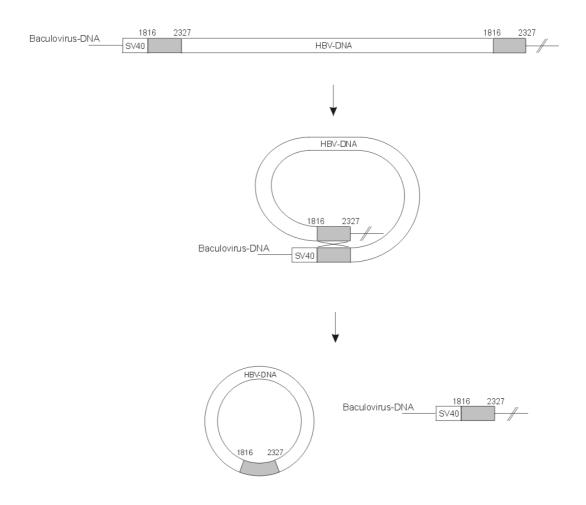
Die Transduktion des SV40-HBV1.5-Genoms führte im Vergleich zum RVHBV1.5-Konstrukt zu einer Steigerung der HBsAg-Konzentration im Kulturmedium um den Faktor 1,5. Nach Transduktion der Zellen mit BlueBac4.5-SVHBV1.5 wurde die Hälfte an HBeAg detektiert als nach Transduktion von BlueBac4.5-RVHBV1.5. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass vom SV40-HBV1.5-Genom keine HBeAg-mRNA gebildet wurde und HBeAg nur über den cccDNA-Weg synthetisiert werden konnte. Bei Zellen, die mit dem SVHBV1.5 RT env Genom (Negativkontrolle) transduziert worden waren, wurde ca. 1/5 der HBeAg-Menge als in SV40-HBV Wildtyp-Genom transduzierten Zellen nachgewiesen. Demzufolge konnte das nach Transduktion des SV40-HBV Wildtyp-Genoms detektierte HBeAg nicht nur auf Bildung von cccDNA zurückgeführt werden. Eventuell beeinflusste das Core-Protein den HBeAg-Nachweis. Zum direkten Nachweis von HBeAg wurden daraufhin Western Blot-Untersuchungen durchgeführt.

In der Literatur wurde beschrieben, dass bei der Expression von HBV in Zellkultur Subtypabhängig mehrere anti-HBeAg-reaktive Proteine, die Spaltprodukte des Präcore-Proteins darstellen, gebildet wurden (MCLACHLAN et al., 1987, SALFELD et al., 1989). SALFELD et al. (1989) konnten bei dem in dieser Arbeit verwendeten Subtyp *adw* mehrere HBeAgspezifische Banden mit einer Größe von 17 bis 21 kD in Seren infizierter Patienten und nach Transfektion von HBV-DNA im Zellkulturüberstand von HepG2-Zellen nachweisen.

Die Autoren führten diese auf proteolytische Spaltung durch Signal-Peptidasen zurück, da beim Subtyp adw in der Prozessierungsschnittstelle um Aminosäure 150 des Präcore/Core-Leserahmens eine Insertion von 2 Aminosäuren im Vergleich zum Subtyp ayw, wo nur ein 17 kD großes Protein sezerniert wurde, vorlag. Die Identifikation der HBespezifischen Proteine in HepG2-Zellen erfolgte in Western Blots mit Zellkulturüberständen transfizierter Zellen, die zum einen alle Virusproteine außer Core-Proteine (pRVHBV1.5 cATG<sup>-</sup>) und zum anderen alle viralen Proteine außer HBeAg (pSVHBV1.5) bzw. alle Virusproteine (pRVHBV1.5) exprimierten und anti-HBc/e-haltigem Serum F2760. Daraufhin wurden vier HBe-reaktive Proteine mit einer Größe von ca. 23 bis 17 kD identifiziert. Bei diesen Untersuchungen wurde nach Transfektion der Plasmide pSVHBV1.5 sowie pRVHBV1.5 ebenfalls Core-Protein detektiert, dass wahrscheinlich aus toten lysierten Zellen stammt, da Core-Proteine nicht aus HepG2-Zellen sezerniert werden und ein Verlust der Virushülle intakter Virionen unwahrscheinlich ist, da diese relativ stabil sind. Diese HBeAg-reaktiven Proteine konnten auch nach Transduktion des SV40-HBV Wildtyp-Genoms durch rekombinante Baculoviren, aber auch sehr schwach nach Transduktion des SV40-HBV RT env Genoms detektiert werden. Aus diesem Ergebniss wurde geschlussfolgert, dass HBeAg nicht nur auf cccDNA-Bildung zurückgeführt werden konnte, aber eventuell der Intensitätsunterschied der HBespezifischen Banden zwischen der Wildtyp- und der RT env -Variante auf cccDNA-Bildung hinwies.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurde in transduzierten Zellen die cccDNA-Synthese durch Lamivudin-Gabe gehemmt und der Zellkulturüberstand auf HBeAg-Bildung hin untersucht. Bei Studien mit dem WHV wurde gezeigt, dass die cccDNA-Bildung durch Lamivudin-Gabe vor Infektion von primären Woodchuck-Hepatocyten in vitro um 80 % verringert wurde (MORALEDA et al., 1997). Der inhibitorische Effekt des Lamivudins auf die cccDNA-Synthese in vitro konnte auch in Experimenten mit dem in dieser Arbeit verwendeten Transduktionssystem HBV DNA-tragender rekombinanter Baculoviren gezeigt werden (DELANEY et al., 1999). Dabei stellte sich heraus, dass die Wirkung des Lamivudins weniger effektiv war, wenn die Lamivudin-Behandlung 24 Stunden nach Infektion erfolgte und sich in den Zellen ein cccDNA-Pool etabliert hatte. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die DNA-Synthese sowohl nach sofortiger Gabe als auch nach Zugabe von Lamivudin nach vier Stunden nach Infektion inhibiert war. Es wurden keine funktionsfähigen Nukleokapside im Zelllysat nach Einsatz von 10 µM (Endkonzentration) Lamivudin detektiert. Die Analyse der Zellkulturüberstände dagegen zeigte keine quantitativen Unterschiede von HBeAg nach Transduktion des SV40-HBV Wildtyp-Genoms mit und ohne Zugabe von Lamivudin. Das bedeutet, dass trotz fehlender DNA-

