

Technische Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt

Fachgebiet Proteinmodelling

Mutationsanalyse der Oligomerisierung des kleinen Hepatitis B Virus Hüllproteins S und ihr Einfluss auf die Partikelbildung des Hepatitis B und D Virus

Sascha Martin Suffner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. Prof. Dr. D. Langosch
Prüfer der Dissertation: 1. Univ. Prof. Dr. I. Antes
2. apl. Prof. Dr. V. Bruß
(Georg-August-Universität Göttingen)

Die Dissertation wurde am 24.06.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 31.03.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Summary	VI
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis-B-Virus	1
1.1.1 Klassifikation	1
1.1.2 Prävalenz und Übertragung	1
1.1.3 Krankheitsbild, Therapie und Prophylaxe	2
1.1.4 Hepatitis-Delta-Virus Koinfektion	3
1.2 Aufbau des HBV-Virions	3
1.3 Genomstruktur	4
1.4 Transkripte und Genomreplikation	4
1.5 Die viralen Proteine	5
1.5.1 Die Polymerase	6
1.5.2 Das Core-Protein	6
1.5.3 Das e-Protein	6
1.5.4 Das X-Protein	6
1.5.5 Die Hüllproteine	7
1.6 Infektionszyklus	10
1.7 Subvirale Partikel	10
1.7.1 Morphologie subviraler Partikel	12
1.7.2 Sekretionsweg	12
1.8 Ziel dieser Arbeit	13
2 Material	14
2.1 Bakterien	14
2.2 Eukaryotische Zellen	14
2.3 Plasmide	14
2.4 Primer	17
2.5 Antikörper	20
2.6 Enzyme	21
2.7 DNA und Proteinmarker	21
2.8 Laborgeräte Verbrauchsmaterialien	21
2.9 Chemikalien	23
2.10 Medien	24
2.10.1 Medien für Zellkultur	24
2.10.2 Medien für Bakterien	24
2.11 Lösungen und Puffer	24
2.12 Kits	26
2.13 Software	26

3	Methoden	27
3.1	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden	27
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	27
3.1.2	Agarosegelelektrophorese	27
3.1.3	Restriktionsverdau	28
3.1.4	Vektordephosphorylierung	28
3.1.5	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA	28
3.1.5.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	28
3.1.5.2	Ethanol-fällung	28
3.1.5.3	Gelextraktion	29
3.1.5.4	DNA-Konzentrationsmessung	29
3.1.6	Ligation	29
3.1.7	Plasmidpräparation	29
3.1.7.1	Minipräparation	29
3.1.7.2	Midipräparation	30
3.1.8	Sequenzierung	30
3.1.9	Präparation von HBV-Genomen	30
3.1.9.1	Immunpräzipitation	30
3.1.9.2	DNase I Verdau	30
3.1.9.3	Proteinase K Verdau	31
3.1.10	HBV-genomspezifische Real-Time-Polymerasekettenreaktion	31
3.1.10.1	PCR-Standard	31
3.1.10.2	qPCR	31
3.1.11	Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
3.1.11.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	32
3.1.11.2	Transformation von Bakterien durch Elektroporation	32
3.2	Methoden der Zellkultur	32
3.2.1	Kultivierung von Huh7-Zellen	32
3.2.2	Kryokonservierung und Rekultivierung von HuH-7-Zellen	32
3.2.3	Transfektion von HuH-7-Zellen	33
3.2.4	Ernte von Zellkulturüberständen	33
3.2.5	Konzentrierung von HDV-Pseudopartikeln	33
3.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	34
3.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten	34
3.3.2	Herstellung von HDV-Proteinextrakten	34
3.3.3	Zellfraktionierung mit Triton-X114	34
3.3.4	Zellfraktionierung mit Triton-X100 und NP40	34
3.3.5	Crosslinking	35
3.3.6	SDS-PAGE und Westernblot	35
3.3.7	Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	36
3.3.8	FACS-FRET	37
3.4	Statistik	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Herstellung von doppelt-fluoreszenzmarkierten HDV-Partikeln	40
4.1.1	DAG-Konstrukte	40
4.1.2	Funktionelle Charakterisierung der DAG-Fusionsproteine	40
4.1.2.1	Expression und Lokalisation	40
4.1.2.2	HDV-Partikelbildung	41

Inhaltsverzeichnis

4.2	Untersuchung der Oligomerisierung des kleinen HBV-Hüllproteins S	46
4.2.1	Die Rolle der Transmembrandomäne 2 im Prozess der Oligomerisierung	46
4.2.1.1	TM2-Konstrukte	46
4.2.1.2	Funktionelle Charakterisierung der TM2-Konstrukte	47
4.2.1.3	Interaktionsstudien mittels FACS-FRET und Crosslinking . .	49
4.2.2	Mutationsanalyse der Oligomerisierung von S	53
4.2.2.1	S-Konstrukte	53
4.2.2.2	Funktionelle Charakterisierung der S-Mutanten	53
4.2.2.3	Interaktionsstudien mittels FACS-FRET und Crosslinking . .	59
4.2.3	Partikelbildung ausgewählter S-Mutanten	62
4.2.3.1	Bildung subviraler Partikel	62
4.2.3.2	HBV-Virusproduktion	62
4.2.3.3	HDV-Partikelbildung	64
4.2.4	Übersicht der Ergebnisse zur Charakterisierung der S-Mutanten	66
5	Diskussion	68
5.1	Herstellung von doppelt-fluoreszenzmarkierten HDV-Partikeln	68
5.2	Untersuchung der Oligomerisierung des kleinen HBV-Hüllproteins S	69
5.2.1	Die Rolle der Transmembrandomäne 2 im Prozess der Oligomerisierung	69
5.2.2	Mutationsanalyse der Oligomerisierung von S	71
5.2.3	Partikelbildung ausgewählter S-Mutanten	76
5.2.3.1	Bildung subviraler HBV-Partikel	76
5.2.3.2	HBV-Virusproduktion	77
5.2.3.3	HDV-Partikelbildung	77
5.3	Ausblick	78
	Literatur	79
	Anhang	90
	Danksagung	93

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μ	Mikro
Δ	Delta
Ag	Antigen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b	Basen
bp	Basenpaar
cccDNA	<i>Covalently-closed-circular-DNA</i>
CD	<i>Cluster-of-Differentiation</i>
CIP	<i>Calf-Intestine-Phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
CypA	Cyclophilin A
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHBV	<i>Duck-Hepatitis-B-Virus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic-Acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DR	<i>Direct-Reapeat</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DSS	<i>Disuccinimidylsuberate</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>Enhanced-green-Fluorescent-Protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi-Intermediate-Compartment</i>
ESCRT	<i>Endosomal-sorting-Complex-required-for-Transport</i>
eYFP	<i>Enhanced-yellow-Fluorescent-Protein</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated-Cell-Sorting</i>
FCS	<i>Fetal-Calf-Serum</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
g	Gramm
GalT	Galaktosyltransferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	<i>Hepatocellular-Carcinoma</i>
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HTR	Humaner Transferrin Rezeptor I
IE	<i>Immediate-Early</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
k	Kilo
l	Liter
LB	<i>Lysogeny-broth</i>

Abkürzungsverzeichnis

LC3	<i>Microtubule-associated-Proteins 1A/1B Light-Chain 3</i>
m	Meter/milli
M	Molar
MCS	<i>Multiple-Cloning-Site</i>
min	Minute
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
mTagBFP	<i>Blue-Fluorescent-Protein</i>
n	Nano
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
nt	Nukleotid
NTCP	<i>Taurocholate-Cotransport-Polypeptide-Rezeptor</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open-reading-Frame</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffer-Solution</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
pgRNA	Prägenomische-RNA
PMT	<i>Photomultipliertube</i>
PO	Peroxidase
rcDNA	<i>Relaxed-circular-DNA</i>
RNA	<i>Ribonucleic-Acid</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase/Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis</i>
sgRNA	Subgenomische-RNA
SSC	<i>Side-Scatter</i>
SVP	Subvirale Partikel
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TP	Terminales Protein
TM	Transmembrandomäne
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLP	<i>Virus-like-Particle</i>
WB	Western-Blot
WHV	<i>Woodchuck-Hepatitis-Virus</i>

Aminosäuren wurden nach dem Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.

Summary

Worldwide, more than 240 million people are chronically infected with the human hepatitis B virus (HBV). About 780 000 individuals die each year as a consequence of the infection which is associated with an increased risk to develop liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Coinfection with the hepatitis D virus (HDV) increases this risk.

In addition to infectious HBV particles infected cells very efficiently secrete spherical and filamentous non-infectious subviral particles (SVP). They mainly consist of the small HBV surface protein S which carries the immunogenic viral main epitope and lipids. Compared with virions, SVP has an up to 10^4 -fold higher concentration in patient sera. Since 1984, in yeast recombinant produced S-Protein is used successfully as a vaccine against an HBV infection.

The S-Protein is capable of budding into cellular membranes like the endoplasmic reticulum (ER) or the ER-Golgi-intermediate-compartment (ERGIC) without any other viral factors and self assembles into SVP. It is cotranslationally inserted into the ER membrane and traverses the lipid bilayer probably four times with transmembrane domains TM1–4. However, subviral particle morphogenesis remains poorly understood.

In this thesis the importance of transmembrane, cytoplasmic and luminal parts of S regarding the oligomerization of S and the assembly of HBV and HDV particles was investigated.

The results show for the first time that the TM2 has the capability to self-assemble. This was demonstrated with a FACS based FRET assay. Presumably, this interaction is mediated by a leucine zipper heptad motive. In addition, TM2 but not TM1 plays a crucial role in protein stability and is essential for SVP formation. In contrast, oligomerization of S seems to be mainly mediated by the putative amphipathic helix (AS 154–174) as well as the hydrophobic transmembrane domains 3 and 4. The amphipathic helix is also important for protein stability and the correct ER localization of S. Furthermore, the data of this thesis indicates that in addition to the amphipathic helix and transmembrane domains the cytoplasmic loop 1 of S is also involved in oligomerization. The C65S mutation in this loop led to a drastic reduction in oligomerization, to the same degree as the simultaneous substitution or deletion of TM1–4. This is consistent with older observations that all 4 cysteines in this domain were crucial for SVP formation. Furthermore, the role of all parts of S participating in oligomerization was investigated regarding the process of SVP, HBV virion and HDV particle formation. With respect to SVP formation only the truncation of the C-terminal 48 amino acids as well as substitution of TM1 by a poly alanine sequence was tolerated (mutants $\Delta 178$ and TM1polyA). The C65 residue was no longer capable of forming SVP, HBV virions or HDV particles. Hence, the amino acid residue C65 seems to be essential for viral assembly.

In sum, this thesis further elucidated the early steps in S oligomerization and SVP morphogenesis and identified domains and amino acid residues of S essential for HBV and HDV particle assembly.

Zusammenfassung

Mehr als 240 Millionen Menschen weltweit sind chronisch mit dem humanen Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert. Circa 780 000 von ihnen sterben jährlich an den Folgen der Infektion, die mit einem erhöhten Risiko, eine Leberzirrhose oder ein Leberzellkarzinom zu entwickeln, einhergeht. Eine Koinfektion mit dem Hepatitis-D-Virus (HDV) erhöht dieses Risiko.

Neben infektiösen HBV-Partikeln sekretieren infizierte Zellen sehr effizient sphärische und filamentöse, nicht infektiöse subvirale Partikel (SVP). Sie bestehen hauptsächlich aus dem HBV-Hüllprotein S, welches das immunogene Hauptepitop des Virus trägt, und Lipiden. SVP weisen im Vergleich zu Virionen eine bis zu 10^4 -fach höhere Konzentration im Serum auf. Das in Hefe rekombinant hergestellte S-Protein wird seit 1984 erfolgreich als aktiver Impfstoff gegen eine HBV-Infektion eingesetzt.

Das S-Protein ist in der Lage, ohne weitere virale Proteine an intrazellulären Membranen wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem ER-Golgi-*Intermediate-Compartment* (ERGIC) durch Selbstassemblierung SVP zu bilden. S wird kotranslational in das ER inseriert und durchtritt die Lipidmembran vermutlich vier Mal mit den Transmembrandomänen TM1–4. Die Morphogenese subviraler Partikel ist bislang jedoch nicht genau aufgeklärt.

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der transmembranen, luminalen und zyttoplasmatischen Bereiche des S-Proteins hinsichtlich dessen Oligomerisierung und der HBV- und HDV-Partikelbildung untersucht.

Mit Hilfe eines FACS-basierten FRET-Assays konnte erstmals die Fähigkeit der TM2 zur Selbstinteraktion gezeigt werden. Diese Interaktion wird vermutlich über ein Leuzin-Zipper-Heptad-Motiv vermittelt. Auch konnte gezeigt werden, dass die TM2, aber nicht die TM1, eine wichtige Rolle bei der Stabilität von S übernimmt und essentiell für die Bildung von SVP ist. Im Gegensatz dazu scheint die Oligomerisierung von S hauptsächlich durch die potentiell amphipathische Helix (AS 154–174) ebenso wie durch die hydrophoben Transmembrandomänen 3 und 4 vermittelt zu werden. Die amphipathische Helix ist zusätzlich wichtig für die Protein-stabilität von S und dessen korrekter Lokalisation am ER. Des Weiteren legen die Daten dieser Dissertation nahe, dass zusätzlich zur amphipathischen Helix und transmembraner Bereiche auch die zytoplasmatische Schleife 1 von S am Prozess der Oligomerisierung beteiligt ist. So führte die C65S-Mutation in dieser Schleife zu einem drastischen Rückgang der Oligomerisierungsfähigkeit, und zwar im gleichen Maße wie die gleichzeitige Substitution oder Deletion der TM1–4. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die zeigen konnten, dass alle vier Cysteine in dieser Domäne essentiell für die Bildung von SVP waren. Weiterhin wurde die Rolle aller an der Oligomerisierung beteiligten Bereiche von S im Prozess der SVP, HBV-Virionen und HDV-Partikelbildung untersucht. Hinsichtlich der SVP-Bildung wurde lediglich die Deletion der C-terminalen 48 AS sowie die Substitution der TM1 durch eine Poly-Alanin-Sequenz toleriert (Mutanten Δ 178 und TM1polyA). Die C65S-Mutante war nicht länger in der Lage, SVP, HBV-Virionen oder HDV-Partikel zu bilden. Der AS-Rest C65 scheint demnach essentiell für die Virusmorphogenese zu sein.

In der Summe ist es mit der vorliegenden Arbeit gelungen, die frühen Schritte der S-Oligomerisierung und der SVP-Morphogenese weiter aufzuklären und für die HBV- und HDV-Partikelbildung essentielle Domänen und AS-Reste des S-Proteins zu identifizieren.

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis-B-Virus

1.1.1 Klassifikation

Das humane Hepatitis-B-Virus (HBV) gehört zur Gattung der *Orthohepadnaviridae* innerhalb der Familie der *Hepadnaviridae* und wurde erstmals 1967 beschrieben [1]. Ein weiterer Vertreter innerhalb der *Orthohepadnaviridae* ist zum Beispiel das Hepatitis-Virus des Waldmurmeltiers (*Woodchuck-Hepatitis-Virus*, WHV [2]). Eine weitere Gattung innerhalb der *Hepadnaviridae* stellen die Avihepadnaviren dar. Ein Vertreter ist z. B. das Enten-Hepatitis-B-Virus (*Duck-Hepatitis-B-Virus*, DHBV [3]). Die *Hepadnaviridae* sind durch ein sehr enges Wirtsspektrum und eine spezifische Infektion von Hepatozyten gekennzeichnet. Ferner replizieren alle *Hepadnaviridae* mit Hilfe einer RNA-Zwischenstufe, die durch eine vom Virusgenom kodierte reverse Transkriptase (RT) zum viralen DNA-Genom umgeschrieben wird.

Bislang sind acht HBV-Genotypen bekannt (A–H). Diese lassen sich in weitere Subgenotypen unterteilen. Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über die geographische Verteilung der verschiedenen Genotypen [4, 5].



Abbildung 1.1: Geographische Verteilung der Genotypen A–H und der jeweiligen Subgenotypen (modifiziert nach [6]).

1.1.2 Prävalenz und Übertragung

Mehr als 240 Millionen Menschen weltweit sind chronisch HBV infiziert. Ca. 780 000 von ihnen sterben jährlich an den Folgen der Infektion, die mit einem erhöhten Risiko zu einer Leberzirrhose oder einem Leberzellkarzinom (*Hepatocellular-Carcinoma*, HCC) führen kann. Die größte Verbreitung von HBV findet sich in Subsahara-Afrika, Ostasien, Süd- und Osteuropa sowie Teilen des Amazonasgebiets (5–10 % der Bevölkerung sind hier chronisch infiziert). In Indien, Russland sowie dem Mittleren Osten sind ca. 2–5 % der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert. Dagegen liegt die Verbreitung von HBV in Nordamerika sowie Mitteleuropa bei weniger als 1 % (siehe Abbildung 1.2) [7]. Die horizontale Übertragung von HBV erfolgt durch Kontakt mit HBV-positiven Körperflüssigkeiten wie z. B. Blut. Des Weiteren kann HBV von der Mutter auf das Neugeborene oder seltener auf den Fetus übertragen werden [7].

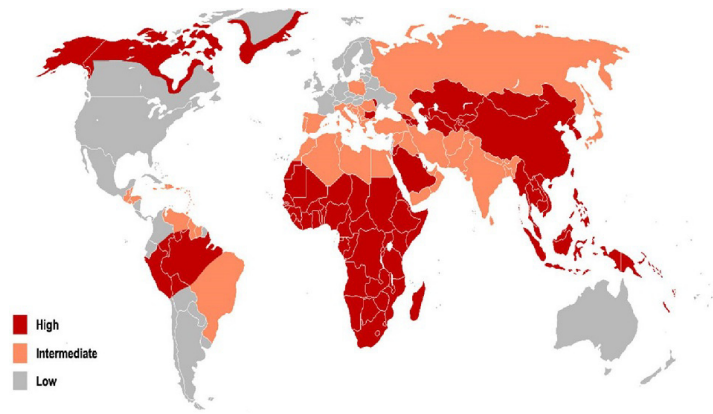


Abbildung 1.2: Geographische Verteilung chronischer HBV-Träger. Länder mit einer hohen HBV-Verbreitung (mehr als 8 % der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert) sind in dunkelrot, mit einer mittleren Verbreitung (2–8 % der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert) in hellrot und mit einer niedrigen Verbreitung (weniger als 2 % der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert) in grau abgebildet (modifiziert nach [6]).

