



Daniela Lieder (Autor)

Untersuchung der Reifung des Hepatitis B Virus Nukleokapsids

Daniela Lieder

**Untersuchung der Reifung des Hepatitis B Virus
Nukleokapsids**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3644>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1. EINLEITUNG

1.1. Überblick

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört zu der kleinen Virusfamilie *Hepadnaviridae*. Sie umfasst umhüllte **hepatotrophe DNA**-Viren, die sich insbesondere durch ihr enges Wirtsspektrum und ihren einzigartigen Replikationsmechanismus, der ein RNA-Intermediat einschließt, auszeichnen. Die Hepadnaviren werden in die Säugetiere-infizierenden (*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 Pekingerente ("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 Patientenserum 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, Zentral- und 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).

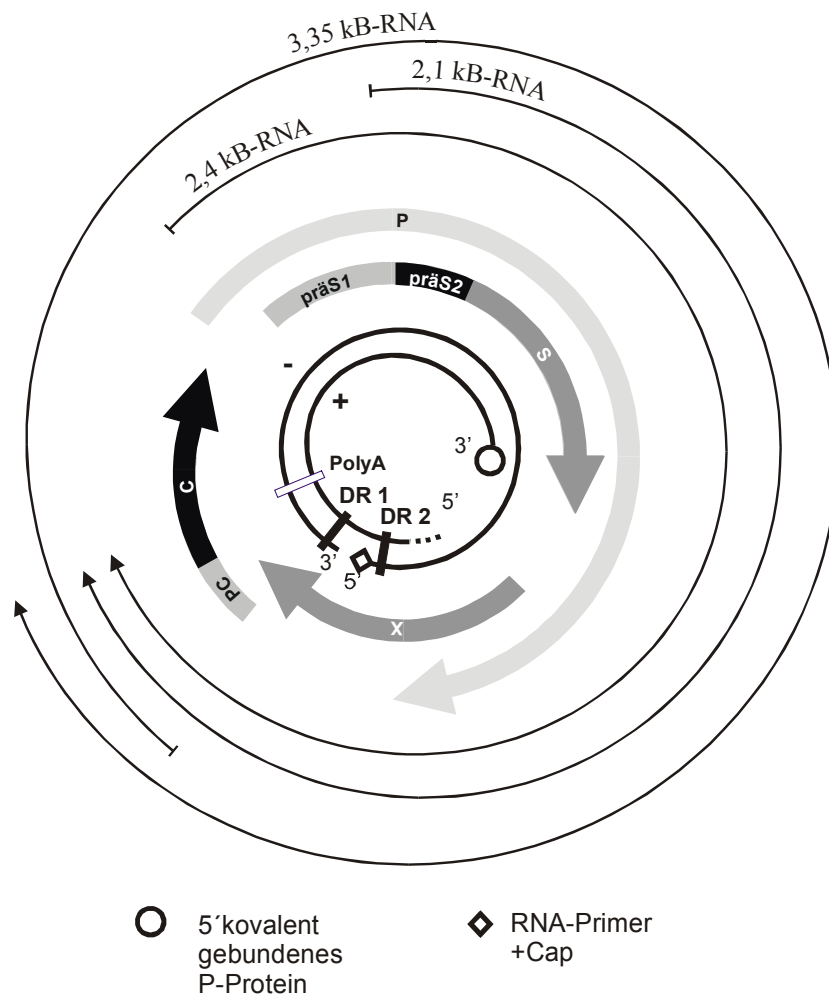


Abb. 1: Schematische Darstellung des HBV-Genoms, der offenen Leserahmen und der gebildeten mRNAs. PolyA: Polyadenylierungssignal, DR1 und DR2: *direct repeats*, P: Leserahmen des Polymerase-Proteins, präS1/präS2/S: Leserahmen der kleinen, mittleren und großen Hüllproteins, C: Leserahmen des Core-Proteins, 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.