Synthese HBeAg-Expression erfolgte. HBeAg konnte demzufolge nicht auf gebildete cccDNA zurückgeführt werden. Nach Transduktion des HBV-Genoms unter Kontrolle des endogenen Promotors (RVHBV1.5-Konstrukt) war wie erwartet kein Unterschied in der HBeAg-Bildung zu beobachten, da von diesem Konstrukt unabhängig von der cccDNA-Bildung HBeAg-mRNA transkribiert wurde. Bei den SV40-HBV RT env transduzierten Zellen wurde trotz fehlender DNA-Synthese Core-Protein gebildet, dessen Konzentration vor und nach Lamivudin-Zugabe gleich war. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Expression des Core-Proteins vom Baculovirus-Genom erfolgte. Eine andere Vorstellung, die auch die beobachtete Expression des HBeAg unabhängig von der DNA-Synthese und der intrazellulären Amplifikation der cccDNA erklären würde, ist, dass es in den HepG2-Zellen aufgrund der 511 bp-großen doppelt vorliegenden DNA-Bereiche an den Enden der inserierten HBV-DNA zu homologer Rekombination kam und dadurch zirkuläre HBV-Genome gebildet wurden, von denen die HBeAg-Expression erfolgte (Abb. 48). So wäre auch erklärbar, warum das SV40-HBV RT env -Konstrukt HBeAg bildete.



**Abb. 48:** Modell der homologen Rekombination des rekombinanten Baculovirus-Genoms. Rechtecke zeigen das HBV-Genom bzw. den SV40-Promotor, wobei die Positionszahlen darüber die Nukleotide relativ zur *Eco*RI-Erkennungssequenz des HBV-Genoms bezeichnen. Schwarze Linien stellen die Baculovirus-DNA dar. Der schattierte Bereich entspricht der terminalen Redundanz des Genoms von 511 bp.

Der Intensitätsunterschied zwischen der SV40-HBV Wildtyp- und RT env - Variante könnte eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die fehlende Synthese der viralen Polymerase und Hüllproteine in den Zellen eine verringerte HBeAg-Bildung zur Folge hat. Die für die homologe Rekombination benötigten Enzyme werden wahrscheinlich von der eingebrachten Baculovirus-DNA exprimiert, da nach Transfer des Plasmids pSVHBV1.5, in dem dieser DNA-Bereich ebenfalls doppelt vorliegt, keine HBeAg-Bildung beobachtet worden ist. Die Tatsache, dass die Herstellung rekombinanter Baculoviren in Insektenzellen ebenfalls durch homologe Rekombination erfolgt, bestätigt die Expression der dafür benötigten Proteine vom Baculovirus-Genom aus. Dieser experimentelle Ansatz ist demzufolge in der Form so nicht geeignet, um cccDNA nachzuweisen.

### 5.5 Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass nach Transduktion des HBV-Genoms mittels HBV-tragender rekombinanter Baculoviren cccDNA gebildet wird. Dabei ist es möglich gewesen, die cccDNA im Southern Blot nachzuweisen, der indirekte Nachweis mittels HBeAg ist wahrscheinlich aufgrund homologer Rekombination nicht praktikabel. Ein primäres Ziel weiterer Arbeiten ist die Etablierung einer einfachen und genauen Methode zur Quantifizierung von cccDNA, durch die die Analyse der Nukleokapsidumhüllung näher charakterisiert werden kann. Eine Möglichkeit besteht darin, rekombinante SV40-HBV-Baculoviren so zu konstruieren, dass der überlappende HBV-Bereich, der für die Virusreplikation benötigt wird, so klein wie möglich ist (< 50 bp), um homologe Rekombination auszuschließen und cccDNA über HBeAg nachweisen zu können. Anscheinend ist der nukleäre Transport des Nukleokapsids beim HBV nicht abhängig von den Hüllproteinen, sondern eventuell von räumlichen Strukturen der Core-Partikel. Um diese Strukturen näher einzugrenzen, könnten in der Arbeitsgruppe vorliegende Export-defiziente Core-Mutanten benutzt werden. Dazu müssten Zellen mit Expressionsvektoren für die mutierten Core-Proteine transient transfiziert werden und anschließend mit SV40-HBV-Baculoviren, deren Core-Protein Startkodon mutiert ist (cATG<sup>-</sup>), transduziert werden. In den Zellen sollte dann die virale cccDNA mittels HBeAg nachgewiesen werden können. Käme es zur Akkumulation von cccDNA bei einigen dieser Mutanten, wären so Strukturen identifiziert, die bei der Regulation des intrazellulären Transports der Nukleokapside von Bedeutung sind.

Bei den Untersuchungen zur Charakterisierung des Umhüllungssignals ist in dieser Arbeit festgestellt worden, dass der C-Terminus als postuliertes Signal des Core-Proteins bei reifen als auch bei unreifen Kapsiden identisch vorliegt. Möglicherweise ist das

Umhüllungssignal eher auf andere Oberflächenstrukturen der Core-Partikel zurückzuführen. Ein interessanter Aspekt zur Identifizierung des Umhüllungssignals liefert die Arbeit von LE POGAM & SHIH (2002). Die Autoren zeigen, dass die Core-Mutante F97L die Umhüllung unreifer, ssDNA-haltiger Nukleokapside erlaubt. Als Ursache ziehen sie eine veränderte Interaktion zwischen der Core-Mutante und den Hüllproteinen in Betracht, da die Wiederherstellung des selektiven Exports reifer Nukleokapside durch Mutation im PräS-Bereich an Position 119 von einem Alaninrest zu einem Phenylalaninrest erfolgt ist. Zur Klärung dieser Vermutung müsste ein Plasmid konstruiert werden, welches eine 1,5-fache Kopie des HBV-Genoms mit der Core-Mutation F97L und der RT-Mutation trägt. Durch die RT-Mutation verharrt das Nukleokapsid im unreifen Stadium und enthält ausschließlich das Prägenom. Würde das von dieser HBV-Mutante gebildete prägenomtragende Nukleokapsid dennoch umhüllt werden, könnte es bedeuten, dass die Coregen-Mutation F97L zu einer konsitutiven Expression des Reifungssignals führt.

### 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die reifungsabhängige Umhüllung des HBV-Nukleokapsids ist in vier Ansätzen experimentell untersucht worden.