1.1.3 Krankheitsbild, Therapie und Prophylaxe

Eine HBV-Infektion kann zu akuter und chronischer Hepatitis sowie Leberzirrhose und Leberkrebs als Konsequenz einer chronischen Infektion führen. In immunkompetenten Erwachsenen hat eine HBV-Infektion meist eine vorübergehende Erkrankung der Leber zur Folge. In ca. 95 % der Fälle wird die Infektion durch das Immunsystem beseitigt. In ca. 3–5 % der Fälle persistiert das Virus und verursacht eine chronische Infektion. Eine vertikale Übertragung von Mutter auf den Fetus oder eine Infektion im frühen Kindesalter führt in 90 % der Fälle zu einer chronischen Infektion.

Da HBV kein zytopathisches Virus ist, sind die Krankheitsverläufe einer HBV-Infektion und die Pathogenese der Lebererkrankung eine Folge der Immunantwort des Wirts sowie der Virus-Wirt-Interaktion. Eine erfolgreiche Eliminierung einer HBV-Infektion erfordert sowohl eine effektive $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zell-Antwort als auch eine ausreichende Produktion neutralisierender Antikörper [8–11].

Zurzeit stehen zwei therapeutische Ansätze zur Behandlung einer HBV-Infektion zur Verfügung. Dies sind zum einen Nukleos(t)id-Analoga wie z. B. Adefovir oder Entecavir, welche die Replikation von HBV stören, da sie die HBV-Polymerase inhibieren oder zum Kettenabbruch führen, und zum anderen immunsystemmodulierende Therapien wie die Gabe von Interferon- α (IFN- α) oder pegyliertes IFN- α . Allerdings haben beide Therapieansätze Nachteile wie eine sehr lange Behandlungsdauer, hohe Behandlungskosten, das Auftreten von Resistenzen sowie das signifikante Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen. Weiterhin führt eine Behandlung zwar zu einer Verminderung der Viruslast aber nicht zu einer vollständigen Ausheilung einer chronischen HBV-Infektion. Lucifora *et al.* [12] konnten allerdings zeigen, dass die IFN- α Gabe in Kombination mit einer Aktivierung des Lymphotoxin-beta-Rezeptors *in vitro* zur Degradierung viraler *Covalently-closed-circular*-(ccc)-DNA in Hepatozyten führt.

Das 1982 erstmals in Hefe rekombinant hergestellte kleine HBV-Hüllprotein wird seit 1984 als aktiver Impfstoff gegen eine HBV-Infektion eingesetzt [13, 14]. Das kleine Hüllprotein trägt das Hauptepitop der Virushülle und ist recht immunogen. In ca. 95 % der Menschen führt eine Impfung zu einer kompletten Immunisierung [15].

1.1.4 Hepatitis-Delta-Virus Koinfektion

Das Hepatitis-Delta-Virus (HDV) ist ein kleines RNA-Virus, das mehr Ähnlichkeiten zu Pflanzen-Viroiden aufweist als zu menschlichen Viren. HDV kann sich nur in Zellen vermehren, die bereits mit HBV infiziert sind. Dabei kann es zur gleichzeitigen Infektion mit HBV und HDV (Koinfektion) oder zur nachträglichen HDV-Infektion von bereits mit HBV infizierten Zellen (Superinfektion) kommen. Weltweit sind ca. 15 Millionen HBV-Träger auch mit HDV infiziert. Eine Koinfektion kann zu einem akuten Leberversagen oder einer chronischen HDV-Infektion führen. Eine Superinfektion mit HDV kann im Vergleich zu einer HBV-Infektion zur schnelleren Entwicklung von Leberzirrhose oder Leberversagen führen [16–21].

Das sphärische, 32 nm große HDV-Virion besteht aus einem Nukleokapsid, welches aus der zirkulären, 1.7 kb Einzelstrang-RNA sowie dem Delta-Antigen (DAg) besteht. Das Nukleokapsid wird von dem kleinen (*small*, S), mittleren (*middle*, M) und großen (*large*, L) HBV-Oberflächenprotein umhüllt. Durch die gleiche Virushülle teilen HBV und HDV den gleichen funktionellen Rezeptor für die Infektion von Hepatozyten [22]. Nach der Aufnahme von HDV durch Hepatozyten wird das Nukleokapsid zum Zellkern transportiert und die RNA mit Hilfe der zellulären RNA-Polymerase repliziert [23–27]. Die zirkuläre RNA hybridisiert mit 74 % ihrer Basen mit sich selbst. Das RNA-Genom kodiert für das DAg, welches aus zwei Isoformen besteht. Das 214 AS und 27 kDa große DAg (*large*, LDAg) und das 195 AS und 24 kDa kleine DAg (*small*, SDAg) [28–30]. Beide Isoformen haben dieselben N-terminalen 195 AS. Das 19 AS längere LDAg entsteht als Konsequenz eines RNA-Editings mit Hilfe zellulärer Enzyme am Stopkodon 196 der viralen RNA [31]. Das LDAg wird an einem Cysteinrest am C-Terminus prenyliert und ist essentiell für die Interaktion mit dem kleinen HBV-Hüllprotein und somit für die Umhüllung von HDV [32, 33]. Die Phosphorylierung, Sumoylierung und Methylierung von SDAg hingegen reguliert die RNA-Replikation und die Bildung der mRNA, welche für das DAg kodiert [34–37]. Nach erfolgreicher Genomreplikation formen SDAg, LDAg und die neugebildete HDV-RNA einen Ribonukleoproteinkomplex [38]. Dieser wird vermutlich zum Golgi transportiert, dort von den HBV-Oberflächenproteinen umhüllt und über das *trans*-Golgi-Netzwerk sekretiert [21, 39–41].

1.2 Aufbau des HBV-Virions

Das HBV-Virion, auch Dane-Partikel genannt, wurde 1970 von D. S. Dane durch elektronenmikroskopische Aufnahmen identifiziert und weist eine sphärische Struktur auf [42]. Das 3.2 kb große, zirkuläre und partiell doppelsträngige DNA-Genom (*Relaxed-circular-DNA*, rcDNA) ist mit der viralen Polymerase kovalent verknüpft und wird von einem Kapsid umgeben [43]. Das Kapsid wird durch die Selbstassemblierung von Homodimeren des viralen Core-Proteins gebildet [44]. Dabei sind zwei unterschiedliche Symmetrien möglich. Eine $T = 3$ Symmetrie entsteht bei der Assemblierung von 90 Core-Homodimeren, eine $T = 4$ Symmetrie bei der Assemblierung von 120 Core-Homodimeren [45, 46]. Die Virushülle wird aus zellulären Lipiden und den Hüllproteinen S, M und L gebildet. Das Virion hat einen Durchmesser von 52 nm (Gerlich, 2013). Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung (unten links) und eine elektronenmikroskopische Aufnahme (oben links) des HBV-Virions [6, 47, 48]. Neben infektiösen Virionen werden von infizierten Zellen auch sehr effizient sogenannte subvirale Partikel (SVP) sekretiert, die ausschließlich aus den Oberflächenproteinen und zellulären Lipiden bestehen (siehe Abbildung 1.3 (A und B), rechte Seite).

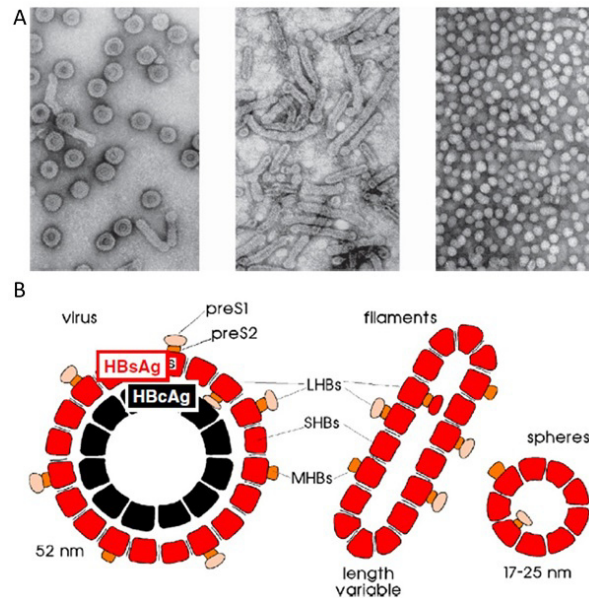


Abbildung 1.3: Partikelstruktur von HBV. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von infektiösen HBV-Virionen (Dane-Partikel, links) und nicht infektiösen SVP (Filamente, mittlere Abbildung; sphärische SVP, rechts). (B) Schematische Abbildung eines infektiösen HBV-Virions (links) und nicht infektiösen SVP (Filamente, mittlere Abbildung; sphärische SVP, rechts). HBV-Virionen sind aus einem das Genom und die Polymerase umgebenden Kapsid (schwarz) und den drei Hüllproteinen aufgebaut (rot). SVP bestehen nur aus den drei Hüllproteinen S, M und L (rot) (modifiziert nach [6]).

1.3 Genomstruktur

Die 3.2 kb große rcDNA besteht aus einem vollständigen, kodierenden (-)-DNA-Strang und einem unvollständigen (+)-DNA-Strang [2, 49–51]. Das 5′-Ende des kodierenden Stranges ist kovalent mit dem terminalen Protein (TP) verknüpft, einer Proteindomäne der viralen Polymerase [52]. Das 5′-Ende des (+)-Stranges enthält ein RNA-Oligonukleotid, welches als Primer für die DNA-Synthese des (+)-Stranges dient. Des Weiteren befinden sich am 5′-Ende des (-)-Strangs und am 3′-Ende des (+)-Strangs 11 nt kurze *Direct-repeat*-(DR1 und DR2)-Elemente, die eine wichtige Rolle bei der Replikation des HBV-Genoms spielen [53]. Die 5′-Enden der beiden Stränge sind komplementär, was zur Bildung der ringförmigen DNA führt. Diese Enden werden deshalb auch als kohäsiv bezeichnet [51]. Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die Genomstruktur. Das HBV-Genom enthält insgesamt vier *Open-reading-Frames* (ORF), die zum größten Teil überlappen und für alle sieben viralen Proteine kodieren. Der präS/S-ORF kodiert für die drei Hüllproteine, der präC/C-ORF für das Core- und e-Protein, der X-ORF für das X-Protein und der P-ORF für die virale Polymerase [54].

1.4 Transkripte und Genomreplikation

Nach der Aufnahme von HBV durch Hepatozyten und der Abgabe der rcDNA in den Nucleus wird der (+)-Strang durch die virale Polymerase und den zellulären Replikationsapparat vervollständigt. Dies führt zur Bildung von cccDNA, von welcher die RNAs abgelesen werden. Die Transkripte haben eine Länge von 0.7, 2.1, 2.4, und 3.5 kb und werden von der zellulären RNA-Polymerase-II gebildet. Sie tragen am 5′-Ende eine Cap-Struktur und am 3′-Ende ein Polyadenylierungssignal und dienen als mRNA für die Proteintranslation. Die 3.5 kb

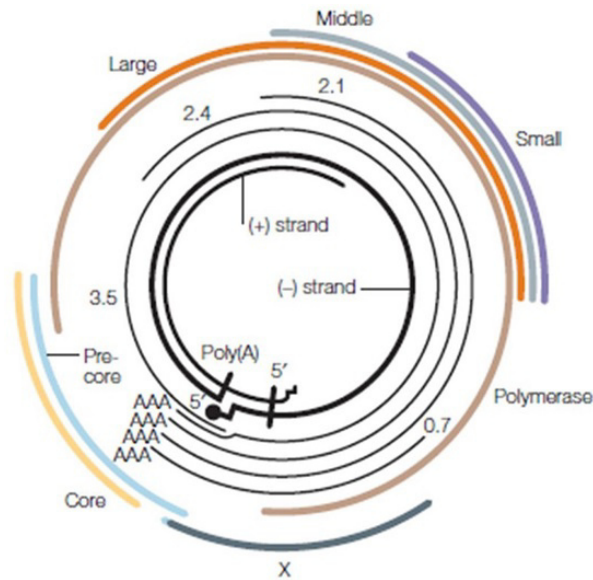


Abbildung 1.4: Genomstruktur von HBV. Die partiell doppelsträngige DNA (rcDNA, dicke schwarze Kreise) ist am 5'-Ende des vollständigen (-)-Stranges kovalent mit der viralen Polymerase verknüpft (kleiner schwarzer Kreis). Die umgebenden dünnen schwarzen Linien zeigen die unterschiedlichen großen HBV-Transkripte (0.7, 2.1, 2.4, 3.5 kb). Die gefärbten äußeren Linien bilden die sieben translatierten HBV-Proteine ab: die drei Hüllproteine S, M und L, die virale Polymerase, das X-Protein sowie das Core- und präCore-(e)-Protein (modifiziert nach [9]).

große prägenomische-(pg)-RNA umfasst das volle Genom mit einer zusätzlichen Redundanz von 120 nt und dient als Template für die virale Polymerase zur Genomreplikation. Zusätzlich wird das Core-Protein und die virale Polymerase von der pgRNA translatiert [55]. Von der etwas mehr als 3.5 kb großen präcoreRNA wird das virale e-Protein translatiert. Die sogenannten subgenomischen-(sg)-RNAs haben eine Länge von 2.4 kb, 2.1 kb und 0.7 kb und werden für die Translation der drei Oberflächenproteine sowie des X-Proteins verwendet. Dabei werden das S und M Protein von der 2.1 kb großen sgRNA, das L Protein von der 2.4 kb großen sgRNA und das X-Protein von der 0.7 kb großen sgRNA translatiert.

Die pgRNA dient als Matrize für die Synthese neuer HBV-Genome [56]. Diese enthält neben einem DR-Element am 5'-Ende auch eine sogenannte *Stem-Loop*-Struktur, das ϵ -Signal, an das die virale Polymerase bindet [57–59]. Dies führt zur Rekrutierung von Core-Dimeren und somit zur Umhüllung des Polymerase-pgRNA-Komplexes [60–63]. Nun wird die reverse Transkription der pgRNA initiiert. Dabei dient ein konservierter Tyrosinrest in der TP-Domäne als Primer. Eine kleine Nukleotidsequenz im ϵ -Signal wird von der Polymerase als Matrize für die Herstellung eines (-)-DNA-Oligonukleotids verwendet [63, 64]. Mit dem synthetisierten DNA-Oligonukleotid bindet die Polymerase nun an das DR1-Element am 3'-Ende der pgRNA und beginnt mit der Bildung des (-)-DNA-Stranges [55]. Gleichzeitig wird über die RNaseH-Domäne der Polymerase die pgRNA abgebaut [65]. Am 5'-Ende der pgRNA wird die RNA des DR-Elements nicht abgebaut. Diese Sequenz dient nach Translokation zu DR1 als Primer für die Synthese des neuen (+)-DNA-Stranges, die nach 1000–2000 Basen wahrscheinlich wegen mangelnden Platzes im Kapsid abbricht [66, 67].

1.5 Die viralen Proteine

Alle sieben viralen Proteine werden von den vier ORFs abgelesen und von zellulären Faktoren transkribiert und translatiert. Die virale Polymerase und das Core-Protein werden dabei von

pgRNA, das e-Protein von präcoreRNA, das X-Protein und die drei Oberflächenproteine S, M und L von sgRNA translatiert.

1.5.1 Die Polymerase

Die virale Polymerase wird vom P-ORF translatiert, ist mit einem Molekulargewicht von ~90 kDa das größte HBV-Protein und besitzt eine TP-, RNaseH- und RT-Domäne [52, 57, 65, 68]. Über die TP-Domäne ist die Polymerase mit dem 5'-Ende des (-)-Stranges des HBV-Genoms kovalent verknüpft. Nach Infektion von Hepatozyten synthetisiert die Polymerase die fehlenden Nukleotide des (+)-rcDNA-Stranges, was zur Bildung von cccDNA führt [50, 69]. Über ein konserviertes Tyrosin in der TP-Domäne und der Interaktion mit dem ϵ -Signal der pgRNA wird die Neusynthese des (-)-rcDNA-Stranges initiiert [59, 70]. Die pgRNA dient hierbei als Template und wird mit Hilfe der RNaseH-Domäne gleichzeitig abgebaut [56, 65]. Durch ihre DNA-abhängige-DNA-Polymerase-Funktion wird der (+)-rcDNA-Strang ebenfalls von der viralen Polymerase synthetisiert.

1.5.2 Das Core-Protein

Das Core-Protein wird vom Core-ORF der pgRNA translatiert. Abhängig vom Genotyp besteht das Core-Protein aus 183–185 AS und hat ein Molekulargewicht von ~21 kDa. Zunächst bilden Core-Proteine Homodimere mit einer Ausbildung von Disulfidbrücken über das Cys 61 [71–73]. Im Zytoplasma kommt es zur Selbstassemblierung von Core-Homodimeren und damit zur Bildung von Kapsiden [44]. Für die Kapsidbildung sind die N-terminalen 145 AS ausreichend [71]. Der argininreiche C-terminale Bereich spielt dagegen eine wichtige Rolle bei der Verpackung der pgRNA, der Neusynthese des (+)-rcDNA-Stranges und der Genomreplikation [74–76].

1.5.3 Das e-Protein

Die AS-Sequenz des e-Proteins stimmt in 149 AS mit der Sequenz des Core-Proteins überein und wird von der präcoreRNA translatiert, die ein zusätzliches Startcodon für den präC-ORF enthält und *inframe* zum Core-ORF ist. Das e-Protein hat ein Molekulargewicht von ~25 kDa und enthält im Gegensatz zum Core-Protein ein N-terminales Signalpeptid. Dieses Signalpeptid führt zur Ausschleusung des e-Proteins über den konstitutiven Sekretionsweg der Zellen und wird von einer Signalpeptidase abgespalten. Bis zur Ausschleusung kommt es zu weiteren C-terminalen Prozessierungen. Das von den Zellen abgegebene und prozessierte e-Protein hat ein Molekulargewicht von ~17 kDa [77, 78]. Das e-Protein ist für die Genomreplikation oder die Partikelmorphogenese nicht essentiell [79], reguliert jedoch die Immunantwort des Wirtes auf das virale Core-Protein [80]. Des Weiteren ist das e-Protein ein wichtiger Marker für eine HBV-Infektion [81].

1.5.4 Das X-Protein

Das X-Protein wird vom X-ORF der 0.9 kb großen sgRNA translatiert, hat ein Molekulargewicht von 17 kDa und wird nicht in infektiöse Viruspartikel eingebaut. Lucifora *et al.* [82] konnten zeigen, dass X während einer HBV-Infektion eine essentielle Rolle bei der Transkription, Expression und Replikation übernimmt. Weiterhin wird vermutet, dass X epigenetische Veränderungen in infizierten Zellen induziert und damit einen Einfluss auf die Ausbildung von HBV-induziertem HCC hat [83, 84].

1.5.5 Die Hüllproteine

Die drei nach ihrer Größe benannten Hüllproteine S, M und L werden von einem ORF kodiert, der drei *inframe*-Startkodons für die Translation enthält. Abhängig vom Genotyp beinhaltet der ORF 389/400 Kodons [85]. Von diesem ORF werden zwei sgRNA mit einer Länge von 2.1 kb und 2.4 kb transkribiert. Die Transkription der 2.4 kb sgRNA wird über einen Promotor oberhalb des ORFs, die Transkription der 2.1 kb sgRNA über einen Promotor oberhalb des Startkodons für das M-Protein initiiert. Das L-Protein wird von der 2.4 kb sgRNA, das M- und S-Protein von der 2.1 kb sgRNA exprimiert [85–87]. Aufgrund des identischen ORF ist die AS-Sequenz im C-terminalen Bereich des M- und L-Proteins identisch mit der AS-Sequenz des S-Proteins und wird auch als S-Domäne bezeichnet. Die 55 zusätzlichen, N-terminalen AS des M-Proteins werden als präS2-Domäne bezeichnet und sind beim L-Protein zentral lokalisiert. Das L-Protein enthält N-terminal je nach Genotyp 108/119 zusätzliche AS, die als präS1-Domäne bezeichnet werden. In Abbildung 1.5 sind die drei Oberflächenproteine schematisch dargestellt.

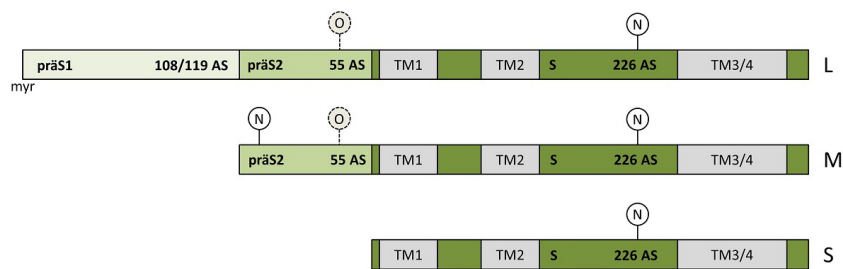


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der drei HBV-Hüllproteine S, M und L. Die 226 AS lange S-Domäne (dunkelgrüner Balken) enthält N-terminal die zwei Transmembrandomänen 1 (TM1, Typ-I-Signal) und 2 (TM2, Typ-II-Signal) und am hydrophoben C-Terminus die zwei Transmembrandomänen 3 und 4 (dunkelgraue Balken in der S-Domäne). Das M-Protein besteht aus zusätzlichen 55 AS (präS2-Domäne, hellgrüner Balken). Das L-Protein besteht je nach Genotyp aus 108/119 zusätzlichen AS (präS1-Domäne, blassgrüner Balken) und wird am Gly 2 myristoyliert (myr). Die weißen Kreise stellen die N-Glykosylierungsstellen (N) am Asn 146 und Asn 4 der S- bzw. präS2-Domäne dar. Die genotypabhängige O-Glykosylierungsstelle (O) des M-/L-Proteins ist durch den gestrichelten beige Kreis dargestellt.

Das S-Protein besteht aus der 226 AS langen S-Domäne und hat unglykosyliert ein Molekulargewicht von 24 kDa. Das M-Protein besteht aus der S- und der 55 AS langen präS2-Domäne und hat unglykosyliert ein Molekulargewicht von 30 kDa. Das 389/400 (abhängig vom Genotyp) AS große L-Protein besteht aus der präS1-, der präS2- und der S-Domäne und hat unglykosyliert ein Molekulargewicht von 39 kDa. Alle drei Oberflächenproteine können am Asn 146 der S-Domäne N-glykosyliert werden. Das M-Protein enthält eine zusätzliche N-Glykosylierungsstelle am Asn 4 der präS2-Domäne [88]. [89] konnten darüber hinaus zeigen, dass M- und L-Proteine des Genotyps C und D aber nicht des Genotyps A am Thr 37 O-glykosyliert werden. Ca. 50 % der S-Proteine werden N-glykosyliert und haben deshalb Molekulargewichte von 24 kDa (unglykosyliert) und 27 kDa (N-glykosyliert). Das M-Protein hat je nach Glykosylierungsmuster drei unterschiedliche Molekulargewichte: 30 kDa (unglykosyliert), 33 kDa (einfach N-glykosyliert am Asn 4 der präS2-Domäne) und 36 kDa (doppelt N-glykosyliert am Asn 4/146 (präS2-/S-Domäne)), wobei es als einfach N-glykosyliertes Protein am häufigsten zu detektieren ist. Das L-Protein liegt lediglich als 39 kDa (unglykosyliert) oder 42 kDa Form (einfach N-glykosyliert am Asn 146 der S-Domäne) vor. Dieses uneinheitliche Glykosylierungsmuster lässt sich durch die unterschiedlichen Topologien der Oberflächenproteine erklären [90].

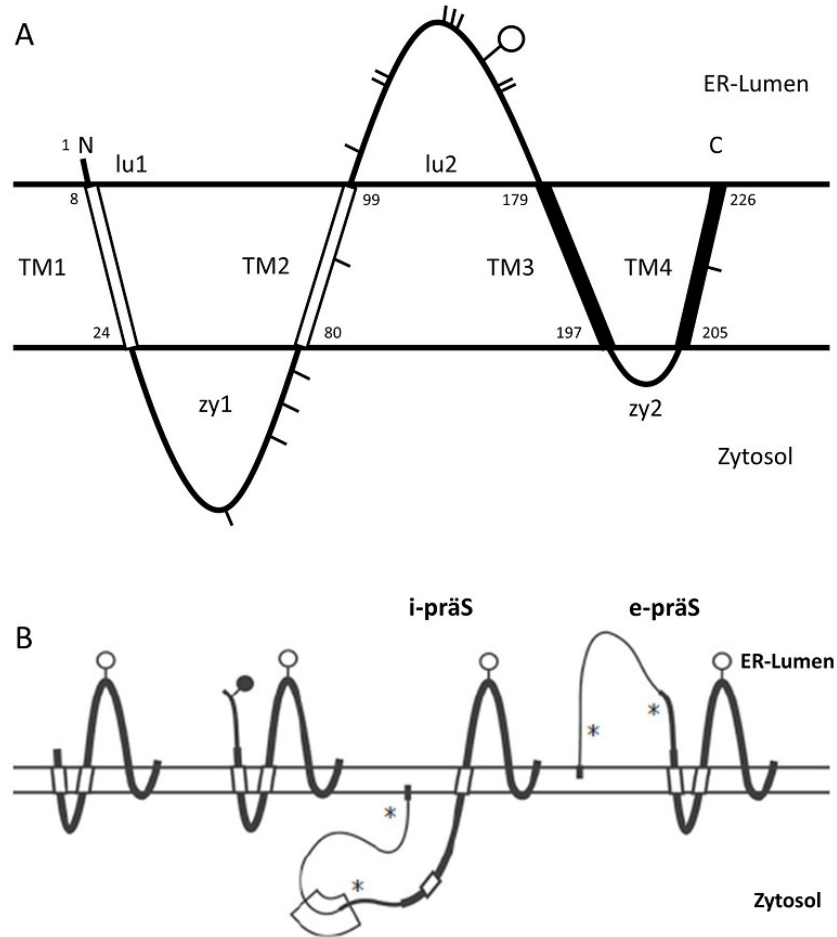


Abbildung 1.6: Membrantopologie der HBV-Hüllproteine. (A) Membrantopologie des S-Proteins. Das S-Protein durchtritt die ER-Membran vier Mal mit den Transmembrandomänen 1–4 (TM 1–4). In der luminalen Schleife 2 (lu2) befinden sich acht Cysteinreste (kurze, schwarze Striche), die für die Ausbildung von Disulfidbrücken benötigt werden. Des Weiteren befinden sich dort die N-Glykosylierungsstelle am Asn 146 (weißer Kreis) sowie das Hauptepitop von S. (B) Membrantopologie der drei Oberflächenproteine S (links), M (Mitte) und L (rechts). Alle drei Oberflächenproteine teilen die S-Domäne. Das M-Protein trägt zusätzlich die 55 AS große präS2-Domäne, die eine weitere N-Glykosylierungsstelle trägt (schwarzer Kreis). Das L-Protein besteht aus der präS1-, präS2- und der S-Domäne und kommt in zwei Konformationen vor: i-präS und e-präS. TM: Transmembrandomäne, N: N-Terminus, C: C-Terminus, lu: luminaler Schleife, zy: zytosolische Schleife (modifiziert nach [47]).

Als typische Transmembranproteine werden die drei Hüllproteine am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, durchtreten die ER-Membran mehrfach und haben somit eine relativ komplexe Topologie (siehe Abbildung 1.6).

Das S-Protein durchtritt die ER-Membran wahrscheinlich mit vier Transmembrandomänen (TM1–TM4). Zunächst inseriert das S-Protein mit Hilfe einer N-terminalen Signalsequenz (hydrophober Bereich AS 8–22, Typ-I-Signal) in die ER-Membran, wobei die Signalsequenz nicht von einer zellulären Signalpeptidase entfernt wird, sondern in der ER-Membran verbleibt [91]. Mit Hilfe der TM2 (hydrophober Bereich AS 80–98, Typ-II-Signal) wird das S-Protein in der ER-Membran verankert. Dieses Signal transloziert die C-terminalen Bereiche von S in das ER-Lumen [92, 93]. Die AS zwischen TM1 und TM2 verbleiben im Zytosol und werden auch als zytosolische Schleife 1 bezeichnet. Der hydrophobe C-Terminus von S durchtritt die ER-Membran vermutlich noch zweimal. Dies führt zur Bildung der sogenannten luminalen Schleife von AS 99–169, da diese AS im ER-Lumen lokalisieren. Diese luminalen Schleife enthält die N-Glykosylierungsstelle am Asn 146 sowie das Hauptepitop von S. Die luminalen Schleife befindet sich bei SVP und Virionen auf der Außenseite der Partikel [92–95].

Für die Reifung des S-Proteins am ER und die Umhüllung von Virionen und SVP ist die Interaktion mit der zellulären Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) essentiell. PDI katalysiert die Vernetzung von S-Homodimeren über Disulfidbrückenbindungen im ER bevor S-Homodimere vermutlich in einem ER/präGolgi Kompartiment zu höheren Oligomeren assemblieren [96]. Zusätzlich konnten [97], zeigen, dass S spezifisch mit dem zellulären Chaperon Cyclophilin A (CypA) interagiert und dessen Sekretion erhöht [98]. Des Weiteren interagiert S mit dem Membranprotein LC3, das ein Teil der zellulären Autophagozytose-Maschinerie ist. Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Umhüllung von HBV [99].

Das S-Protein ist der Hauptproteinbestandteil sowohl der Hülle viraler als auch subviraler Partikel. Neben dieser Funktion spielt S zusammen mit L auch eine wichtige Rolle bei der Anlagerung und Aufnahme von infektiösen Partikeln an und in Hepatozyten sowie bei der Umhüllung von Nukleokapsiden.

Die Membrantopologie des M-Proteins ist identisch mit der des S-Proteins. Die zusätzliche präS2-Domäne wird ebenfalls über das Typ-I-Signal der S-Domäne in das ER-Lumen transloziert [88, 100, 101]. Das M-Protein wird in SVP und Virionen eingebaut, ist aber für deren Bildung nicht essentiell [102]. Des Weiteren wird es auch nicht für die Infektion benötigt [103].

Für das L-Protein sind zwei unterschiedliche Konformationen an der ER-Membran möglich. Während der Translation wird das L-Protein über das Typ-II-Signal der S-Domäne wie das S- und M-Protein in der ER-Membran verankert. Die präS-Domänen verbleiben zunächst auf der zytosolischen Seite der ER-Membran (I-präS-Konformation). Nach der Translation transloziert bei ca. der Hälfte der L-Proteine die präS-Domäne vermutlich über das Typ-I-Signal der S-Domäne in das ER-Lumen (E-präS-Konformation) [90, 104–108]. In beiden Konformationen wird das L-Protein am Gly 2 myristoyliert [109]. [110] konnten zeigen, dass die Myristoylierung des L-Proteins verhindert, dass dieses effizient in SVP eingebaut und sekretiert wird. Es ist jedoch für die Bildung von Virionen [110, 111] und für die HBV/HDV-Infektion von Hepatozyten essentiell [22, 112–117].

Die luminalen Schleife der S-Domäne enthält insgesamt 8 Cysteinreste, die zur Vernetzung der drei Oberflächenproteine durch Ausbildung von Disulfidbrücken führen [118–120]. Kurz nach ihrer Synthese können Homo- und Heterodimere von S, M und L detektiert werden. Weitere vier Cysteine sind in der luminalen Schleife 1 lokalisiert, die allerdings nicht in die intermolekulare Disulfidbrückenbildung involviert sind. Allerdings verhindert die Mutation von Cystein 48, 65 oder 69 zu Serin im HBV-Subtyp *ayw* die Sekretion von SVP [118]. Die genaue Funktion dieser Cysteine ist allerdings unklar, da bislang keine posttranslationale Modifikation mit Fettsäuren detektiert werden konnte [109].

1.6 Infektionszyklus

Der erste Schritt einer HBV-Infektion ist die unspezifische Anlagerung von infektiösen HBV-Partikeln an Heparinsulfat-Proteoglykane einer Zelle [121]. Über die spezifische Interaktion mit dem *Taurocholate-Cotransport-Polypeptide*-(NTCP)-Rezeptor, der hauptsächlich in Hepatozyten exprimiert wird [22], kommt es im Anschluss vermutlich zur endozytosevermittelten Aufnahme von Virionen durch Hepatozyten [122]. Für die Aufnahme sind das myristoylierte Gly 2 der präS1-Domäne, die 75 N-terminalen AS der präS1-Domäne sowie die hydrophobe TM1 der S-Domäne des L-Proteins essentiell [113, 116, 123–126]. Das nicht mehr umhüllte Nukleokapsid wird aus Endozytosepartikeln ins Zytoplasma abgegeben. Hier wird das Nukleokapsid mit Hilfe eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) am C-Terminus von Core-Proteinen zum Nukleus transportiert und gibt das rcDNA-Genom über einen *Nuclear-Pore*-Komplex in den Zellkern ab. Die Phosphorylierung des Core-Proteins ist für diesen Schritt essentiell [127, 128]. Mit Hilfe zellulärer DNA-Replikationsmechanismen und der viralen Polymerase wird der (+)-Strang der rcDNA vervollständigt und die cccDNA gebildet. Bis zu 50 cccDNA-Moleküle können im Zellkern in episomaler Form als Nukleosomen verbleiben und persistieren [129, 130]. In hepatozellulären Karzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass die cccDNA auch in das zelluläre Genom integrieren kann [131]. Die Integration scheint ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von HCC zu sein, ist jedoch für die Replikation von HBV nicht essentiell [132].

Die cccDNA dient im Weiteren als Vorlage für die Transkription der viralen sgRNA, prä-coreRNA und pgRNA. Diese von der zellulären RNA-Polymerase-II neu synthetisierten RNA-Moleküle werden ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation der sieben viralen Proteine stattfindet. Die Synthese von e und der drei Hüllproteine S, M und L findet am ER statt. Im Nukleokapsid findet die Neusynthese des vollständigen (-)-DNA-Stranges bei gleichzeitigem Abbau der pgRNA und die Neusynthese des unvollständigen (+)-DNA-Stranges statt [56]. Reife Nukleokapside werden entweder zurück in den Nukleus transportiert, um die Persistenz von HBV-Genomen in der Zelle sicherzustellen und die Anzahl der cccDNA-Moleküle zu erhöhen, oder umhüllt [133]. Vermutlich durchläuft das reife Nukleokapsid während der (+)-DNA-Strang Neusynthese eine Konformationsänderung, da in sekretierten Virionen ausschließlich rcDNA-haltige Kapside zu finden sind [134]. Durch diese Konformationsänderung kommt es wahrscheinlich zu einer direkten Interaktion des Kapsids mit den Hüllproteinen S und L. Dies konnte durch verschiedene Mutationsanalysen gezeigt werden. Wichtige Bereiche scheinen demnach die AS 103–124 des L-Proteins, die AS 35–46 in der zytoplasmischen Schleife 1 der S-Domäne sowie 11 AS des Core-Proteins zu sein [135–137]. Weiterhin konnte bislang gezeigt werden, dass sowohl das L-Protein als auch Kapside mit dem zellulären Faktor γ -Adaptin direkt interagieren [138, 139]. Diese Interaktion rekrutiert vermutlich Kapside sowie die Hüllproteine zum Ort der Umhüllung. Mit Hilfe der zellulären *Endosomal-sorting-Complex-required-for-Transport*-(ESCRT)-Maschinerie werden reife Kapside umhüllt, knospen in zelluläre *Multivesicular-Bodies* (MVB) und werden dann aus der Zelle ausgeschleust [140–143]. Nicht infektiöse SVP und reife e-Proteine werden von den Zellen über das ER und den Golgi-Apparat sekretiert [96, 144, 145]. Eine schematische Übersicht über den HBV-Infektionszyklus gibt Abbildung 1.7.