- (i) Präparationen reifer und unreifer HBV-Nukleokapside sind durch folgende Techniken miteinander verglichen worden: Vergleich des Musters von Core-Proteinbanden, die nach Inkubation mit  $\gamma^{32}$ P-ATP durch die im Kapsid verpackte Proteinkinase markiert werden, Vergleich der DNA-Bindung und der Bindung der Partikel an Mikrosomen *in vitro*, sowie Vergleich des Musters von HBc-reaktiven Banden nach partiellem Trypsin-Verdau. Die Natur des Umhüllungssignals konnte auf diesem Weg nicht identifiziert werden, da kein unterschiedliches Verhalten von reifen und unreifen Partikeln in diesen Untersuchungen gefunden wurde.
- (ii) Das C-terminal konservierte Cystein des Core-Proteins könnte über die Bildung von Disulfidbrücken bei der Virusmorphogenese von Bedeutung sein. Um diese Möglichkeit zu evaluieren, wurde der Cysteinrest zu Serin verändert und der Einfluss dieser Mutation auf die Virussekretion in transient transfizierten HuH7-Zellen bestimmt. Es ist gezeigt worden, dass die Mutation keinen Einfluss auf die Virionbildung und DNA-Synthese in den Nukleokapsiden hat.
- (iii) Es wurden in Bakterien exprimierte und gereinigte Wildtyp-Kapside und Kapside aus mutierten Core-Proteinen, die replikationskompetent aber Morphogenese-defekt sind, in Peptidbindungsstudien eingesetzt. Es konnte eine Bindung der Peptide der AS 96-116 der PräS-Region sowie der AS 56-80 der S-Domäne sowohl an Wildtyp- als auch an alle Mutanten-Kapside gezeigt werden. Keine der Mutanten zeigte eine verringerte Bindung an die Peptide, so dass über diesen Ansatz keine Region des Core-Partikels identifiziert werden konnte, die mit den Hüllproteinen in Kontakt tritt.
- (iv) Die Bildung der nukleären cccDNA Form des HBV-Genoms ist *in vitro* nur sehr schwierig nachzuweisen, da es keine geeigneten *in vitro*-Infektionssysteme gibt und nach Transfektion kein nachweisbares HBV-Episom gebildet wird. In der vorliegenden Arbeit konnte virale cccDNA nach Transduktion des HBV-Genoms durch rekombinante Baculoviren nachgewiesen werden. Desweiteren bildete eine Hüllprotein-negative Mutante ebenfalls cccDNA, die über einen Zeitraum von 12 Tagen in passagierten Zellen persistierte. Es kam nicht wie beim DHBV zur Anreicherung von cccDNA bei dieser Mutante.

### 7. LITERATUR

ADEN, D.P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I., KNOWLESS, B.B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated liver carcinoma-derived cell line. Nature 282, 615-618.

ALTER, H.J., SEEF, L.B., KAPLAN, P.M., MCALIFFE, J., WRIGHT, E.C., GERIN, J.L., PURCELL, R.H., HOLLAND, P.V., ZIMMERMANN, H.J. (1976): The infectivity of blood positive for e antigen and polymerase after accidental needlestick exposure. New Engl. J. Med. 295, 909.

BARTENSCHLAGER, R., SCHALLER, H. (1988): The amino-terminal domain of the hepadnaviral P gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. EMBO J. 7, 4185-4192.

BARTENSCHLAGER, R., JUNKER-NIEPMANN, M., SCHALLER, H. (1990): The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. J. Virol. 64, 5342-5332.

BARTENSCHLAGER, R., SCHALLER, H. (1992): Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. EMBO J. 11, 3413-3420.

BEAMES, B., LANFORD, R.E. (1993): Carboxy-terminal truncations of the HBV core protein affect capsid formation and the apparent size of encapsidated HBV RNA. Virology 194, 597-607.

BEASLEY, R.P., HWANG, L.Y., LIN, C.C., CHIEN, C.S. (1981): Hepatocellular carcinom and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. Lancet 2, 1129-1133.

BERGMANN, J.E., FUSCO, P.J. (1988): The M protein of vesicular stomatitis virus associates specifically with the basolateral membranes of polarized epithelial cells independently of the G protein. J. Cell. Biol. 107, 1707-1715.

BERLYN, M.K.B., BROOKS LOW, K., RUDD, K.E. (1996): Linkage map of *Escherichia coli* K12. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology (Neidhardt, F.C., Curtis III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H.E.; Hrsg.), S. 1715-1902; ASM Press, Washington, D.C.

BIRNBAUM, F., NASSAL, M. (1990): Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. J. Virol. 64, 3319-3330.

BIRNBOIM, C., DOLY, P. (1979): A rapid alkaline extraction procedur for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. Res. 7, 1513-1515.

BLUM, H.E., HAASE, A.T., HARRIS, J.D., WALKER, D., VYAS, G.N. (1984): Asymmetric replication of hepatitis B virus DNA in human liver: demonstration of cytoplasmic minusstrand DNA by dot blot analysis and *in situ* hybridization. Virology 139, 87-96.

BLUM, H.E., ZHANG, Z.S., GALUN, E., WEIZSÄCKER, F., GARNER, B., LIANG, T.J., WANDS, J.R. (1992): Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle *in vitro*. J. Virol. 66, 1223-1227.

BLUMBERG, B.S., ALTER, H.J., VISNICH, S. (1965): A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 191, 541.

BOCK, C.T., SCHWINN, S., SCHRODER, C.H., VELHAGEN, I., ZENTGRAF, H. (1996): Localization of hepatitis B virus core protein and viral DNA at the nuclear membrane. Virus-Genes 12, 53-63.

BONINO, F., BRUNETTO, M.R., RIZETTO, M., WILL, H. (1991): Hepatitis B virus unable to secrete "e" antigen. Gastroenterology 100, 1138-1141.

BRUNETTO, M.R., STEMMLER, M., SCHÖDEL, F., WILL, H., OTTOBRELLI, A., RIZETTO, M., BONINO, F. (1989): Identification of HBV variants which cannot produce precore-derived HBeAg and may be responsible for serve hepatitis. Ital. J. Gastroenterol. 21, 151-1554.

BRUNETTO, M.R., GIARIN, M.M., OLIVERI, F., CHIABERGE, E., BALDI, M., ALFRARANO, A., SERRA, A., SACARRO, G., WILL, H., BONINO, F. (1991): Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4186-4190.

BRUSS, V., GERLICH, W.H. (1988): Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational *in vitro* processing of the viral precore protein. Virology 163, 268-275.

BRUSS, V., GANEM, D. (1991): The role of envelope protein in hepatitis B virus assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1059-1063.

BRUSS, V. (1997): A short linear sequenz in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. J. Virol. 71, 9350-9357.

BURD, C.G., DREYFUSS, G. (1994): Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. Science 265, 615-621.