1.7 Subvirale Partikel

Neben infektiösen Partikeln sekretieren HBV-infizierte Zellen sehr effizient sphärische und filamentöse, nicht infektiöse SVP. Sie bestehen aus den viralen Oberflächenproteinen und zellulären Lipiden und weisen im Vergleich zu Virionen eine bis zu 10^4 -fach höhere Konzentration im Serum auf [94, 146–148]. Bislang ist die Bedeutung der Überproduktion von SVP nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass SVP das Wirtsimmunsystem un-

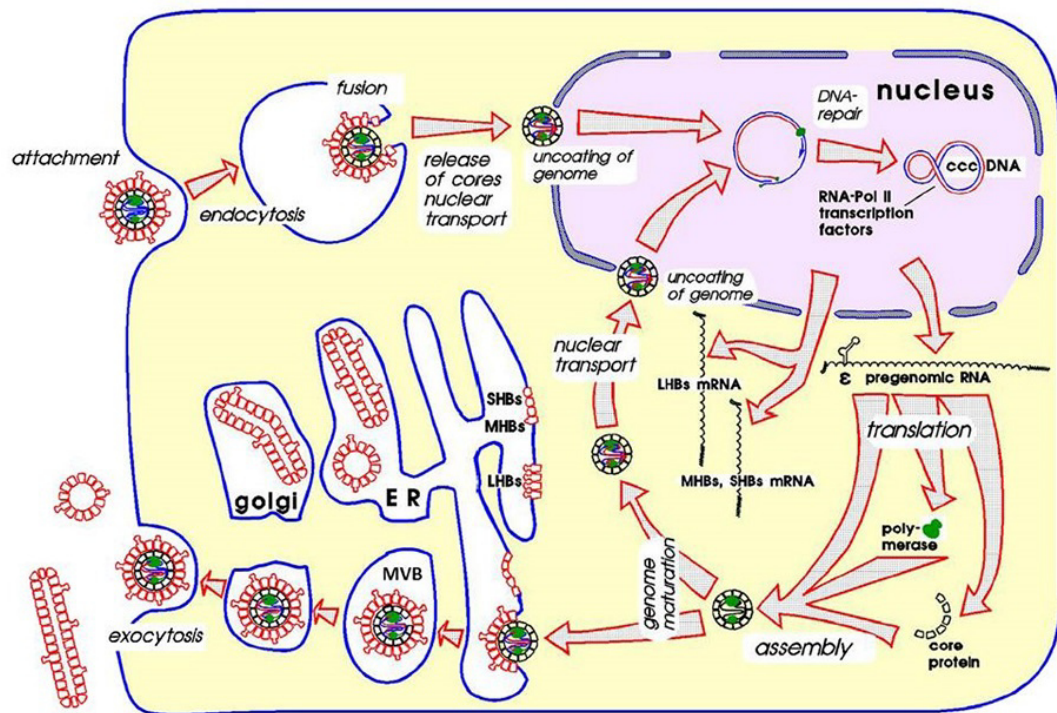


Abbildung 1.7: HBV-Infektionszyklus. Nach der Anlagerung an Heparinsulfat-Proteoglykane und den NTCP-Rezeptor kommt es zur endozytosevermittelten Aufnahme von HBV-Virionen durch Hepatozyten. Die Kapside geben das Genom über einen *Nuclear-Pore*-Komplex in den Nucleus ab, wo die Bildung von cccDNA stattfindet. Von dieser werden die pgRNA, präcoreRNA und die sgRNAs transkribiert und in das Zytoplasma transportiert. Die Synthese der drei Oberflächenproteine findet am ER statt, wo sie zu SVP assemblieren und über den Golgi sekretiert werden. Im Zytoplasma werden die Polymerase und das Core-Protein translatiert, wo sie zusammen mit der pgRNA zu unreifen Kapsiden assemblieren. Nach der Synthese von neuer genomischer HBV-DNA durch die RT-Domäne der Polymerase werden reife Kapside entweder zurück in den Nucleus transportiert oder von den Oberflächenproteinen umhüllt und über MVBs von Hepatozyten sekretiert [6].

terdrücken und modulieren können, was eine produktive und persistierende HBV-Infektion erleichtert [149–153].

1.7.1 Morphologie subviraler Partikel

Im Gegensatz zu Virionen haben sphärische SVP einen Durchmesser von 20 nm und bestehen hauptsächlich aus S-Protein und sehr wenig L-Protein. Filamentöse SVP haben unterschiedliche Längen und bestehen ebenfalls aus weniger L-Protein als Virionen (Heermann et al., 1984; Ganem und Varmus, 1987). Nach Synthese des S- und M-Proteins am ER können diese sehr effizient SVP bilden und werden über den konstitutiven Sekretionsweg von den Zellen ausgeschleust. Im Gegensatz hierzu ist das L-Protein allein nicht in der Lage SVP zu bilden, sondern hat eine inhibitorische Wirkung auf die Produktion von SVP. Sphärische SVP weisen eine oktaedrische Grundstruktur auf, bestehen aus ca. 100 dichtgepackten S-Proteinen und haben einen Lipidanteil von ca. 25 %. Dies deutet darauf hin, dass SVP keine typische Lipid-Doppelschicht enthalten [85, 94, 146, 154]. Die Lipide bestehen in SVP, die aus Patientenserum isoliert wurden, hauptsächlich aus Phosphatidylcholin, Cholesterylester und Cholesterol (60 %/15 %/15 %) [94].

1.7.2 Sekretionsweg

SVP werden von infizierten Zellen in wesentlich größerer Zahl sekretiert als Virionen. Im Gegensatz zu Virionen werden SVP allerdings nicht mit Hilfe der zellulären ESCRT-Maschinerie sekretiert, was auf einen zweiten Sekretionsweg hindeutet [140–142]. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Die Oberflächenproteine als integrale ER-Transmembranproteine werden zunächst partiell (ca. 50 %) nach ihrer Synthese am ER am Asn 146 N-glykosyliert [95]. Durch die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten der luminalen Schleife der S-Domäne kommt es kurz nach der Synthese zur Bildung von stabilen Proteindimeren [118, 120]. Neben den Cysteinresten scheint auch die TM2 des S-Proteins eine wichtige Rolle bei der Interaktion von S-Proteinen zu spielen [155]. Diese Dimere bilden die Baueinheit oktaedrisch aufgebauter SVP [154]. Huovila *et al.* [96] konnten zeigen, dass die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) diese Vernetzung zu Dimeren im ER katalysiert. Sie vermuten weiterhin, dass die Vernetzung zu höheren Oligomeren in einem ER/Golgi intermediären Kompartiment (ER/Golgi-*intermediate-Compartment*, ERGIC) abläuft, da eine zu hohe PDI Konzentration im ER die Bildung dieser Oligomere verhindern würde. Andere Publikationen deuten jedoch darauf hin, dass S-Dimere bereits im perinukleären Raum des ER verzweigte und vernetzte Filamente bilden und über Vesikel zum ERGIC transportiert werden. Die Abwesenheit einer typischen Lipid-Doppelschicht in SVP deutet darauf hin, dass S-Dimere sehr effizient Selbstassemblieren und nicht in die ER Membran knospen. Durch zelluläre Chaperone werden sphärische SVP von diesen Filamenten im ERGIC abgeschnürt und zum Golgi transportiert [97, 98, 143, 144, 156–158]. Im Golgi erfolgt die Umwandlung der mannose-reichen Glycanreste des S-Proteins zu komplexen Glycanresten, bevor diese von den Zellen sekretiert werden [144, 159].

1.8 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der Arbeit war zum einen, durch Koexpression von GFP-LD_{Ag} und mCherry-S sowie dem Wildtyp HBV-L-Protein doppelt-fluoreszenzmarkierte HDV-Pseudovirionen herzustellen. Mit diesem Werkzeug sollte das intrazelluläre Organell, an dem das HDV-Virusbudding stattfindet, näher charakterisiert und die Aufnahme der Pseudoviren in HepaRG-Zellen studiert werden.

Des Weiteren hatten Vorarbeiten gezeigt, dass die transmembranen Bereiche des S-Proteins nicht nur für die korrekte Membrantopologie und Stabilität von S verantwortlich sind, sondern vermutlich auch eine wichtige Funktion in der Partikelmorphogenese und der Oligomerisierung von S übernehmen. Zusätzlich zu diesen transmembranen Bereichen sollte auch die Rolle luminaler und zytoplasmatischer Domänen des S-Proteins bei der Oligomerisierung näher charakterisiert werden. Dabei sollten die Domänen und Aminosäurereste, die für diese Interaktionen wichtig sind, durch Mutagenese und Interaktionsstudien identifiziert werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss unterschiedlicher Mutationen, Substitutionen und Deletionen in S im Hinblick auf dessen Lokalisation, Stabilität und Membrantopologie untersucht werden.

Weiterhin sollte der Beitrag der identifizierten und für die Oligomerisierung von S wichtigen Bereiche für die HBV-Virus-, HBV-SVP- und HDV-Partikelmorphogenese genauer studiert werden.

Insgesamt sollten die Daten dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der noch immer wenig verstandenen frühen Schritte der HBV/HDV-Partikelmorphogenese beitragen.

2 Material

2.1 Bakterien

E.coli DH10B

Der *E.coli*-Laborstamm DH10B wurde für die Transformation mit neu generierten Plasmiden oder für Retransformationen verwendet.

Genotyp: *F-mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\psi 80dlacZ\Delta$ *M15* $\Delta lacX74$ *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* $\Delta(ara, leu)7697$ *galU* *galK* λ -*rpsL* *nupG*.

2.2 Eukaryotische Zellen

HuH-7

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Leberkarzinomzelllinie HuH-7 verwendet. Sie stammt aus dem Lebertumor eines 57-jährigen Japaners [160]. HuH-7-Zellen sind nicht mit HBV infizierbar. Nach Transfektion mit HBV spezifischen Plasmiden werden allerdings virale Proteine, Virionen oder SVP gebildet und sekretiert und können für die weitere Analyse verwendet werden.

2.3 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Die HDV-SDAg, HDV-LDAg und HBV-S-TM2-Sequenzen sowie die TM-Sequenz des humanen Transferrin Rezeptors I (HTR) wurden über die *BsrGI* und *NotI* bzw. *XhoI* und *EcoRI*-Schnittstellen in die Plasmide peGFP/YFP-N1 bzw. pmTagBFP-C1 kloniert (siehe Abbildung 2.1).

Die YFP/BFP-Sequenzen mit der N-terminalen Signalsequenz des Rabiesvirus Glykoproteins (RV) wurden über die Schnittstellen *BamHI* und *XhoI* in den Vektor pSVBX24H-mCherry-L5 [161] kloniert.

Alle über PCR generierten Substitutionen, Punktmutationen und Deletionen in der S-Sequenz wurden über die Schnittstellen *XbaI*, *SpeI*, *EcoRV* und *PstI* in die Plasmide pSV-BX24H [162], pSVBX24H-YFP/BFP und pSV45–47 [135] kloniert (siehe Abbildung 2.2 und 2.3).

Plasmide	Beschreibung
peGFP/YFP-N1 [163]	kodieren für das grün und gelb fluoreszierende Protein (GFP und YFP)
pmTagBFP-C1 (AG Schindler)	kodiert für das blau fluoreszierende Protein (BFP)
pmTagBFP-eYFP (AG Schindler)	kodiert für das BFP-YFP-Fusionsprotein
peYFP/BFP-MEM [163]	kodieren für das YFP/BFP-MEM (palmitoyliertes Peptid)
pCFP-GalT [164]	kodiert für CFP-Galaktosyltransferase
pSVL(D3) (D. Glebe)	Trimer des HDV-Genoms
peGFP/YFP-SDAg/LDAg	kodieren für GFP/YFP-SDAg und LDAg
pHA-SDAg/LDAg	kodiert für HA-SDAg und LDAg

Plasmide	Beschreibung
peYFP/BFP-TM2-HA	kodieren für YFP/BFP-TM2-HA. 22 AS lange TM2: RRFIIFLFILLLCLIFLLVLLD
peYFP/BFP-HTR-HA	kodieren für YFP/BFP-HTR. 27 AS langes Typ-II-Signal des humanen Transferrin-Rezeptors: CSGSI-CYGTVAVIVFFFLIGFMIGYLYG [165]
peYFP/BFP-TM2-Leu84-98Ala-HA	kodieren für YFP/BFP-TM2-Leu84-98Ala-HA. In der TM2-Sequenz sind die drei Leuzine an Position 84, 91 und 98 (relativ zur AS-Sequenz des HBV-S-Proteins) zu Alaninen mutiert
peYFP/BFP-TM2polyA-HA	kodieren für YFP/BFP-TM2polyA-HA. In der TM2-Sequenz sind die 13 zentralen AS zu Alaninen mutiert (RRFIIAAAAAAAAAAAAAAAAVLLD)
peYFP-N1-HCV-E2 [164]	kodiert für das HCV-E2-YFP-Fusionsprotein
pSVBX24H [162]	kodiert für das kleine HBV-Hüllprotein S
pSVBX24H-mCherry-L5 [161]	kodiert für das mCherry-S-Fusionsprotein
pSVBX24H-YFP/BFP	kodieren für die BFP/YFP-S-Fusionsproteine
pSVBX24H-Derivate	Alle YFP/BFP markierten S-Derivate hatten die Plasmide pSVBX24H-YFP und BFP zur Grundlage, alle HA-markierten S-Derivate hatten das Plasmid pSVBX24H zur Grundlage. Alle S-Mutanten werden im Ergebnisteil beschrieben
pSV45-47 [135]	kodiert für die drei HBV-Hüllproteine S,M und L
pSV45-47-Derivate	Alle pSV45-57-Derivate basieren auf dem Plasmid pSV45-47 und werden im Ergebnisteil beschrieben
pSVHBV1.1LE- [166]	kodiert die gesamte Sequenz des HBV-Genoms (Genotyp A, Subtyp <i>adw2</i> [167]) mit zwei Stopkodons im ORF der Oberflächenproteine und einer Sequenzredundanz von 164 nt
pSVHBV1.5LE- [166]	kodiert das gesamte HBV-Genom

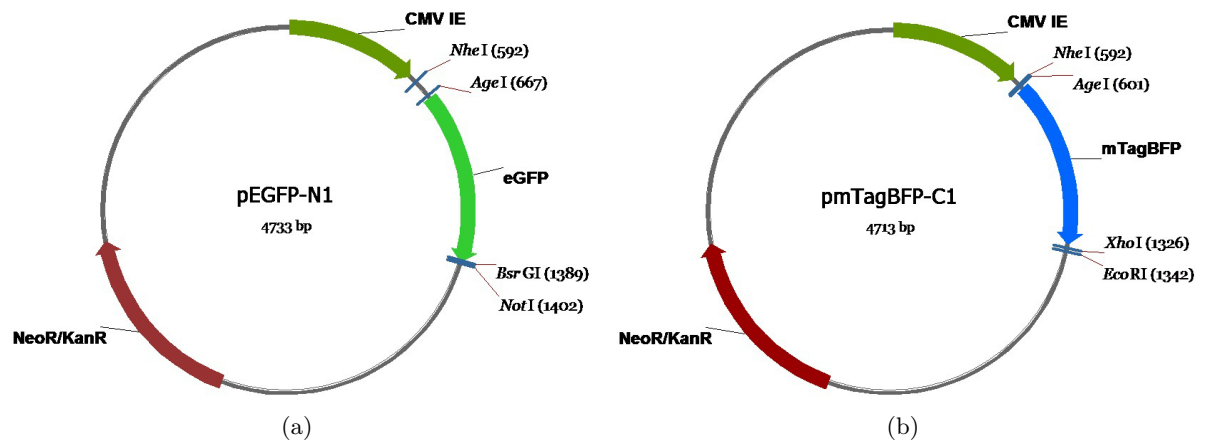


Abbildung 2.1: peGFP-N1- [163] (a) und pmTagBFP-C1-Plasmidkarte (AG Schindler) (b). GFP bzw. BFP unter der Kontrolle des CMV-*Immediate-Early*-Promotors. Vor der GFP/BFP-Sequenz erste *Multiple-Cloning-Site* (MCS) mit den Schnittstellen *NheI* und *AgeI*. Nach der GFP-Sequenz zweite MCS mit den Schnittstellen *BsrGI* und *NotI* bzw. nach der BFP-Sequenz mit den Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI*. Plasmide mit Kanamycin-Resistenz zur Selektion in *E.coli* (KanR). Aufbau des peYFP-N1-Plasmids analog zum peGFP-N1-Plasmid.

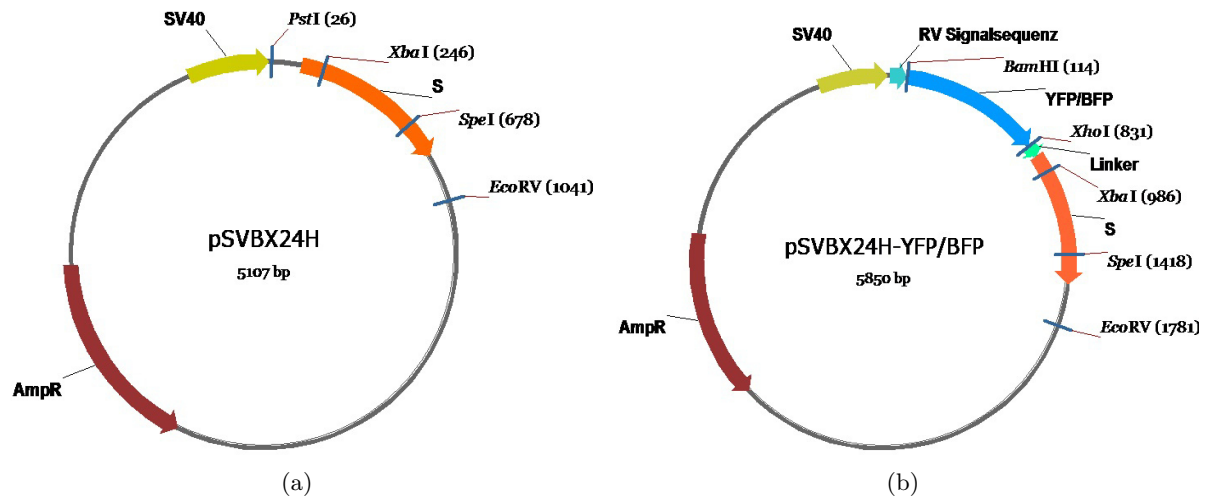


Abbildung 2.2: pSVBX24H- [162] (a) und pSVBX24H-YFP/BFP-Plasmidkarte (b). S bzw. YFP/BFP-S unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Die YFP/BFP-Sequenz wurde über die *Bam*HI und *Xho*I-Schnittstellen in den Vektor pSVBX24H-mCherry-L5 [161] kloniert. Plasmide mit Ampicilin-Resistenz zur Selektion in *E.coli* (AmpR).