BURGER, S. (2000): Expression des Hepatitis B Virusgenoms in Nicht-Hepatomzellen unter Kontrolle eines heterologen prägenomischen Promotors. Diplomarbeit, Georg-August-Universität zu Göttingen.

BURNETTE, W.N. (1981): "Western Blotting": Elektrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. Anal. Biochem. 112, 195-203.

CHANG, L.J., HIRSCH, R.C., GANEM, D., VARMUS, H.E. (1990): Effects of insertional and point mutations on the functions of the duck hepatitis B virus polymerase. J. Virol. 64, 5553-5558.

CHANG, T.L., REISS, C.S., HUANG, A.S. (1994): Inhibition of vesicular stomatitis Virus RNA synthesis by protein hyperphosphorylation. J. Virol. 68, 4980-4987.

CHARNAY, P., POURCEL, C., LOUISE, A., FRITCH, A., TIOLLAIS, P. (1979): Cloning in *E. coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2222-2226.

CHESTER, N., MARSHAK, D.R. (1983): Dimethyl sulfoxid-mediated primer Tm reduction: A method for analyzing the role of renaturating temperature in the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 209, 284-290.

CHIEN, A., EDGAR, D.B., TRELA, J.M. (1976): Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. J. Bact. 127; 1550.

CHOI, S.S., RASSHOFER, R., ROGGENDORF, M. (1988): Propagation of woodchuck hepatitis Delta virus in primary woodchuck hepatocytes. Virology 167, 451-457.

CIVITICO, G.M., LOCARNINI, S.A. (1994): The half-life of duck hepatitis B virus supercoiled DNA in congenitally infected primary hepatocyte cultures. Virology 203, 81-89.

COHEN, B.J., RICHMOND, J.E. (1982): Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. Nature 296, 677-678.

CONWAY, J.F., CHENG, N., ZLOTNIK, A., WINGFIELD, P.T., STAHL, S.J., STEVEN, A.C. (1997): Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. Nature 386, 91-94.

COVEY, S.N. (1986): Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. Nucleic Acids Res. 14, 623-632.

CROWTHER, R.A., KISELEV, N.A., BÖTTCHER, J.A., BERRIMAN, J.A., BORISOVA, G.P., OSE, V., PUMPENS, P. (1994): Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. Cell 77, 943-950.

DANE, D.S., CAMERON, C.H., BRIGGS, M. (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australien-antigen-associated hepatitis. Lancet 1, 695-698.

DELANEY, W.E., ISOM, H.C. (1998): Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant Baculovirus. Hepatology 28, 1134-1146.

DELANEY, W.E., MILLER, T.G., ISOM, H.C. (1999): Use of the hepatitis B virus recombinant baculovirus-HepG2 system to study the effects of (-)- $\beta$ -2′,3′-dideoxy-3′-thiacytidine on replication of hepatitis B virus and accumulation of covalently closed circular DNA. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2017-2026.

DI, Q., SUMMERS, J., BURCH, J.B., MASON, W.S. (1997): Major differences between WHV and HBV in regulation of transcription. Virology 229, 25-35.

ENDERS, G.H., GANEM, D., VARMUS, H.E. (1987): 5'-terminal sequences influence the segregation of ground squirrel hepatitis virus RNAs into polyribosomes and viral core particles. J. Virol. 61, 35-41.

FEITELSON, M., MARION, P.L., ROBINSON, W.S. (1982): Core particles of hepatitis B virus and ground squirrel hepatitis virus II. Characterization of the protein kinase reaction associated with ground squirrel hepatitis B virus. J. Virol. 43, 741-748.

GALIBERT, F., MANDART, E., FITOUSSI, F., TIOLLAIS, P., CHARNAY, P. (1979): Nucleotide sequence of the Hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. Nature 281, 646-650.

GALLE, P.R., SCHLICHT, H.J., KUHN, C., SCHALLER, H. (1989): Replication of duck hepatitis B virus in primary duck hepatocytes and its dependence on the state of differentiation of the host cell. Hepatology 10, 459-465.

GALLINA A., BONELLI, G., ZENTILIN, I., RINDI, G., MUTTINI, M., MILANESI, G. (1989): A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. J. Virol. 63, 4645-4652.

GANEM, D., VARMUS, H.E. (1987): The molecular biology of the hepatitis B viruses. Ann. Rev. Biochem. 56, 761-766.

GANEM, D. (1996): Hepadnaviridae and their replication. In: Fields Virology. Third Edition. Hrsg. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M.; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

GAROFF, H., HEWSON, R., OPSTELTEN, D.J. (1998): Virus maturation by budding. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1171-1190.

GERELSAIKHAN, T., TAVIS, J.E., BRUSS, V. (1996): Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. J. Virol. 70, 4269-4274.

GERLICH, W.H., ROBINSON, W.S. (1980): Hepatitis B virus contains protein attached to the 5'-terminus of its complete DNA strand. Cell 21, 801-809.

GERLICH, W.H., GOLDMANN, U., MÜLLER, R., STIBBE, W., WOLFF, W. (1982): Specifity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. J. Virol. 42, 761-766.

GLUZMANN, Y. (1981): SV40 transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell 23, 175-182.

GRIPON, P., DIOT, C., THEZE, N., FOUREL, O., LOREAL, O., BRECHOT, C., GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1988): Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxid. J. Virol. 62, 4136-4143.

GUIDOTTI, L.G., MARTINEZ, V., LOH, Y.T., ROGLER, C.E., CHISARI, F.V. (1994): Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice. J. Virol. 68, 5469-5475.

GUIDOTTI, L.G., MATZKE, B., SCHALLER, H., CHISARI, F.V. (1995): High-level hepatitis B replication in transgenic mice. J. Virol. 69, 6158-6169.

HANAFUSA, T., YUMOTO, Y., HADA, H., SHINJI, T., KOIDE, N., TSUJI, T. (1999): Replication of hepatitis B virus which carries foreign DNA *in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 262, 530-533.

HANAHAN, D. (1983): Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

HANTZ, O., FOUREL, I., BUENDIA, B., BOGINSKI, I., TREGO, C. (1988): Specify of the woodchuck hepatitis virus-associated protein kinase. Viral hepatitis and liver disease. Alan R. Liss, Inc., New York.

HATTON, T., ZHOU, S., STANDRING, D.N. (1992): RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. J. Virol. 66, 5232-5241.

HEERMANN, K.H., GOLDMANN, U., SCHWARTZ, W., SEYFFARTH, T., BAUMGARTEN, H., GERLICH, W.H. (1984): Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. J. Virol. 52, 396-402.