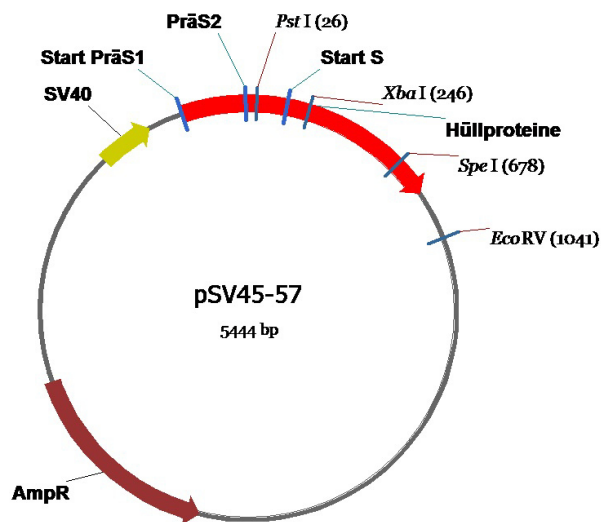


Abbildung 2.3: pSV45-57-Plasmidkarte [135]. S, M und L unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Die ersten 30 Kodons der präS1 sind deletiert, was zur effizienteren Sekretion von Virionen führt. Plasmid mit Ampicilin-Resistenz zur Selektion in *E.coli* (AmpR).

2.4 Primer

Primer	Sequenz	Beschreibung
LDAg_for	5'-gtgcggccgctcactggggtcg-3'	Amplifikation von DA _g aus pSVL(D3) mit <i>NotI</i> -Schnittstelle
LDAg_rev	5'-gctgtacaaggagcaggtgcaggagcatgagccggtcc-3'	Amplifikation von DA _g aus pSVL(D3) mit <i>BsrGI</i> -Schnittstelle
LDAg_mut1_for	5'-ccagggatttccatgggatatactcttcc-3'	Mutation des Stopkodons TAG im DA _g zu TGG
LDAg_mut2_rev	5'-ggaagagtataatccatggaaatccctgg-3'	Mutation des Stopkodons TAG im DA _g zu TGG
LDAg_mut3_rev	5'-ttgatgagtttgacaaacc-3'	<i>Reverse</i> -Primer für LDAg_mut1_for
HA_LDAg_for	5'-actgctagcatgtaccatacagatgttccagattacgctatgagccggtcc-3'	Amplifikation von DA _g aus pEGFP-N1-S/LDAg mit <i>NheI</i> -Schnittstelle und HA-Tag
DAg_rev	5'-gtcaccggttactggggtcg-3'	<i>Reverse</i> -Primer für HA_LDAg_for mit <i>AgeI</i> -Schnittstelle
YFP-TM2-HA	5'-gatgctgtacaaggagcaggtgcaggagcagcggtttatc-3'	Amplifikation von S-TM2 aus pSV-BX24H mit <i>BsrGI</i> -Schnittstelle
YFP-TM2-HA_rev	5'-gatgtcggccgctaagcgtaacttggaacatcgatggtaatccagaagaac-3'	Amplifikation von S-TM2 aus pSV-BX24H mit <i>NotI</i> -Schnittstelle und HA-Tag
BFP-TM2-HA	5'-cgctcgagctcgcggtttatc-3'	Amplifikation von S-TM2 aus pSV-BX24H mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle
BFP-TM2-HA_rev	5'-ctgaattcctaagcgtaacttggaacatcgatggtaatccagaagaac-3'	Amplifikation von S-TM2 aus pSV-BX24H mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle und HA-Tag
TM2_LZ1_for	5'-ttatcatattcgcttcatcctgc-3'	Mutation von Leu84 zu Ala in TM2
TM2_LZ1_rev	5'-gcaggatgaaggcgaatatgataa-3'	Mutation von Leu84 zu Ala in TM2
TM2_LZ2_for	5'-tgctgctatgcgccatcttctt-3'	Mutation von Leu91 zu Ala in TM2
TM2_LZ2_rev	5'-ataagaagatggcgcatagcagca-3'	Mutation von Leu91 zu Ala in TM2
TM2_LZ3_for	5'-tattggttcttgcgattatcaag-3'	Mutation von Leu98 zu Ala in TM2
TM2_LZ3_rev	5'-cttgataatccgaagaaccaata-3'	Mutation von Leu98 zu Ala in TM2
YFP-HTR-HA	5'-gatgctgtacaaggagcaggagcatgtagtggagt-3'	Amplifikation des Typ-II-Signals des HTR mit <i>BsrGI</i> -Schnittstelle
YFP-HTR-HA_rev	5'-gatgtcggccgctaagcgtaacttggaacatcgatggtaatagccaagta-3'	Amplifikation des Typ-II-Signals des HTR mit <i>NotI</i> -Schnittstelle und HA-Tag
BFP-HTR-HA	5'-cgctcgagctttagtggaagt-3'	Amplifikation des Typ-II-Signals des HTR mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle
BFP-HTR-HA_rev	5'-ctgaattcctaagcgtaacttggaacatcgatggtaatagccaagta-3'	Amplifikation des Typ-II-Signals des HTR mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle und HA-Tag
YFP-TM2Ala-HA	gatgctgtacaaggagcaggtgcaggagc-acggcgtttatcatagcagca-gcagcagcagctgccgctgcg	Amplifikation von S-TM2 Alanin aus pSVBX24H mit <i>BsrGI</i> -Schnittstelle
YFP-TM2Ala-HA_rev	gatgtcggccgctaagcgtaacttggaacatcgatggtaatccagaagaactgctgctgctgccgagcggcagc	Amplifikation von S-TM2 Alanin aus pSVBX24H mit <i>NotI</i> -Schnittstelle und HA-Tag
BFP-TM2Ala-HA	cgctcgagctcgcggtttatcatagcagcagc-agcagcagctgccgctgcg	Amplifikation von S-TM2 Alanin aus pSVBX24H mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle

Primer	Sequenz	Beschreibung
BFP-TM2Ala-HA_rev	ctgaattcctaagcgtaatctggaacatcgta-tgggtaatccagaagaactgctgctgctgccg-cagcggcagc	Amplifikation von S-TM2 Alanin aus pSVBX24H mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle und HA-Tag
mCherryS-L5-XhoI_for	5'-caagtccctcgagccccccacctc-3'	<i>XhoI</i> -Schnittstelle in Linker-Sequenz einfügen
mCherryS-L5-XhoI_rev	5'-gaggtggcgggctcgaggacttg-3'	<i>XhoI</i> -Schnittstelle in Linker-Sequenz einfügen
mCherryS-L5_for	5'-ctattccagaagtagtgagg-3'	<i>Forward</i> -Primer für mCherryS-L5-XhoI_rev
mCherryS-L5_rev	5'-ctatggccaagccccagc-3'	<i>Reverse</i> -Primer für mCherryS-L5-XhoI_for
mTagBFP_BamHI_for	caagggatccaccatgagcagctg	Amplifikation von mTagBFP mit <i>BamHI</i> -Schnittstelle
mTagBFP_XhoI_rev	gtcctcgaggaattaagcttgtgc	Amplifikation von mTagBFP mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle
YFP_BamHI_for	5'-caagggatccatggtgagcaag-3'	Amplifikation von YFP mit <i>BamHI</i> -Schnittstelle
YFP_XhoI_rev	5'-gtcctcgagcagctcgtccatgcc-3'	Amplifikation von YFP mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle
S_Cys6-8_Ser_for	5'-gtttctcctctaattccaggatcaacaacaaccagtacgggaccatccaaaacctccagc-3'	Mutation von Cys107/121/124 zu Serin in S
S_Cys6-8_Ser_rev	5'-cgtggagggttttgatggtcccgtactggt-tgttggatcctggaattagaggagaaac-3'	Mutation von Cys107/121/124 zu Serin in S
S_Cys9-13_Ser_for	5'-ccctcatcttctctacaaaacctacggatg-gaaattccacctctattccatc-3'	Mutation von Cys137-139/147/149 zu Serin in S
S_Cys9-13_Ser_rev	5'-gatgggaatagaggtggaatttccatccgt-aggttttagaggaagatgaggg-3'	Mutation von Cys137-139/147/149 zu Serin in S
S_Cys1_Ser_for	5'-ggatctcccgtgtctctggccaa-3'	Mutation von Cys48 zu Serin in S
S_Cys1_Ser_rev	5'-ttggccaagagacacgggagatcc-3'	Mutation von Cys48 zu Serin in S reverse
S_Cys2_Ser_for	5'-ccaacctctcgctccaatttgc-3'	Mutation von Cys65 zu Serin in S
S_Cys2_Ser_rev	5'-gacaaattggagcagaggagttgg-3'	Mutation von Cys65 zu Serin in S reverse
S_Cys3_Ser_for	5'-cctccaatttctcctggttatgc-3'	Mutation von Cys69 zu Serin in S
S_Cys3_Ser_rev	5'-gcgataaccagagaaattggagg-3'	Mutation von Cys69 zu Serin in S reverse
S_Cys4_Ser_for	5'-tatcgctggatgtctctgcggcgt-3'	Mutation von Cys76 zu Serin in S
S_Cys4_Ser_rev	5'-acgccgcagagacatccagcgata-3'	Mutation von Cys76 zu Serin in S reverse
S_TM2Ala	5'-cggcgtttatcatagcag-cagcagcagcagctgccg-tgcccagcagcagcagcttcttctggat-3'	Mutation von TM2 zu Polyalanin in S
S_TM2Ala_rev	5'-atccagaagaactgctgctg-tgccgagcggcagctgctgctg-ctgctgctatgataaaacgccg-3'	Mutation von TM2 zu Polyalanin in S
S_Stop178	5'-gtttactagtgaatttgttcag-3'	Stopkodon an AS 178 in S einfügen
S_Stop178_rev	5'-ctgaacaaattacactagtaaac-3'	Stopkodon an AS 178 in S einfügen
S_Stop153	5'-cccataatctgctc-3'	Stopkodon an AS 153 in S einfügen
S_Stop153_rev	5'-caggacgattagatggg-3'	Stopkodon an AS 153 in S einfügen
S_Stop100_HA_rev	5'-gcactagtctaagcgtaatctggaacatcg-tatgggtaatccagaagaac-3'	Stopkodon an AS 100 in S einfügen mit HA-Tag und <i>SpeI</i> -Schnittstelle
S_Stop153_HA_rev	5'-gcactagtctaagcgtaatctggaacatc-gtatgggtagatgggaat-3'	Stopkodon an AS 153 in S einfügen mit HA-Tag und <i>SpeI</i> -Schnittstelle

2 Material

Primer	Sequenz	Beschreibung
S_HA_rev	5'-gcatatcctaagcgtaatctggaacatcg-tatgggtaaatgtataacca-3'	HA-Tag am C-Terminus von S in pSVBX24H
S_TM1Ala	5'-tcaggattcctagcagcagcagcagcagc-tgccgaggcagcagcagcattgacaagaatc-3'	Mutation von TM1 zu Polyalanin in S
S_TM1Ala_rev	5'-gattcttgtcaatgctgctgctgccgaggc-agctgctgctgctgctgtaggaatctga-3'	Mutation von TM1 zu Polyalanin in S
S_Stop178_HA_rev	5'-gcatatcctaagcgtaatctggaacatcg-tatgggtacactagtaa-3'	Stopkodon an AS 153 in S einfügen mit HA-Tag und <i>EcoRV</i> -Schnittstelle
LDaG_sequ_for	5'-aaccggcgggccggc-3'	Sequenzierprimer 1 für LDaG
LDaG_sequ_rev	5'-agggcccgaacggacc-3'	Sequenzierprimer 2 für LDaG
D3_sequ_for	5'-aatcacctccagagg-3'	Sequenzierprimer 1 für pSVL(D3)
D3_sequ_rev	5'-tggcatctccacctcc-3'	Sequenzierprimer 2 für pSVL(D3)
pSVB24HX_sequ	5'-cacatctegtcaatctcc-3'	Sequenzierprimer 1 für pSVBX24H
pSVB24HX_sequ_rev	5'-ggagattgacgagatgtg-3'	Sequenzierprimer 2 für pSVBX24H
mCherry_sequ	5'-gaagaagaccatgggctgg-3'	Sequenzierprimer für mCherry
mTagBFP_sequ	5'-gactggaaagaatcaagg-3'	Sequenzierprimer für mTagBFP
SV40_sequ	5'-ctattccagaagtagtgagg-3'	Sequenzierprimer für SV40-Promotor

2.5 Antikörper

Erstantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-beta-Tubulin (Kaninchen)	NEB	WB 1:4000
Anti-Calnexin (Kaninchen)	NEB	WB 1:2000, IF 1:100
Anti-GFP (Kaninchen)	NEB	WB 1:2000
Anti-HA (Kaninchen)	Sigma-Aldrich	WB 1:2000–1:4000, IF 1:100
Anti-Histon 4	AG Brack-Werner	WB 1:2000
Anti-mCherry (Kaninchen)	Bio-Vision	WB 1:2000
Anti-PDI (Kaninchen)	NEB	WB 1:2000, IF 1:100
Anti-S (HB1)	D. Glebe, Gießen	WB 1:4000, IF 1:100
Anti-S (polyklonales Schafserum)	W. Gerlich, Gießen	2 µl/IP, IF 1:100
Zweitantikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Maus-PO	Dianova	WB 1:2000–1:4000
Ziege-anti-Kaninchen-PO	Dianova	WB 1:2000–1:4000
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488	Life Techn.	IF 1:2000
Ziege-anti-Maus Alexa 488	Life Techn.	IF 1:2000
Esel-anti-Schaf Alexa 555	Life Techn.	IF 1:2000
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 555	Life Techn.	IF 1:2000
Ziege-anti-Kaninchen Alexa 488	Life Techn.	IF 1:2000

2.6 Enzyme

Enzym	Hersteller	Puffer
T4-DNA-Ligase	Fermentas	T4-DNA-Ligase-Puffer
DNase I	Qiagen	10× RDD
Proteinase K	Applichem	2× Proteinase K Puffer
RNase A	Qiagen	-
Restriktionsenzym	Hersteller	Puffer
<i>AgeI</i> -HF	NEB	Puffer 4
<i>BsrGI</i>	NEB	Puffer 4
<i>EcoRI</i> -HF	NEB	Puffer 4
<i>EcoRV</i> -HF	NEB	Puffer 4
<i>NcoI</i>	NEB	Puffer 4
<i>NheI</i> -HF	NEB	Puffer 4
<i>NotI</i> -HF	NEB	Puffer 4
<i>PstI</i>	NEB	Puffer 3
<i>SpeI</i> -HF	NEB	Puffer 4
<i>XbaI</i>	NEB	Puffer 4
<i>XhoI</i> -HF	NEB	Puffer 4

2.7 DNA und Proteinmarker

Marker	Hersteller
GeneRuler™ 100 bp DNA Marker	Fermentas
GeneRuler™ 1000 bp DNA Marker	Fermentas
PageRuler™ Plus Prestained Protein Marker	Fermentas

2.8 Laborgeräte Verbrauchsmaterialien

Laborgeräte	Hersteller
Absaugsystem Zellkultur Vacusafe	Integra Biosciences AG
Brutschrank für Bakterien (37 °C)	Memmert
CO ₂ -Inkubator Zellkultur Hera Cell 150i	Thermo Scientific
Elektroblot-Kammer Fastblot B34	Biometra/Analytic Jena
Elektroporator <i>E. coli</i> Pulser	Biorad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
FACS Canto II	BD Bio Sciences
Feinwaage AC 100	Mettler
Filmkassette 18x24	Agfa Gevaert
Fusion FX	Vilber Lourmat
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C), Hera Freeze	Heraeus
Geldokumentationsanlage	Biorad
Heizwasserbad Zellkultur	Köttermann

Laborgeräte	Hersteller
Hybridisierungsflaschen	Biometra/Analytic Jena
Hybridisierungsöfen Compact Line OV4	Biometra/Analytic Jena
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco17	Thermo Scientific
Laufkammer SDS-PAGE Maxigel	Biometra/Analytic Jena
Laufkammer SDS-PAGE small Multigel	Biometra/Analytic Jena
Magnetrührer Variomag Monotherm	Neolab
Mikroskop Olympus Fluoview	Olympus
Mikroskop Olympus IX81	Olympus
Mikroskop ZK Primo Vert	Carl Zeiss Jena
Mikroskop Ti Eclipse Spinning-Disc	Nikon
Mikrowelle Privileg 9029GD	Privileg
Mini-Zentrifuge (Tischzentrifuge) SproutR	Heathrow Scientific LLC
Nanodrop ND 2000c	Peqlab
PCR-Gerät Mastercycler	Eppendorf
pH-Meter inoLab WTW series	WTW
Pipetten	Eppendorf
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe Accu JetR Pro	Brand
Schüttelinkubator	Infors AG
Spannungsgerät Agarose Power Pack 300	Biorad
Spannungsgerät SDS Standard Power Pack P25	Biometra/Analytic Jena
Spectrophotometer Smart Spec™ Plus	Biorad
Sterilbank Lamin Air HLB2448 GS	Heraeus
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermomixer Compact	Eppendorf
UV-Tisch 312 nm	Bachhofer
Vortexgerät MS3 Basic	IKA Schütt
Waage EG2200-2NM	Kern und Sohn
Wippe Polymax 1040	Heidolph
Zentrifuge ZK Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge ZK Labofuge 400 Function Line	Heraeus

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml/2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 ml/50 ml Falcon	Greiner Bio-One
Einmalküvetten	Braun, Melsungen
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen GelTip 100 ART	Molecular Bio Products
Hyperfilme ECL	GE Healthcare
Kryogefäße	Nunc
Nitrocellulosemembran	Biorad
Objektträger	Carl Roth
PCR-Gefäße	Kisker
Petrischalen	Greiner Bio-One
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Slide-A-Lyzer	Life Techn.
Spitzen Sterican	Braun
Spritzen	Becton Dickinson
Sterilfilter MillexGP 0,22 µm	Millipore
Whatman-Papier	Whatman GmbH

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zellkulturschalen und -flaschen	Nunc

2.9 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
30 % Acrylamid Mix Proto Gel	National Diagnostics
Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth
DAPI (0,1 mg/ml)	Chemicon International
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DSS	Life Techn.
Entwicklerlösung A und B	Agfa Healthcare NV
Esenserum	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fixierlösung	Agfa Healthcare
Fugene HD	Promega
Glukose	Merck
Glycin	Merck
Glycerin (99 %)	Applichem
Glykogen	Fermentas
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
HCl (37 %)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
Kalium-Acetat	Merck
KCl	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	Carl Roth
Methanol	Sigma-Aldrich
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	Merck
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich
MOWIOL	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	Carl Roth
NaCl	Merck
NaOH	Carl Roth
Natriumacetat	Carl Roth
Nonidet P40	Fluka
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol (PEG) 8000	Merck
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth
Protein G PLUS-Agarose	Santa Cruz
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Carl Roth
Triton X-100	Applichem
Triton X114	Sigma-Aldrich

Chemikalien	Hersteller
Tween20	Sigma-Aldrich
X-treme-Gene	Roche
Ziegenserum	Sigma-Aldrich

2.10 Medien

2.10.1 Medien für Zellkultur

Komponente	Hersteller
DMEM mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin	PAA
Na-Pyruvat Lösung (100 mM)	PAA
Penicillin/Streptomycin (100×)	PAA
MEM nicht essentielle AS (100×)	PAA
FCS	Biowest
Trypsin 0,05 % (1×)	Gibco

DMEM⁺⁺⁺⁺: DMEM mit 1 mM Na-Pyruvat, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) MEM nicht essentielle AS und 10 % (v/v) FCS.