HIRSCH, R.C., LOEB, D.D., POLLAK, J.R., DANEM, D. (1991): Cis-acting sequences required for encapsidation of duck hepatitis B virus pregenomic RNA. J. Virol. 65, 3309-3316.

HOLLINGER, F.B. (1991): Hepatitis B virus. In: Viral Hepatitis. (Hollinger, F.B., Robinson, W.S., Purcell, H., Gerin, J.L., Ticeburst, J.; Hrsg.), S. 73-122, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press.

HOURIOUX, C., TOUZE, A., COURSAGET, P., ROINGARD, P. (2000): DNA-containing and empty hepatitis B virus core particles bind similarly to envelope protein domains. J. Gen. Virol. 81, 1099-1101.

HOWE, A., TYRELL, D. (1996): Duck hepatitis B polymerase acts as a suppressor of core protein translation. J. Virol. 70, 5035-5042.

HRUSKA, J.F., CLAYTON, D.A., RUBENSTEIN, J.L.R., ROBINSON, W.S. (1977): Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. J. Virol. 21, 666-672.

HUANG, M.J., SUMMERS, J. (1991): Infection initiated by the RNA pregenome of a DNA virus. J. Virol. 65, 5435-5439.

HUOVILA, A.P., EDER, A.M., FULLER, S.D. (1992): Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. J. Cell. Biol. 118, 1305-1320.

JEONG, J.K., YOON, G.S., RYU, W.S. (2000): Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. J. Virol. 74, 5502-5508.

JUNKER-NIEPMANN, M., BARTENSCHLAGER, R., SCHALLER, H. (1990): A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. EMBO J. 9, 3389-3396.

KANN, M., BISCHOF, A., GERLICH, W.H. (1997): In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. J. Virol. 71, 4-11.

KANN, M., GERLICH, W.H., (1994): Effect of core-protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. J. Virol. 68, 7993-8000.

KANN, M., SODEIK, B., VLACHOU, A., GERLICH, W.H., HELENIUS, A. (1999): Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. J. Cell. Biol. 145, 45-55.

KAO, S.Y., BAUER, W.R. (1987): Biosynthesis and phosphorylation of vaccinia virus structural protein VP11. Virol. 159, 399-407.

KAPLAN, P.M., GREENMAN, R.L., GERIN, J.L., PURCELL, R.H., ROBINSON, W.S. (1973): DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. J. Virol. 12, 995-1005.

KATZ, R.A., JENTOFT, J.E. (1989): What is the role of the cys-his motif in retroviral nucleocapsids (NC) proteins? Bioessays 11, 176-181.

KAU, J.H., TING, L.P. (1998): Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46 kD serine kinase. J. Virol. 72. 3796-3803.

KEKULE, A.S., LAUER, U., WEISS, L., LUBER, B., HOFSCHNEIDER, P.H. (1993): Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promotor signalling pathway. Nature 361, 742-745.

KITTS, P.A. & POSSEE, R.D. (1993): A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at a high frequency. BioTechniques 14, 810-817.

KÖCK, J., SCHLICHT, H.J. (1993): Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depent on viral polymerase activity. J. Virol. 67, 4867-4874.

KÖCK, J., NASSAL., M., MACNELLY, S., BAUMERT, T.F., BLUM, H.E., V.WEIZSÄCKER, F. (2001): Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. J. Virol. 75, 5084-5089.

KOLMAR H., FRIEDRICH, K., PSCHORR, J., FRITZ, H.-J. (1990): Hybrids of circular DNA single strands as intermediates in DNA cloning, sequence analysis and direct mutagenesis. Technics 2, 237-245.

KOSCHEL, M., THOMSSEN, R., BRUSS, V. (1999): Extensive mutagenesis of the hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation. J. Virol. 73: 2153-2160.

KOSCHEL., M., OED, D., GERELSAIKHAN, T., THOMSSEN, R., BRUSS, V. (2000): Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. J. Virol. 74, 1-7.

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

LANDERS, T.A., GREENBERG, H.B., ROBINSON, W.S. (1977): Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. J. Virol. 23, 368-376.

LANFORD, R.E., NOTVALL, L. (1990): Expression of hepatitis B virus core and precore antigens in insect cells and characterization of a core-associated kinase activity. Virology 176, 222-233.

LANFORD, R.E., NOTVALL, L., BEAMES, B. (1995): Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells. J. Virol. 69, 4431-4439.

LANFORD, R.E., CHAVEZ, D., BRASKY, K.M., BURNS III, R.B., RICO-HESSE, R. (1998): Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5757-5761.

LANFORD, R.E., YOUNG-HO, K., LEE, H., NOTVALL, L., BEAMES, B. (1999): Mapping of the hepatitis B virus Reverse Transcriptase TP and RT domains by transcomplementation for nucleotide priming and by protein-protein interaction. J. Virol. 73, 1885-1893.

LENHOFF, R.J., SUMMERS, J. (1994a): Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. J. Virol. 68, 4565-4571.

- LENHOFF, R.J., SUMMERS, J. (1994b): Construction of avian hepadnavirus variants with enhanced replication and cytopathicity in primary hepatocytes. J. Virol. 68, 5706-5713.
- LENHOFF, R.J., LUSCOMBE, C.A., SUMMERS, J. (1999): Acute liver injury following infection with a cytopathic strain of duck hepatitis B virus. Hepatology 29, 563-571.
- LE POGAM, S., SHIH, C. (2002): Influence of a putative intermolecular interaction between core and the preS1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus secretion. J. Virol. 76, 6510-6517.
- LE SEYEC, J., CHOUTEAU, P., CANNIE, I., GUGUEN-GUILLOUZO, C., GRIPON, P. (1999): Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. J. Virol. 73, 2052-2057.
- LI, M., CRIPE, T.P., ESTES, P.A., LYON, M.K., ROSE, R.C., GARCEA, R.L. (1997): Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA bindung and capsid asembly. J. Virol. 71, 2988-2995.
- LIAO, W., Ou, J.H. (1995): Phosphorylation and nuclear localisation of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SRRRR motifs. J. Virol. 69, 1025-1029.
- LIEN, J.-M., ALDRICH, C.E., MASON, W.S. (1986): Evidence that the capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. J. Virol. 57, 229-236.
- LIEN, J.-M., PETCU, D.J., ALDRICH, C.E., MASON, W.S. (1987): Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. J. Virol. 61, 3832-3840.
- LING, R., HARRISON, T.J. (1997): Production of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in transfected cells is independent of surface antigen synthesis. J. Gen. Virol. 78, 1463-1467.
- LOEB, D.D., HIRSCH, R.C., GANEM, D. (1991): Sequence-independent RNA cleavages generate the primer for plus-strand synthesis of hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. EMBO J. 10, 3533-3540.
- LÖFFLER-MARY, H., DUMORTIER, J., KLENTSCH-ZIMMER, C., PRANGE, R. (2000): Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. Virology 270, 358-367.
- MAASSEN, A., REHFELDT, A., KIESSIG, S., LADHOFF, A., HOHNE, W.E., MEISEL, H. (1994): Comparison of three different recombinant hepatitis B virus core particles expressed in *Escherichia coli*. Arch. Virol. 135, 131-142.
- MABIT, H., SCHALLER, H. (2000): Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding. J. Virol. 74, 11472-11478.
- MACHIDA, A., KISHIMOTO, S., OHNUMA, H., BABA, K., ITO, Y., MIYAMOTO, H., FUNATSU, G., ODA, K., NAKAMURA, T., MIYAKAWA, Y. (1983): A hepatitis B surface antigen polypeptide (P31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. Gastroenterol. 85, 268-274.

MACHIDA, A., KISHIMOTO, S., OHNUMA, H., BABA, K., ITO, Y., MIYAMOTO, H., FUNATSU, G., ODA, K., USUDA, S., TOGAMI, S., NAKAMURA, T., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M. (1984): A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus desoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. Gastroenterol. 86, 910-918.

MACHIDA, A., OHNUMA, H., TSUDA, F., YOSHIKAWA, A., HOSHI, Y., TANAKA, T., KISHIMOTO, S., AKAHANE, Y., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M. (1991): Phosphorylation in the carboxylterminal domain on the capsid protein of the hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody. J. Virol. 64, 6024-6030.

MARION, P.L., OSHIRO, L.S., REGNERY, D.C., SCULLARD, G.H., ROBINSON, W.S. (1980): A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2941-2945.

MASON, W.S., SEAL, G., SUMMERS, J. (1980): Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. J. Virol. 36, 829-836.

MATSUDA, K., SATOH, S., OHORI, H. (1988): DNA-binding activity of hepatitis B e antigen polypeptide lacking the protaminelike sequence of nucleocapsid protein of human hepatitis B virus. J. Virol. 62, 3517-3521.

MCALEER, W.J., BUYNAK, E.B., MAIGETTER, R.Z., WAMPLER, D.E., MILLER, W.J., HILLEMAN, M.R. (1984): Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature 307, 178-180.

MCKAY, P., LEESM, J., MURRAY, K. (1981): The conversation of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli* into e-antigen. J. Med. Virol. 8, 237-243.

MORELAND, R.B., MONTROSS, L., GARCEA, R.L. (1991): Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein vp1. J. Virol. 65, 1168-1176.

MCLACHLAN, A., MILICH, D.R., RANEY, A.K., RIGGS, M.G., HUGHES, J.L., SORGE, J., CHISARI, F.V. (1987): Expression of hepatitis B virus surface and core antigens: influences of pre-S and precore sequences. J. Virol. 61, 683-692.

MORALEDA, G., SAPUTELLI, J., ALDRICH, C.E., AVERETT, D., CONDREAY, L., MASON, W.S. (1997): Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. J. Virol. 71, 9392-9399.

NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T., SATO., J. (1982): Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42, 3858-3863.

NASSAL, M., JUNKER-NIEPMANN, M., SCHALLER, H. (1990): Translation inactivation of RNA function: discrimination against a subset of genomic transcripts during HBV nucleocapsid assembly. Cell 63, 1357-1363.

NASSAL., M. (1992a): The arginine rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. J. Virol. 66, 4107-4116.

NASSAL, M. (1992b): Conserved cysteines of the hepatitis B virus core protein are not required for assembly of replication-competent core particles nor for their envelopment. Virology 190, 499-505.

NEURATH, A.R., KENT, S.B., STRICK, N., TAYLOR, P., STEVENS, C.E. (1985): Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. Nature 315, 154-156.

NYCOMED (1996): Centrifugation techniques 1- Nycodenz. Density Gradient Media.

OKADA, K., KANIYAMA, I., INOMATA, M., MIYAKAVA, M., MAYUMI, M. (1976): E-antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infant. New Engl. J. Med. 294, 746-749.

O'REILLY, J.R., MILLER, L.K., LUCKOW, V.A. (1994): Virus methods. In: Baculovirus expression vectors. New York: Oxford University Press, S. 124-138.

Ou, J.-H., LAUB, O., RUTTER, W.J. (1986): Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1578-1582.

PARAN, N., GEIGER, B., SHAUL, Y. (2001): HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. EMBO J. 20, 4443-4453.

PAYNE, R.J., NOWAK, M.A., BLUMBERG, B.S. (1996): The dynamics of hepatitis B virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6542-6546.

PERSING, D.H., VARMUS, H., GANEM, D. (1986): The preS1 protein is acylated at its amino terminus with myristic acid. J. Virol. 61, 6975-6983.

PETERSON, D.L. (1981): Isolation and characterization of the major protein and glykoprotein of hepatitis B surface antigen. J. Biol. Chem. 256, 6975-6983.

PETIT, M.A., PILLOT, J. (1985): HBc and HBe antigenicity and DNA binding affinity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. J. Virol. 53, 543-551.

PFAFF, E., KLINKERT, M.Q., THEILMANN, L., SCHALLER, H. (1986): Characterization of large surface proteins of hepatitis B virus by antibodies to pre-S encoded amino acids. Virology 148, 15-22.

POISSON, F., SEVERAC, A., HOURIOUX, C., GOUDEAU, A., ROINGARD, P. (1997): Both pre-S1 and S domains of the hepatitis B virus envelope proteins interacts with the core particle. Virology 228, 115-120.

POLLAK, J.R., GANEM, D. (1993): An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. J. Virol. 67, 3254-3263.

PRANGE, R., NAGEL, R., STREECK, R.E. (1992): Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: Effect on assembly and secretion of surface antigen particles. J. Virol. 65, 3919-3923.

PRANGE, R., STREECK, R.E. (1995): Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. EMBO J. 14, 247-256.

PROTZER, U., NASSAL, M., CHIANG, P.W., KIRSCHFINK, M., SCHALLER, H. (1999): Interferon gene transfer by a hepatitis B vector efficiently suppresses wild-type virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10818-10823.