2.10.2 Medien für Bakterien

Komponente	Hersteller	Stockkonzentration	Endkonzentration
LB-Medium	Roth	-	-
LB-Agar	Roth	-	-
Ampicillin	Sigma	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	Sigma	50 mg/ml	50 µg/ml

2.11 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer (10×)	50 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol ad 100 % H ₂ O
FACS-Puffer	1 % FCS in PBS (w/v)
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 20 mM EDTA
Blockingpuffer (WB)	0,5 % (v/v) Nonidet P40 10 % (w/v) Magermilchpulver 0,1 % (v/v) Tween20 gelöst in 1× PBS pH 7,4
PBS (1×) pH 7,4	1,4 mM NaCl 0,5 mM KCl

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
PBS-T (WB)	1 mM Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O 2,2 mM KH ₂ PO ₄ 1× PBS pH 7,4 0,1 % Tween20
PFA-Lösung (IF)	2 % (w/v) PFA in H ₂ O bei 60 °C lösen, pH auf 7,4 einstellen
PNL-Puffer	10 mM Tris [pH 7.5] 100 mM NaCl 10 mM EDTA 0.5 % Triton-X100 0.5 % Na-Deoxycholat
Puffer I (Frakt.)	40 mM Tris [pH 7.5] 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0.3 % NP40 (w/v) 1 mM DTT
Puffer II (Frakt.)	10 mM Tris [pH 7.5] 100 mM NaCl 10 mM EDTA 0.5 % Triton-X100 0.5 % Na-Deoxycholat
Puffer I (Minipräp)	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Puffer II (Minipräp)	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer III (Minipräp)	3 M K ⁺ 5 M Acetat- pH mit Eisessig auf 5,5 einstellen
Salzlösung (10×) (WB)	0,2 M Tris 2 M Glycin
SDS-Ladepuffer (5×)	250 mM Tris pH 6,8 10 % (w/v) SDS 7,5 % (v/v) Glycerin 0,05 % /w/v) Bromphenolblau 25 % (w/v) DTT (frisch dazugeben)
SDS-Laufpuffer (10×) (WB)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
TAN-Puffer	50 mM Tris [pH 8] 100 mM NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
TNE-Puffer (HDV)	50 mM Tris [pH 7.5] 150 mM NaCl 5 mM EDTA
Transferpuffer (1×) (WB)	700 ml H ₂ O dest. 100 ml Salzlösung (10×) 200 ml Ethanol

2.12 Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel
NucleoBond [®] Xtra Midi	Machery-Nagel
PCR-Mastermix	Promega
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	Roche

2.13 Software

Software	Verwendung	Hersteller
DOG 2.0	Erstellung und Bearbeitung von Grafiken	[168]
GraphPad Prism [®] 5.01	Statistische Auswertungen und Erstellung von Diagrammen	GraphPad Software
L ^A T _E X	Erstellung dieser Arbeit	L ^A T _E X-Projekt, Opensource
Office 2010	Erstellung von Abbildungen und Präsentationen	Microsoft
Photoshop CS5	Erstellung und Bearbeitung von Grafiken	Adobe
T _E Xshade	Erstellung von Sequenz-Alignments	[169]
Vector NTI [®] Advance 11.5.3	Klonierung und Erstellung von Plasmidkarten	Thermo Fisher Scientific
Volocity [®] 6.2.1	Aufnahme und Bearbeitung von IF-Bildern	PerkinElmer

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) dient der spezifischen Ver-
vielfältigung von DNA *in vitro* mit Hilfe thermostabiler Polymerasen. In mehreren Zyklen wird
in einem PCR-Cycler ein Inkubations-Temperatur-Programm zur Denaturierung doppelsträn-
giger Template-DNA, der Anlagerung von passenden Primern (*Annealing*) und der Synthese
von DNA durch die Polymerase erzeugt. Sollten Punktmutationen in die gewünschte DNA-
Sequenz eingebracht werden, wurden Primer, die diese Mutationen tragen, eingesetzt. Für die
PCR-Reaktion wurde der 2× PCR-Mastermix von Promega verwendet. Tabelle 3.1 und 3.2
zeigen beispielhaft einen PCR-Reaktionsansatz und ein PCR-Programm.

Tabelle 3.1: PCR-Reaktionsansatz

Komponente	Menge
Template	1 µl (~10 ng/µl)
<i>Forward</i> und <i>reverse</i> Primer [0.2 µmol]	je 1 µl
2× PCR-Mastermix (dNTPs, Taq-Polymerase und Puffer, MgCl ₂)	25 µl
<i>Ad</i> H ₂ O	50 µl

Tabelle 3.2: Beispiel für ein PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initialdenaturierung	95 °C	2 min	} 35×
Denaturierung	95 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	variabel ^a	30 s	
Elongation	72 °C	variabel ^b	
Abschlusselongation	72 °C	2 min	

^a Die *Annealing*-Temperatur wurde so gewählt, dass sie 5 °C un-
ter der niedrigsten Schmelztemperatur des Primerpaars lag.

^b Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des gewünsch-
ten PCR-Produkts. Pro 1 kb DNA wurde 1 min gewählt.

Zur Analyse der PCR-Reaktion wurde diese auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufge-
trennt.

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

In 1%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen wurden DNA-Moleküle elektrophoretisch
aufgrund ihrer negativen Ladung der Größe nach aufgetrennt und durch Bestrahlung mit
UV-Licht sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente je nach Größe der eingesetzten DNA
der 100 bp bzw. der 1 kb GeneRuler von Fermentas.

3.1.3 Restriktionsverdau

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist es möglich, DNA-Moleküle an spezifischen Stellen zu schneiden. Für eine Klonierung wurden 1–2 µg Plasmid-DNA und der gesamte PCR-Ansatz, für einen Kontrollverdau 5 µl Minipräparations-DNA eingesetzt. Alle Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet und bei optimaler Reaktionstemperatur für 1–2 h in einem 30 µl Ansatz inkubiert. Tabelle 3.3 zeigt beispielhaft einen Reaktionsansatz. Zur Analyse des Restriktionsverdau wurde dieser auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.4 Vektordephosphorylierung

Um die Religation von geschnittenen Plasmiden bei einer Ligation zu vermeiden, wurden parallel zum Restriktionsverdau 10 U des Enzyms *Calf-Intestine-Phosphatase* (CIP) zugegeben (siehe Tabelle 3.3). Die Phosphatase entfernt Phosphatreste am 5'-Ende von klebrigen Enden der geschnittenen DNA und verhindert somit eine Selbstligation des Vektors ohne Insert.

Tabelle 3.3: Reaktionseinsatz eines Restriktionsverdau

Komponente	Menge
Restriktionsenzym [1–10 U/µl]	1 µl
Puffer	3 µl
DNA [0.1–1 µg/µl]	1–5 µl
CIP	1 µl
<i>Ad</i> H ₂ O	30 µl

3.1.5 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

3.1.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung von DNA von Proteinen in einer Lösung wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde der Probe das gleiche Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) zugegeben, 30 s kräftig gemischt (Vortexer) und anschließend für 2 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige und DNA-haltige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde drei Mal wiederholt. Um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurde der Probe das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, 30 s kräftig gemischt (Vortexer), erneut für 2 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert und die obere Phase gewonnen. Durch eine anschließende Ethanol-fällung wurde die DNA präzipitiert.

3.1.5.2 Ethanol-fällung

Zur Präzipitation von DNA in einer wässrigen Lösung wurden der Probe zwei Volumen 99%iges Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben. Die Probe wurde mit Hilfe eines Vortexers gut gemischt und anschließend für mindestens 30 min bei –20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 13 000 rpm für mindestens 30 min. Es folgte ein Waschschritt mit 70%igem Ethanol. Zur Sichtbarmachung von kleinen DNA-Mengen wurde der Probe vor der Fällung 0.5 µl Glykogen (20 mg/ml) zugegeben. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 20 µl H₂O resuspendiert.

3.1.5.3 Gelextraktion

Nach Auftrennung von DNA-Fragmenten eines Restriktionsverdaus oder einer PCR-Reaktion mit Hilfe eines Agarosegels wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die anschließende Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *PCR-Cleanup-Gel-Extraction-Kit* von Machery-Nagel. Aufgereinigte Plasmide wurden in 30 µl, aufgereinigte PCR-Produkte in 20 µl H₂O eluiert.

3.1.5.4 DNA-Konzentrationsmessung

Die DNA-Konzentration von Proben wurde mit Hilfe eines Nanodrop2000c Spektrophotometers von Thermo Scientific bestimmt. Hierfür wurde die zu messende Probe 1:5–1:10 in H₂O verdünnt. Die Messung erfolgte durch Auftragen von 2–3 µl Probe und der Bestimmung der Absorption bei 260 nm.

3.1.6 Ligation

Für die Ligation von spezifisch geschnittenen Plasmiden und PCR-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Einem Reaktionsansatz wurden 5 µl von 20 µl des isolierten Fragments aus einer PCR und 1 µl von 30 µl des geschnittenen Vektors zugegeben. Tabelle 3.4 zeigt beispielhaft einen Reaktionsansatz. Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei 22 °C inkubiert, für 5 min bei 75 °C deaktiviert und für die nachfolgende Transformation in *E.coli* 1:3 in H₂O verdünnt.

Tabelle 3.4: Ligationsansatz

Komponente	Menge
Plasmid	1 µl
Insert	5 µl
10× Ligasepuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase 5 U/µl	1 µl
Ad H ₂ O	20 µl

3.1.7 Plasmidpräparation

3.1.7.1 Minipräparation

Die Plasmidminipräparation diente der Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien im kleinen analytischen Maßstab. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie aus einer vorausgegangenen Transformation beimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurden 1.5 ml Bakterienkultur in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und mit Hilfe eines Vortexers gut gemischt. Nach Zugabe von 200 µl Puffer 2 und sechsmaligen, kräftigem Schütteln wurde 150 µl Puffer 3 zugegeben, erneut sechs Mal kräftig geschüttelt und die Probe für 3 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4 °C und 13 000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 900 µl 99%igem Ethanol versetzt und mit Hilfe eines Vortexers gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT wurde der Ansatz für 5 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet getrocknet und in 50 µl H₂O, das 10 µg RNaseA enthielt, resuspendiert.

3.1.7.2 Midipräparation

Die Plasmidmidipräparation diente der Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien, die z. B. für die Transfektion von HuH-7-Zellen eingesetzt werden konnte. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte am Folgetag mit dem *NucleoBond-Xtra-Midi*-Kit von Machery-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Das DNA Pellet wurde anschließend in 300 µl TE-Puffer resuspendiert. Typischerweise wurden so 300–500 µg Plasmid-DNA erhalten.

3.1.8 Sequenzierung

Sequenzierreaktionen wurden bei der Firma GATC Biotech AG in Auftrag gegeben. Dazu wurde die zu sequenzierende DNA in 30 µl H₂O mit einer Konzentration von 100 ng/µl und 10 pmol Sequenzierprimer in 20 µl H₂O gelöst und eingeschickt. Die Ergebnisse wurden am nächsten Tag entweder online über <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> oder mit der Software VectorNTI Advance (Version 11.5.3) ausgewertet.

3.1.9 Präparation von HBV-Genomen

HBV-Genome wurden, wie in Schittl & Bruss [166] beschrieben, präpariert. Hierfür wurden HuH-7-Zellen im 6-Well-Format mit den Plasmiden pSVHBV1.1LE- (HBV-Genom, das zwei Stopkodons im ORF der Hüllproteine trägt), pSV45–57 (kodiert für die drei Hüllproteine S, M und L) und pSVBX24H (kodiert für das kleine Hüllprotein S) kotransfiziert. Die Überlappung der ORFs der HBV-Polymerase und der HBV-Hüllproteine bewirkt, dass Mutationen in S in der Regel Einfluss auf die Polymerase haben. Aus diesem Grund wurde der Komplementationsansatz gewählt und die S-Mutationen in die Plasmide pSVBX24H und pSV45–57 eingefügt. Somit konnte der Effekt dieser Mutationen auf die Virusproduktion untersucht und ein möglicher Einfluss auf die Polymerase ausgeschlossen werden. Als Negativkontrolle diente die alleinige Transfektion mit dem Plasmid pSVHBV1.1LE-, da hier nur nicht umhüllte Kapside mit Genom sekretiert werden. Als Positivkontrolle diente die Kotransfektion mit den Plasmiden pSVHBV1.1LE-, pSVBX24H und pSV45–57, die zur Sekretion von Virionen führt. Fünf Tage nach Transfektion wurde der Überstand geerntet und wie nachfolgend beschrieben für die qPCR präpariert.

3.1.9.1 Immunpräzipitation

Virionen im Überstand transfizierter Zellen wurden mit Hilfe von Protein-G-Agarose-Beads und einem HBV-S-Antikörper präzipitiert. Hierfür wurden 25 µl Beads pro Ansatz drei Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 4°C für 5 min und 2500 rpm) und mit 2 µl Schaf-anti-S-Antikörper in 800 µl PBS für 6 h bei 4°C auf einem Rotator präinkubiert. Die Beads wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen, in 50 µl PBS aufgenommen und zu 750 µl Überstand transfizierter Zellen gegeben. Der Ansatz wurde bei 4°C über Nacht auf einem Rotator inkubiert, um Virionen zu binden. Am Folgetag wurden die Beads drei Mal mit PBS gewaschen und in 87.5 µl PBS resuspendiert.

3.1.9.2 DNase I Verdau

Um die für die Transfektion eingesetzte Plasmid-DNA im Überstand zu entfernen und somit das Hintergrundsignal bei der nachfolgenden qPCR zu reduzieren, wurde ein DNase I Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 87.5 µl der Immunpräzipitation 10 µl RDD-Puffer und

2.5 µl DNase I (Qiagen *RNase-free-DNase-Kit*) zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Beads zwei Mal mit PBS gewaschen und in 45 µl PBS resuspendiert.

3.1.9.3 Proteinase K Verdau

Um die virale DNA zu isolieren, wurde die Virushülle mit Detergenz geöffnet und das Kapsid durch das Enzym Proteinase K verdaut. Hierfür wurden 45 µl der Immunpräzipitation 50 µl 2× Proteinase K Puffer und 5 µl Proteinase K hinzugegeben und für 3 h bei 56 °C inkubiert. Die isolierte DNA wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-fällung gereinigt und konzentriert und schließlich in 20 µl H₂O gelöst.

3.1.10 HBV-genomspezifische Real-Time-Polymerasekettenreaktion

3.1.10.1 PCR-Standard

Als PCR-Standard zur absoluten Quantifikation wurde das Plasmid pSVHBV1.5LE- eingesetzt. Durch das verwendete Primerpaar wurde dasselbe 222 bp Fragment amplifiziert wie beim Einsatz von HBV-Genomen. Es wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (10^8 – 10^3 Kopien/µl) und als Standard für jeden PCR-Lauf verwendet. Anschließend konnte eine Standardkurve berechnet und die Konzentration der eingesetzten Proben verglichen werden.

3.1.10.2 qPCR

Für die qPCR wurde der SYBRGreen I Mastermix von Roche verwendet. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 3.5 zu entnehmen. Die Reaktionsansätze wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert,

Tabelle 3.5: qPCR-Reaktionsansatz

Komponente	Menge
SYBR Green I Master	10 µl
Primer VBBS8 und VBBS18 [20 µmol]	je 1 µl
Template	
Probe (präparierte HBV-Genome)	8 µl
Standard (pSVHBV1.5LE-)	8 µl (1:10 verdünnt)
Negativkontrolle H ₂ O	8 µl

die mit einer Folie versiegelt wurde. Das PCR-Programm ist Tabelle 3.6 zu entnehmen. Für den PCR-Lauf wurde ein Light Cycler 480 II von Roche, für die Auswertung das Programm Light Cycler 480 (Software-Release 1.5.0 SP4) verwendet.

Tabelle 3.6: qPCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initialdenaturierung	95 °C	5 min	} 40×
Denaturierung	95 °C	20 s	
<i>Annealing</i>	60 °C	10 s	
Elongation	72 °C	10 s	

3.1.11 Kultivierung von *E.coli*

3.1.11.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

250 ml LB-Medium ohne Antibiotika wurden mit 1.5 ml einer *E.coli* DH10B Übernacht-Kultur beimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Hatten die Zellen die logarithmische Wachstumsphase erreicht ($OD_{578} = 0.6-1$), wurden die Bakterien für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 250 ml eiskaltem H₂O komplett suspendiert und für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem, sterilem 10%igem Glycerol suspendiert und erneut für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem 750 µl 10%igem Glycerol suspendiert, auf Eis in 55 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

3.1.11.2 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Durch Anlegen eines elektrischen Stromstoßes werden Membranen elektrokompetenter *E.coli* Bakterien durchlässig (Elektroporation). Dadurch kann DNA von diesen Zellen aufgenommen werden (Transformation). Für die Transformation wurden 25 µl elektrokompetente *E.coli* auf Eis aufgetaut und Küvetten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 µl Ligationsansatz oder 1 µl einer 1:100 000 Verdünnung eines vorhandenen Plasmids für eine Retransformation zu den Bakterien wurde der gesamte Ansatz in eine vorgekühlte Küvette überführt. Nach Anlegen eines elektrischen Pulses (1.8 kV) wurden die transformierten Zellen in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und für 30–45 min bei 37 °C und 450 rpm inkubiert. Es folgte die Pelletierung der Bakterien für 5 min bei 9000 rpm. 900 µl des Überstandes wurden verworfen, die Zellen in 100 µl Restmedium resuspendiert und anschließend auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank oder für drei Tage bei RT.

3.2 Methoden der Zellkultur

Für diese Arbeit wurde ausschließlich die adhärent wachsende Lebertumorzelllinie HuH-7 verwendet [160]. HuH-7-Zellen sind nicht mit HBV infizierbar. Nach Transfektion mit entsprechenden Expressionsplasmiden werden jedoch virale Proteine, subvirale Partikel und Virionen gebildet, die zur weiteren Analyse verwendet werden können.

3.2.1 Kultivierung von Huh7-Zellen

Die Kultivierung von HuH-7-Zellen erfolgte in DMEM⁺⁺⁺⁺-Medium in 10 cm Schalen oder T75-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre in einem humiden Brutschrank. Zur Passagierung der Zellen bei einer Konfluenz von 80–100 % wurde das Medium entnommen und die Zellen zwei Mal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Zur Ablösung und Vereinzeln der Zellen wurde das Proteasegemisch Trypsin hinzugegeben und die Zellen für 3–5 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins erfolgte die Zugabe von frischem DMEM⁺⁺⁺⁺-Medium. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Teilungsverhältnis auf neue Zellkulturflaschen oder Schalen aufgeteilt.

3.2.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von HuH-7-Zellen

Zur längeren Aufbewahrung von HuH-7-Zellen wurden diese in 10 cm Schalen kultiviert, bei 100%iger Konfluenz abtrypsiniert und in 900 µl vorgewärmtem FCS aufgenommen. Nach Überführung der Zellen in Kryoröhrchen wurde als Gefrierschutz 100 µl 10%iges DMSO tröpfchen-

weise zu den Zellen gegeben. Die vorbereiteten Zellen wurden für ca. eine Woche bei -80°C gelagert und zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Gefrorene Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. 10 ml vorgewärmtes DMEM⁺⁺⁺⁺-Medium wurde langsam zu den Zellen gegeben. Die gelösten Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, in frischem DMEM⁺⁺⁺⁺-Medium resuspendiert und im gewünschten Teilungsverhältnis auf T75-Flaschen aufgeteilt. Vor der weiteren Verwendung wurden die Zellen mindestens zwei Mal passagiert.

3.2.3 Transfektion von HuH-7-Zellen

Durch die Transfektion von eukaryotischen Zellen kann Plasmid-DNA in diese eingebracht und z. B. eine Proteinexpression induziert werden. Für HuH-7-Zellen wurden die Transfektionsreagenzien *Fugene HD* von Promega bzw. *X-treme-Gene* von Roche verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden je nach Assay Zellen in 12-Well-Platten, 6-Well-Platten oder 10 cm Schalen ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 100 μl vorgewärmtes DMEM-Medium ohne Zusätze in Eppendorfgefäße vorgelegt. Nach Zugabe von DNA und *Fugene HD* oder *X-treme-Gene* wurde der Transfektionsansatz für 30–45 min bei RT inkubiert. Ein typischer Transfektionsansatz ist Tabelle 3.7 zu entnehmen. Während der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden

Tabelle 3.7: Beispielhafter Transfektionsansatz

Komponente	Format		
	12-Well	6-Well	10 cm Schale
Zellzahl	$1,5 \times 10^5$	3×10^5	3×10^6
DNA	0.5–1 μg	1–2 μg	2–5 μg
<i>Fugene HD</i>	1.5–3 μl	3–6 μl	6–15 μl
<i>X-treme-Gene</i>	0.5–1 μl	1–2 μl	2–5 μl
DMEM	100 μl	100 μl	100 μl

Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und frisches DMEM-Medium ohne Zusätze hinzugegeben. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert. Nach 6 h Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und frisches DMEM⁺⁺⁺⁺-Medium hinzugegeben.

3.2.4 Ernte von Zellkulturüberständen

Die zu analysierenden Zellkulturüberstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und für 10 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert, um abgelöste tote Zellen und Zellfragmente zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert oder direkt zur weiteren Analyse weiterverwendet.

3.2.5 Konzentrierung von HDV-Pseudopartikeln

Fünf Tage nach Transfektion von 10 cm Schalen wurde das Medium abgenommen und für 1 h bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Nach Überführung in ein neues Falcon-Gefäß wurde dem Überstand PEG8000 zugegeben (Endkonzentration 10 % (w/v)) und für 1 h und 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 h bei 4°C und 4000 rpm. Das Pellet wurde in 1/100 Volumen TAN-Puffer resuspendiert, in *SlideALyzer*-Säulchen überführt und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Die gereinigten HDV-Partikel wurden entweder bei -20°C gelagert oder direkt für eine Westernblot-(WB)-Analyse weiterverwendet.

3.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Vorbereitung von Proteinextrakten für die WB-Analyse wurden transfizierte Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 500 μ l (6-Well) bzw. 1000 μ l (10 cm Schale) Lysepuffer pro Well/Schale und die Inkubation der Zellen für 15 min auf Eis. Das Gesamtlysate wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um die unlöslichen Zellbestandteile zu entfernen. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20 °C gelagert oder direkt für eine WB-Analyse weiterverwendet.

3.3.2 Herstellung von HDV-Proteinextrakten

Das kleine und große HDV-DAG lokalisieren in Zellen zum größten Teil im Zellkern. Zur Extraktion dieser Proteine aus transfizierten Zellen wurden diese zwei Mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 500 μ l (6-Well) oder 1000 μ l PNL-Puffer (10 cm Schale) und die Inkubation der Zellen für 5–10 min bei RT. Anschließend wurde das Lysat in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, drei Mal für 30 s sonifiziert und das Gesamtzelllysate für 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 ml (6-Well) bzw. 10 ml (10 cm Schale) Methanol gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 25 min bei 3500 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Pellet kurz getrocknet und anschließend in 100 μ l (6 Well) bzw. 500 μ l (10 cm Schale) TNE-Puffer resuspendiert. Das Lysat wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für eine WB-Analyse weiterverwendet.

3.3.3 Zellfraktionierung mit Triton-X114

Bei dieser Zellfraktionierung wurde das nichtionische Detergenz Triton-X114 verwendet. Triton-X114-Lösungen trennen sich bei Temperaturen über 20 °C in eine wässrige und eine Detergenzphase. Hydrophile Proteine lösen sich dabei ausschließlich in der wässrigen Phase, amphiphile Transmembranproteine sammeln sich hingegen in der Detergenzphase. Transmembranproteine können somit z. B. von hydrophilen Proteinen in Gesamtzelllysaten getrennt werden. Um den Einfluss verschiedener Mutationen im S-Protein hinsichtlich der Membranverankerung zu analysieren, wurde Triton X-114 eingesetzt. Hierfür wurden im 6-Well-Format transfizierte Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen und mit 400 μ l Triton X-114-Lysepuffer für 45 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1000 g und 4 °C. 20 μ l des Überstandes wurden entnommen und für eine WB-Analyse vorbereitet (Gesamtlysate). Der restliche Überstand wurde für 10 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. 350 μ l Saccharosepuffer wurden in einem neuen Eppendorfgefäß mit 350 μ l Überstand aus der vorangegangenen Zentrifugation überschichtet und für 5 min bei 30 °C inkubiert. Die Probe sollte anschließend eine milchig-weiße Trübung aufweisen. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 12 000 g bei RT wurden 20 μ l der wässrigen Phase für eine WB-Analyse vorbereitet (wässrige Fraktion). Der restliche Überstand wurde komplett entnommen und verworfen. Die gesamte Detergenzphase (Membranfraktion) wurde mit 25 μ l 5 \times SDS-Ladepuffer versetzt und für eine WB-Analyse vorbereitet.

3.3.4 Zellfraktionierung mit Triton-X100 und NP40

Um Zellen in eine nukleäre und zytosolische Fraktion aufzutrennen, wurden HuH-7-Zellen drei Tage nach Transfektion abtrypsinisiert, in frischem DMEM⁺⁺⁺⁺-Medium aufgenommen und einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 3000 rpm). Der Überstand

wurde verworfen, die Zellen in 1 ml Puffer 1 suspendiert, mit Hilfe eines Vortexers kräftig gemischt und anschließend für 5–10 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wurde anschließend durch Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm und 4 °C in eine zytosolische Fraktion (Überstand) und eine nukleäre Fraktion getrennt (Pellet). Die zytosolische Fraktion wurde mit 5 ml Methanol versetzt und bei –20 °C über Nacht inkubiert, um die Proteine zu präzipitieren. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 25 min bei 3500 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für ca. 10 min bei RT getrocknet und anschließend in 50–100 µl TNE-Puffer resuspendiert.

Die nukleäre Fraktion wurde mit Puffer 1 gewaschen (Zentrifugation bei 4 °C für 3 min und 13 000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer 2 suspendiert. Um die Zellkerne aufzuschließen, wurde die nukleäre Fraktion sonifiziert (900 Hz, 5 min, 20 s Puls, 20 s Pause).

Beide Fraktionen wurden entweder bei –20 °C gelagert oder für eine WB-Analyse weiterverwendet.

3.3.5 Crosslinking

Der membrängängige Crosslinker *Disuccinimidylsuberate* (DSS) reagiert bei räumlicher Nähe zweier Proteine oder Peptide mit deren primären Aminogruppen (z. B. in Lysin oder Arginin) und führt unter Abspaltung von *N-hydroxysuccinimid*-Gruppen zur Bildung von Peptidbindungen. Interagieren zwei Proteine miteinander, kann diese Interaktion durch DSS dauerhaft stabilisiert und durch eine WB-Analyse nachgewiesen werden.

Zum Nachweis von Oligomeren wurde zunächst eine 50 mM DSS-Lösung in DMSO hergestellt. Im 6-Well-Format transfizierte HuH-7-Zellen wurde drei Tage nach Transfektion zwei Mal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS suspendiert und anschließend für 5 min bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl PBS suspendiert und in 32 µl Aliquots aufgeteilt. Nun wurden die Zellen für 30 min mit und ohne DSS bei RT behandelt. Durch Zugabe von 2 µl 1 M Glycin (Endkonzentration 25 mM) wurde die Reaktion für 15 min bei RT abgestoppt. Das Reaktionsschema ist Tabelle 3.8 zu entnehmen.

Tabelle 3.8: Crosslinking-Reaktionseinsschema

Zellen	50 mM DSS [Endkonz.]	DMSO	1 M Glycin [Endkonz.]
Mock [32 µl]	- [0 mM]	8 µl	2 µl [25 mM]
Mock [32 µl]	0.8 µl [1 mM]	7.2 µl	2 µl [25 mM]
Transfiziert [32 µl]	- [0 mM]	8 µl	2 µl [25 mM]
Transfiziert [32 µl]	0.8 µl [1 mM]	7.2 µl	2 µl [25 mM]

Die behandelten und unbehandelten Zellen wurden für 5 min bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert, das Pellet in 30 µl Lysepuffer suspendiert und für 10 min bei 4 °C auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 20 µl 5× SDS-Ladepuffer suspendiert und für eine WB-Analyse vorbereitet.

3.3.6 SDS-PAGE und Westernblot

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dabei werden durch die Zugabe von SDS alle Proteine negativ geladen, was eine Auftrennung in einem elektrischen Feld möglich macht. Alle Proben wurden mit 5× SDS-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1× SDS-Ladepuffer), für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend für 1 min bei 13 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die Proben wurden

bei -20°C gelagert oder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das vorbereitete Gel wurde mit 4–20 μl Probe pro Tasche beladen. 4 μl des *PageRuler Plus Prestained* Markers von Thermo Scientific diente als Molekulargewichtsstandard. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150–180 V für 2–3 h. Die Zusammensetzung der SDS-Gele ist Tabelle 3.9 zu entnehmen.

Tabelle 3.9: SDS-Gel Zusammensetzung

12 % Trenngel		3,9 % Sammelgel	
Komponenten	Menge ^a	Komponenten	Menge ^a
H ₂ O	4950 μl	H ₂ O	3400 μl
30 % Bis-Acrylamid	6000 μl	30 % Bis-Acrylamid	850 μl
1.5 M Tris (pH 8,8)	3750 μl	1 M Tris (pH 6,8)	650 μl
10 % SDS	150 μl	10 % SDS	50 μl
10 % APS	150 μl	10 % APS	50 μl
TEMED	6 μl	TEMED	5 μl

^a Angegebene Menge für ein Gel.

Der WB dient der dauerhaften Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran. Anschließend ist eine Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern möglich. Zur Vorbereitung wurden zwei Whatmanpapiere und eine Nitrocellulosemembran pro Gel in Gelgröße zugeschnitten und zusammen mit dem SDS-Gel in Blottingpuffer eingelegt. In einer Blotkassette wurden nun ein Schwamm, ein Whatmanpapier, das Gel, die Membran und erneut ein Whatmanpapier und ein Schwamm übereinandergelegt und in die Nassblotkammer von BIO RAD eingebaut. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 100 V für 70 min. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 0.1 % PBS-T gewaschen und für mindestens 30 min in Blockingmilch bei RT inkubiert, um alle Protein-Bindestellen der Membran zu besetzen. Die Membran wurde anschließend mit einem Erstantikörper, der in Blockingmilch verdünnt wurde, bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0.1 % PBS-T wurde der Meerrettichperoxidase- (*Horseradish-Peroxidase*, HRP)-gekoppelte Zweitantikörper in Blockingmilch verdünnt und zusammen mit der Membran für 1–2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0.1 % PBS-T wurde die Membran gleichmäßig mit der Detektionslösung benetzt und entweder mit einem Röntgenfilm am Curix 60 Developer (Agfa) oder digital am Fusion FX mit der Fusion-Capt-Software entwickelt.

3.3.7 Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunfärbung (IF) dient der Sichtbarmachung zellulärer oder viraler Proteine mit Hilfe von Antikörpern mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden auf Deckgläschen gewachsene und transfizierte Zellen im 12-Well-Format ein bis zwei Tage nach Transfektion zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit 4 % PFA in PBS bei RT fixiert. Die Zellen wurden drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen und für mindestens 1 h in Blockingpuffer bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden die Zellen für ca. 1 h mit einem fluorochromkonjugierten Zweitantikörper bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden die Zellen mit MOWIOL auf Objektträger fixiert und bis zur Verwendung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung der Proben erfolgte an einem *Nikon Ti Eclipse Spinning-Disc*-Fluoreszenzmikroskop (ausgestattet mit dem Perkin Elmer UltraViewVox System (Yokogawa CSU-X1)).

3.3.8 FACS-FRET

Mit Hilfe des von Theodor Förster 1946 entdeckten physikalischen Prinzips, dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), ist es möglich, Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren. Dabei wird die Energie eines durch Einstrahlung mit einer Anregungswellenlänge λ_1 angeregten Donor-Moleküls über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein Akzeptor-Molekül übertragen, das dann im Anschluss die Energie mit einer längeren Wellenlänge λ_2 wieder abgibt. Grundvoraussetzungen für die Energieübertragung sind die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors sowie die räumliche Nähe der beiden Moleküle (bis zu 10 nm). In dieser Arbeit wurde als Donor-Molekül das blau fluoreszierende Protein (*Blue-Fluorescent-Protein*, BFP) und als Akzeptor-Molekül das gelb fluoreszierende Protein (*Yellow-Fluorescent-Protein*, YFP) verwendet (Spektren von BFP und YFP, siehe Abbildung 3.1). Alle analysierten S-Mutanten wurden N-terminal jeweils mit einem BFP- oder YFP-Tag versehen.

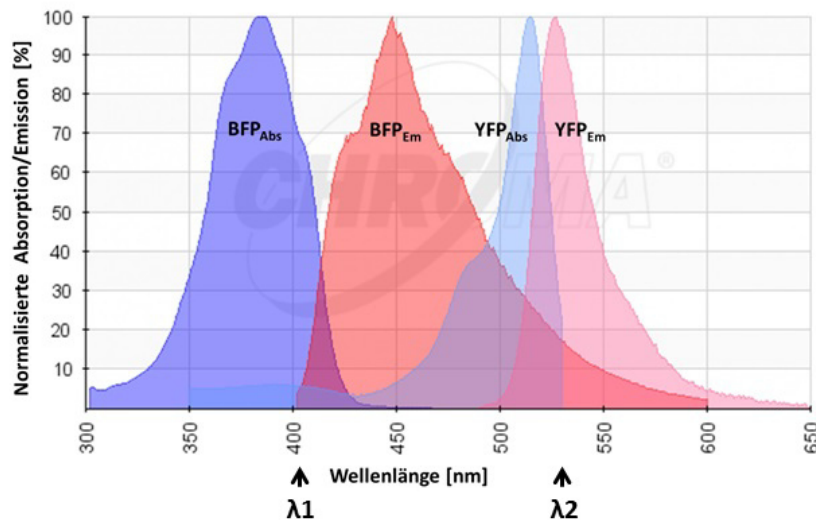


Abbildung 3.1: YFP/BFP-Absorptions-(Abs)- und Emissionsspektren (Em). BFP wird im FACS mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda_1 = 405$ nm angeregt und emittiert höherwelliges Licht (BFP_{Em}, roter Bereich). Da sich das BFP_{Em}-Spektrum und das YFP_{Abs}-Spektrum überlappen, wird YFP bei räumlicher Nähe dadurch angeregt und emittiert höherwelliges Licht λ_2 ($\hat{=}$ YFP_{Abs}) (Abbildung erstellt mit <https://www.chroma.com/spectra-viewer>)

Bei der FACS-FRET-Analyse nach Banning *et al.* [163] wird FRET mit der Durchflusssytopometrie (*Fluorescence-Activated-Cell-Sorting*, FACS) kombiniert. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der FRET-Messung mittels Fluoreszenzmikroskopie ist die Möglichkeit, FRET-Signale einer großen Anzahl lebender Zellen schnell und reproduzierbar zu messen. Voraussetzung für die Detektion eines spezifischen FRET-Signals mittels FACS ist die richtige Gating-Strategie sowie die Verwendung der richtigen Kontrollen (siehe Abbildung 3.2). Dazu wurden HuH-7-Zellen zum einen jeweils mit Plasmiden, die nur für BFP oder YFP kodieren transfiziert sowie mit beiden Plasmiden kotransfiziert (Negativkontrollen). Des Weiteren wurden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für ein BFP-YFP-Fusionsprotein kodiert (Positivkontrolle). Durch die Analyse Mock-transfizierter Zellen wurden anhand des Vorwärts- (*Forward-Scatter*, FSC) und des Seitwärtsstreulichts (*Side-Scatter*, SSC) als Parameter für das Volumen und die Granularität der Zellen zunächst lebende Zellen für die weitere Untersuchung ausgewählt (gated). Mit Hilfe der oben genannten Kontrollen wurden die Spannung am Photoelektronen-Vervielfacher (*Photomultipliertube*, PMT) und die Kompensation an die

YFP- bzw. BFP-Signalstärke angepasst, sodass doppelt-positive Zellen hinsichtlich des FRET-Signals analysiert werden konnten (siehe Abbildung 3.2, 1. Reihe). YFP wird nicht ausschließlich durch den 488 nm Laser, sondern zu einem geringen Teil auch durch den 405 nm Laser angeregt (siehe Abbildung 3.1). Um die Detektion eines falsch-positiven FRET-Signals auszuschließen, wurde das YFP- gegen das FRET-Signal aufgetragen und falsch-positive Zellen durch ein zweites Gate von der Messung ausgeschlossen (siehe Abbildung 3.2, 2. Reihe YFP only). In einem dritten Gatingschritt wurde das BFP-Signal gegen das FRET-Signal aufgetragen. BFP und YFP kotransfizierte Zellen (Negativkontrolle) wurden durch das dritte Gate von der Messung ausgeschlossen, da das gemessene FRET-Signal durch zufällige räumliche Nähe zustande kommt und somit ebenfalls ein falsch-positives Signal liefern würde (siehe Abbildung 3.2, 3. Reihe BFP and YFP). In einem letzten Schritt konnte nun die Prozentzahl der FRET-positiven Zellen der Positivkontrolle (siehe Abbildung 3.2, 3. Reihe BFP fused YFP) oder der untersuchten Mutanten ausgelesen werden.