PUGH, J.C., ZWEIDLER, A., SUMMERS, J. (1989): Characterization of the major duck hepatitis B virus core particle protein. J. Virol. 63, 1371-1376.

RADZIWILL, G., TUCKER, W., SCHALLER, H. (1990): Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: Domain structure and RNaseH activity. J. Virol. 64, 613-620.

RANEY, A.K., EGGERS, C.M., KLINE, E.F., GUIDOTTI, L.G., PONTOGLIO, M., YANIV, M., MCLACHLAN, A. (2001): Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor  $1\alpha$ -null hepatitis B virus transgenic mouse. J. Virol. 75, 2900-2911.

REN, S., NASSAL, M. (2001): Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors. J. Virol. 75, 1104-1116.

RICKWOOD, D. (1989): Centrifugation. In: A practical approach. Rickwood, D., Hames, B.D. (ed.), IRL Press, Oxford, UK.

ROBINSON, W.S., CLAYTON, D.A., GREENMAN, R.L. (1974): DNA of human hepatitis B virus candidate. J. Virol. 14, 384-391.

ROINGEARD, P., SUREAU, C. (1998): Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. Hepatology 28, 1128-1133.

ROSSNER, M.T. (1992): Review: Hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. J. Med. Virol. 36: 101-117.

RYU,C.J., CHO, D.Y., GRIPON, P., KIM, H.S., GUGUEN-GUILLOUZO, C., HONG, H.J. (2000): An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of the hepatitis B virus. J. Virol. 74, 110-116.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N (1985): Enzymatic amplification of  $\beta$  globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. Science 230, 1350-1354.

SALFELD, J., PFAFF, E., NOAH, M., SCHALLER, H. (1989): Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. J. Virol. 63, 798-808.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning – a laboratory manual. Sambrook, J. (ed.), Cold Spring Harbour Press, New York 1989.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

SATTLER, F., ROBINSON, W.F. (1979): Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. J. Virol. 32, 226-232.

SCHLICHT, H.J., BARTENSCHLAGER, R., SCHALLER, H (1989): The duck hepatitis B virus core protein contains a highly phosphorylated C terminus that is essentiell for replication but not for RNA packaging. J. Virol. 63, 2995-3000.

SCHLICHT, H.J., KUHN, C., GUHR, B., MATTALIANO, R.J., SCHALLER, H. (1987): Biochemical and immunological characterization of the duck hepatitis B virus envelope proteins. J. Virol. 61, 2280-2285.

SCHÖDEL, F., MORIARTY, A.M., PETERSON, D.L., ZHENG, J., HUGHES, J.L., WILL, H., LETURCQ, D.J., MCGEE, J.S., MILICH, D.R. (1992): The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. J. Virol. 66, 106-114.

SEIFER, M., ZHOU, S., STANDRING, D.N. (1993): A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. J. Virol. 67, 249-257.

SEIFER, M., STANDRING, D.N. (1994): A protease-sensitive hinge linking the two domains of the hepatitis B virus core protein is exposed on the viral capsid surface. J. Virol. 68, 5548-5555.

SEN, A., SHERR, C.J., TODARO, G.J. (1977): Phosphorylation of murine type C viral p12 proteins regulates their extent of binding to homologous viral RNA. Cell 10, 489-496.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85.

SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

SPRENGEL, R., KALETA, E.F., WILL, H. (1988): Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. J. Virol. 62, 3832-3839.

SPRINZL, M.F., OBERWINKLER, H., SCHALLER, H., PROTZER, U. (2001): Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. J. Virol. 75. 5108-5118.

STAHL, S.J., MURRAY, K. (1989): Immunogenicity of peptide fusions to hepatitis core antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6283-6287.

STANDRING, D., OU, J., MASIARZ, F., RUTTER, W. (1988): A signal peptide encoded with the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogenius population of e antigen in *Xenopus* oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8405-8409.

STIBBE, W., GERLICH, W.H. (1982): Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. Virology 123, 436-442.

STIBBE, W., GERLICH, W.H. (1983): Structural relationship between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. J. Virol. 46, 626-628.

STUDIER, F.W. (1973): Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gel. J. Mol. Biol. 79, 237-248.

SUMMERS, J., MASON, W.S. (1982): Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell 29, 403-415.

SUMMERS, J., O'CONNELL, A., MILLMAN, I. (1975): Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4597-4601.

SUMMERS, M.D., SMITH, G.E. (1987): A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Tex. Agric. Stn. Bull. 1555, 1-48 [plus appendix].

SUMMERS, J., SMITH, P.M., HORWICH, A.L. (1990): Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. J. Virol. 64, 2819-2824.

SUMMERS, J., SMITH, P.M., HUANG, M.J., YU, M.S. (1991): Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope protein of an avian hepadnavirus. J. Virol. 65, 1310-1317.

SUMMERS, J., SMOLEC, J.M., SNYDER, R. (1978): A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4533-4537.

TAKAHASHI, K.M., IMAI, T., GOTANDA, T., SANO, A., OINUMA, S., MISHIRO, Y., MIYAKAVA, M., MAYUMI, M. (1980): Hepatitis e antigen peptides isolated from sera of individuals infected with hepatitis B virus: comparison with HBeAg polypeptide derived from Dane particles. J. Gen. Virol. 50, 49-57.

TAN, W.S., DYSON, M.R., MURRAY, K. (1999): Two distinct segments of the hepatitis B virus surface antigen contribute synergistically to its association with the viral core particles. J. Mol. Biol. 286, 797-808.

TAVIS, J.E., PERRI, S., GANEM, D., (1994): Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer. J. Virol. 68, 3536-3543.

TIOLLAIS, P., CHARNAY, P., VYAS, G. (1981): Biology of hepatitis B virus. Science 213, 406-411.

TIOLLAIS, P., POURCEL, C., DEJEAN, A. (1985): The hepatitis B virus. Nature 317, 489-495.

TONG, S., LI, J., WANDS, J.R. (1999): Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor. J. Virol. 1999, 8696-8702.

TUTTLEMANN, J., POURCEL, C., DEJEAN, A. (1986): Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. Cell 47, 451-495.

URBAN, S., SCHWARZ, C., MARX, U.C., ZENTGRAF, H., SCHALLER, H., MULTHAUP, G. (2000): Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction. EMBO J. 19, 1217-1227.

VAHERI, A. & PAGANO, J.S. (1965): Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay. Virology 27, 434-512.

VALENZUELA, P., QUIROGA, M., ZALVIDAR, J., GRAY, P., RUTTNER, W. (1980): The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. In: Animal Virus Genetics, Hrsg. Fields, B.N., Jaenisch, R., Fox, C.F.; Academic Press, New York, 57-70.

- VAUGHN, J.L., GOODWIN, R.H., TOMPKINS, G.J., McCAWLY, P. (1977): The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). In vitro 13, 213-217.
- VIELUF K. (1998): Untersuchungen zur Interaktion der Strukturproteine des Hepatitis B Virus. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.
- WANG, G.-H., SEEGER, C. (1997): Novel mechanism of reverse transcription in hepatitis B viruses. J. Virol. 67, 6507-6512.
- WEBER, J.M., KHITTOO, G. (1983): The role of phosphorylation and core protein V in adenovirus assembly. J. Gen. Virol. 64, 2063-2068.
- WEI, Y., TAVIS, J.E., GANEM, D. (1996): Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B virus. J. Virol. 70, 6455-6458.
- WEISER, B., GANEM, D., SEEGER, C., VARMUS, H.E. (1983): Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogenous forms in liver from animals infected with the ground squirrel hepatitis virus. J. Virol. 48, 1-9.
- WILL, H., REISER, W., WEIMER, T., PFAFF, E., BÜSCHER, M., SPRENGEL, R., CATTANEO, R., SCHALLER, H. (1987): Replication strategy of human hepatitis B virus. J. Virol. 61, 904-911.
- WONG, D.T., NATH, N., SNINSKY, J.J. (1985): Identification of hepatitis B virus polypeptides encoded by the entire pre-S open reading frame. J. Virol. 55, 223-231.
- WYNNE, S.A., CROWTHER, R.A., LESLIE, A.G.W. (1999): The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. Mol. Cell 3, 771-780.
- Wu, T.T., Coates, L., Aldrich, C.E., Summers, J., Mason, W.S. (1990): In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. Virology 175, 255-261.
- YEH, C.T., OU, J.H. (1991): Phosphorylation of hepatitis B virus precore and core proteins. J. Virol. 65, 2327-2331.
- YU, M., SUMMERS, J. (1991): A domain of the hepadnavirus capsid protein is specifically required for DNA maturation and virus assembly. J. Virol. 65, 2511-2517.
- Yu, S.F., Edelmann, K., Strong, R.K., Moebes, A., Rethwilm, A., Linial, M.L. (1996): The carboxyl terminus of the human foamy virus gag protein contains separable nucleic acid binding and nuclear transport domain. J. Virol. 70, 8255-8262.
- ZHOU, S., STANDRING, D.N. (1991): Production of hepatitis B virus nucleocapsid like core particles in *Xenopus* oocytes. J. Virol. 66, 3086-3092.
- ZHOU, W., PARENT, L.J., WILLS, J.W., RESH, M.D. (1994): Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodefiency virus type 1 gag protein which interacts with acidic phospholipids. J. Virol. 68, 2556-2569.
- ZHU, Y., YAMAMOTO, T., CULLEN, J., SAPUTELLI, J., ALDRICH, C.E., MILLER, D.S., LITWIN, S., FURMAN, P.A., JILBERT, A.R., MASON, W.S. (2001): Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. J. Virol. 75, 311-322.

ZLOTNICK, A., CHENG, N., STAHL, S.J., CONWAY, J.F., STEVEN, A.C., WINGFIELD, P.T. (1997): Localization of the C terminus of the assembly domain of the hepatitis B virus capsid protein: implications for hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 9556-9561.

ZOULIM, F., SAPUTELLI, J., SEEGER, C. (1994): Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. J. Virol. 68, 2026-2030.

ZOULIM, F., SEEGER, C. (1994): Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosin residue of the polymerase. J. Virol. 68, 6-13.

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. R. Thomssen und Herrn Prof. Dr. O. Götze danke ich für die Bereitstelllung des Arbeitsplatzes am Hygiene-Institut Göttingen in der Abteilung Virologie.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Bowien bedanke ich mich für die Übernahme des Referats und bei Herrn Prof. Dr. K. von Figura für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit im Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität Göttingen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. V. Bruß für die interessante Themenstellung, die Betreuung und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von PD Dr. V. Bruß sei für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit sowie die Hilfsbereitschaft bei allen größeren und kleineren Problemen gedankt. Besonders danke ich Dipl.-Biol. Dirk Ponsel für die Unterstützung bei Computerproblemen und die Durchsicht dieser Arbeit. Weiterhin danke ich Frau A. Koch für die Unterstützung bei der Vermehrung der Baculoviren.

Der Abteilung Hepatitis-Diagnostik danke ich für die Durchführung der HBe- und HBsAg-Tests.

Bei PD Dr. M. Kann bedanke ich mich für die Bereitstellung des Gold-Trypsins. Herrn Dr. C. Hourioux danke ich für die zur Verfügung gestellten Peptide und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der rekombinanten Core-Partikel.

Meinen Freunden danke ich für ihre Aufmunterung und die nötige Ablenkung, durch die auch in stressigen Zeiten der Spaß nicht zu kurz gekommen ist.

Für ihre Geduld und ihr Verständnis möchte ich mich bei Kai und Nele bedanken.

Schließlich möchte ich meinen Eltern ein riesiges Dankeschön sagen für ihre Unterstützung in allen Höhen und Tiefen, ohne die diese Arbeit so nicht zustande gekommen wäre.

### Lebenslauf

Name: Daniela Lieder, geb. Oed

Geburtstag, -ort: 01.03.1974, Magdeburg

Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Staatsangehörigkeit: deutsch

1980-1990: Polytechnische Oberschule "Helene Weigel" in Magdeburg

1990-1992: Geschwister-Scholl-Gymnasium in Magdeburg

1992-1998: Studium der Biologie an der Georg-August-Universität,

Göttingen

Oktober 1994: Vordiplomprüfung

Februar 1997: Mündliche Diplomprüfungen im Hauptfach Mikrobiologie und

den Nebenfächern Biochemie und Organische Chemie

März 1997-Mai 1998: Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit am Institut für

Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Molekulare Mikrobiologie

bei Herrn Prof. Dr. B. Bowien mit dem Thema *Genetik der*Autotrophie in Ralstonia eutropha: Charakterisierung einer

Revertante mit wiederhergestellter CO<sub>2</sub>-Assimilation

Juli 1998-September 2002: Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit dem Thema

Untersuchung der Reifung des Hepatitis B Virus Nukleokapsids am Zentrum für Hygiene und Humangenetik, Abt. Virologie bei

Herrn PD Dr. V. Bruß