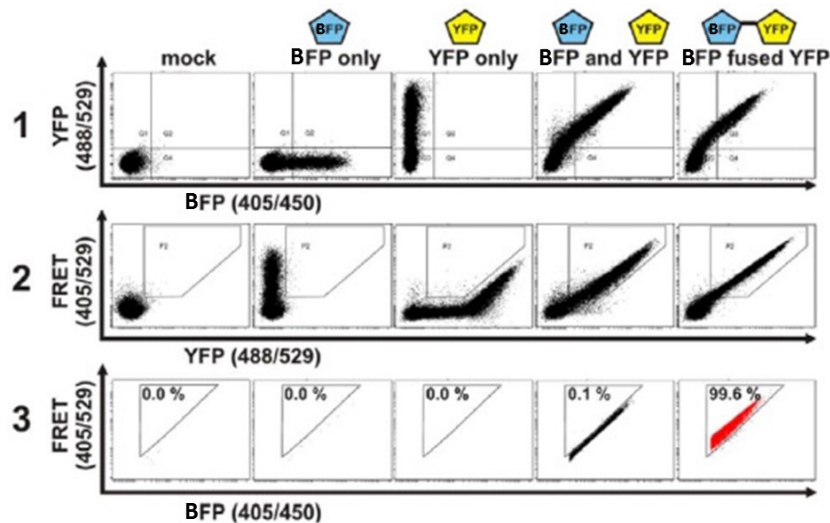


Abbildung 3.2: FACS-FRET Gatingstrategie. HuH-7-Zellen wurden mit den Kontrollen BFP, YFP, BFP und YFP sowie YFP-BFP (ko)-transfiziert und am FACS analysiert. YFP- und BFP-doppelt-positive Zellen wurden für die weitere Messung gegatet (1. Reihe). In einem zweiten Schritt wurden falsch positive Zellen durch die Anregung von YFP mit dem 405 nm Laser ausgeschlossen (2. Reihe, YFP). In einem dritten Schritt wurden mit Hilfe der YFP und BFP kotransfizierten Negativkontrolle falsch positive Zellen von der Messung ausgeschlossen (3. Reihe, YFP und BFP) (verändert nach [163]).

Nach Kotransfektion der S-Mutanten in HuH-7-Zellen wurden diese einen Tag nach Transfektion zwei Mal mit PBS gewaschen, mit 100 μ l Trypsin vereinzelt und in 800 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer suspendiert und der FACS-FRET-Analyse unterzogen.

3.4 Statistik

Der *Mann-Whitney*-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Mutanten bei der FACS-FRET-Analyse zu berechnen. Für die Korrelationsanalyse wurde der Spearman-Rank-Test verwendet. Für alle statistischen Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95 % verwendet. Diese statistischen Auswertungen wurden mit der Software GrapPad Prism[®] berechnet. Der Pearson's Korrelations Koeffizient wurde für die Kolokalisationsexpe-

imente verwendet und wurde mit der Software Velocity[®] berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung von doppelt-fluoreszenzmarkierten HDV-Partikeln

Ziel dieses Versuchsteils war es, GFP- und YFP-markierte DAg-Fusionsproteine zu generieren und zusammen mit dem bereits im Labor vorhandenen mCherry-S-Fusionsprotein [161] deren Funktionalität zu überprüfen. Insbesondere wurde dabei untersucht, ob mCherry-S zusammen mit GFP/YFP-LDAg in der Lage ist, doppelt-fluoreszenzmarkierte HDV-Pseudopartikel (*Virus-like-Particles*, VLP) zu bilden, die für weitere Studien zur HDV/HBV-Morphogenese und Infektion verwendet werden können.

4.1.1 DAg-Konstrukte

Shih & Lo [170] konnten bereits zeigen, dass ein GFP-markiertes LDAg stabil exprimiert und effizient in HDV-VLP eingebaut wurde. Um doppelt-fluoreszenzmarkierte HDV-VLP herzustellen, wurden zunächst GFP bzw. YFP N-terminal markierte DAg-Konstrukte generiert. Aufgrund fehlender kommerzieller Antikörper gegen das DAg wurden als Kontrolle Hämagglutinin-(HA)-markierte DAg-Konstrukte hergestellt. Abbildung 4.1 zeigt eine Übersicht über die generierten Fusionskonstrukte.

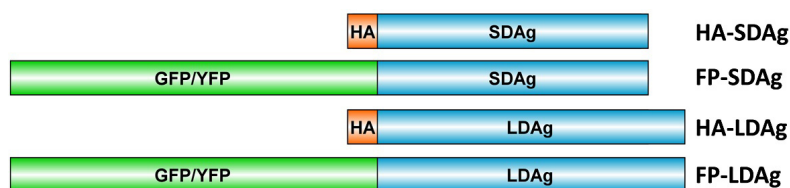


Abbildung 4.1: DAg-Konstrukte. SDAg und LDAg wurden sowohl mit einem HA-Tag als auch mit den Fluoreszenzproteinen GFP und YFP am N-Terminus fusioniert. FP: fluoreszierendes Protein.

4.1.2 Funktionelle Charakterisierung der DAg-Fusionsproteine

4.1.2.1 Expression und Lokalisation

Nach Klonierung der DAg-Konstrukte wurde deren Expression in HuH-7-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, konnten sowohl die HA- (SDAg: 24 kDa, LDAg: 27 kDa) als auch die GFP/YFP-Fusionsproteine (SDAg: ~50 kDa, LDAg: ~52 kDa) drei Tage nach Transfektion im Zelllysate durch WB-Analyse detektiert werden. Die Banden auf Höhe von ca. 35 kDa in Abbildung 4.2 B stellen vermutlich proteolytische Abbauprodukte der GFP/YFP-DAg-Fusionsproteine dar.

Alle LDAg-Fusionsproteine wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation getestet. HA-LDAg lokalisiert in Abwesenheit des HBV-S Proteins ausschließlich im Nukleus [33, 171], was durch IF-Versuche bestätigt werden konnte. Repräsentative Aufnahmen aus diesen Versuchen sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Allerdings konnte in Zellen, die mit den GFP/YFP-Konstrukten transfiziert wurden, ebenfalls ein zytoplasmatisches Signal detektiert werden. Dieses Signal korreliert vermutlich mit den 35 kDa Banden der WB-Analyse (siehe dazu Abbildung 4.2 B) und stellt wahrscheinlich proteolytische Abbauprodukte dar, denen das Kernlokalisierungssignal zwischen AS 66–75 des LDAg-Anteils fehlte [172].

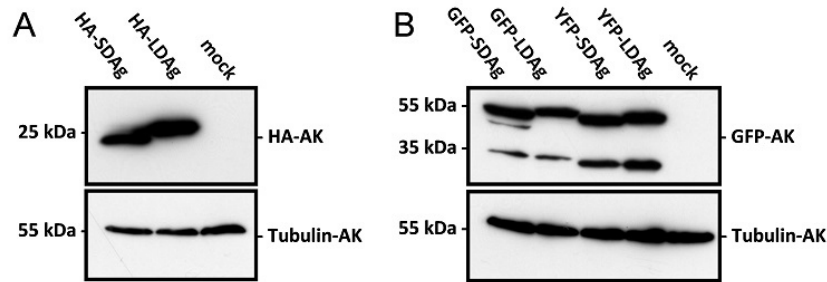


Abbildung 4.2: WB-Analyse zur Kontrolle der Proteinexpression der HA-DAG- (A) und der GFP/YFP-DAG-Konstrukte (B). Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion lysiert und durch WB analysiert. SDAg und LDAg wurden mit einem HA-Antikörper (A) oder einem GFP-Antikörper (B) detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt.

Das von Patra [161] generierte mCherry-S-Fusionsprotein ist in der Lage, HBV-SVP zu bilden und wird auch in HBV-Virionen eingebaut. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen die Funktion von mCherry-S im Hinblick auf die Interaktion mit dem LDAg und die Fähigkeit, das LDAg zu umhüllen, untersucht.

Mittels Immunfluoreszenz wurde die zelluläre Verteilung der LDAg-Konstrukte nach Kotransfektion mit WT-S oder mCherry-S untersucht. Dazu wurden HuH-7-Zellen (ko)-transfiziert, einen, zwei oder drei Tage nach Transfektion fixiert und mindestens 100 doppelt-transfizierte Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Abbildung 4.4 zeigt die Auswertung dieser Untersuchung. Wie erwartet, konnte HA-LDAg in Abwesenheit von S einen, zwei oder drei Tage nach Transfektion fast ausschließlich im Nukleus detektiert werden. Nach Kotransfektion mit WT-S zeigte sich nach drei Tagen in ca. 30% der Zellen eine zytoplasmatische Verteilung des HA-LDAg. Im Gegensatz dazu zeigten nur ca. 10% der Zellen, die mit mCherry-S kotransfiziert wurden, eine zytoplasmatische Verteilung des HA-LDAg (siehe Abbildung 4.4 C). Eine eindeutige Untersuchung der Verteilung des GFP-LDAg-Fusionsproteins war nicht möglich, da zwischen GFP-LDAg und dessen proteolytischen Abbauprodukten in IF-Versuchen nicht unterschieden werden konnte (siehe dazu auch Abbildung 4.3 und 4.5). Repräsentative Aufnahmen aus diesem Versuch sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

Als biochemische Bestätigung der IF-Untersuchungen wurden (ko)-transfizierte HuH-7-Zellen drei Tage nach Transfektion mit Triton-X100 und NP40 lysiert, in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion fraktioniert und anschließend durch WB analysiert. Wie in Abbildung 4.6 A zu sehen ist, konnte HA-LDAg ohne S deutlich in der nukleären Fraktion auf Höhe der ~25 kDa Markerbande detektiert werden. Es wurden ebenso, unabhängig von der Anwesenheit von WT-S oder mCherry-S, schwache Signale in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert. Dies lag vermutlich an der unvollständigen Trennung der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion. Schwache Banden des nukleären Proteins Histon 4 waren ebenfalls in der zytoplasmatischen Fraktion detektierbar. GFP-LDAg war in der nukleären Fraktion und nach Kotransfektion mit WT-S auch in der zytoplasmatischen Fraktion detektierbar. Nach Kotransfektion mit mCherry-S konnte hingegen kein GFP-LDAg in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert werden. Diese Daten decken sich mit den vorausgegangenen IF-Versuchen.

4.1.2.2 HDV-Partikelbildung

Um die Fähigkeit von mCherry-S zu testen, mit dem LDAg VLP zu bilden, wurde das Zellkulturmedium (ko)-transfizierter HuH-7-Zellen sechs Tage nach Transfektion konzentriert und durch WB analysiert. Wie in Abbildung 4.7 A zu erkennen ist, konnte nach Kotransfektion mit

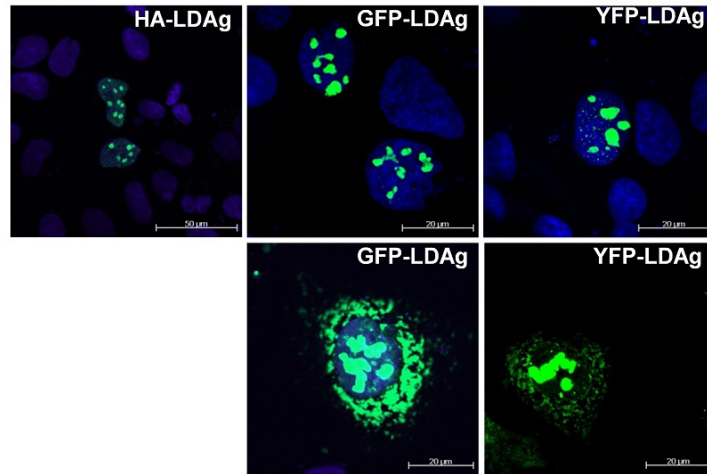
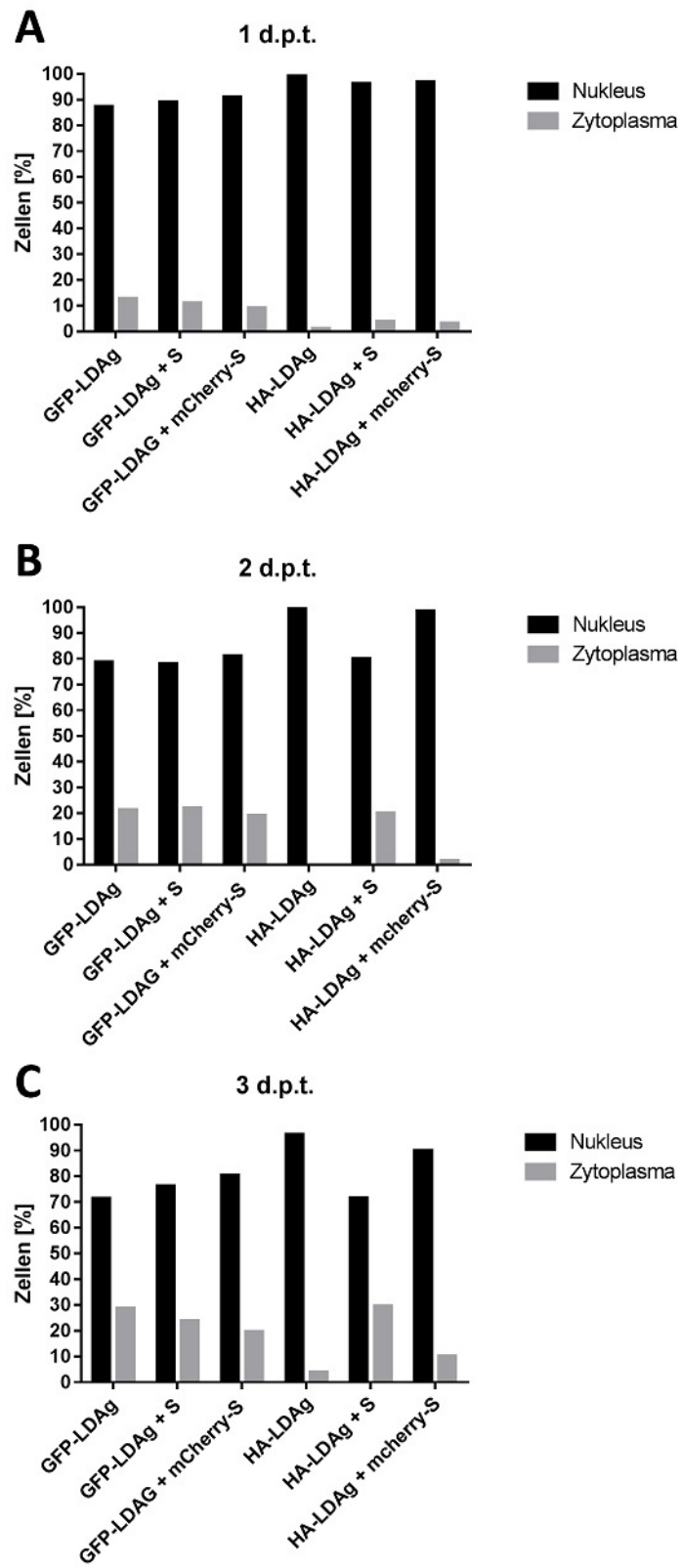


Abbildung 4.3: Lokalisation von HA-LDAg, GFP-LDAg und YFP-LDAg. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. HA-LDAg wurde mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper und einem fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper detektiert (Alexa 488, grün). Die DNA des Zellkerns wurde mit DAPI gefärbt (blau).

mCherry-S kein HA-LDAg im Überstand detektiert werden. Eine Kotransfektion mit WT-S führte hingegen zur effizienten Sekretion von HA-LDAg. Die Kotransfektion von WT-S mit GFP/YFP-LDAg führte ebenfalls zur Sekretion von GFP/YFP-LDAg. MCherry-S war hingegen nicht in der Lage, VLP mit dem LDAg zu bilden.

Abbildung 4.4 (nächste Seite): Zelluläre Verteilung von HA-LDAg und GFP-LDAg in An- und Abwesenheit von WT-S und mCherry-S. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden einen, zwei oder drei Tage nach Transfektion fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Untersucht wurde die zelluläre Lokalisation von LDAg in An- bzw. Abwesenheit von WT-S/mCherry-S. Für die Auswertung wurden pro Ansatz mindestens 100 transfizierte Zellen untersucht ($n \geq 100$).

4 Ergebnisse



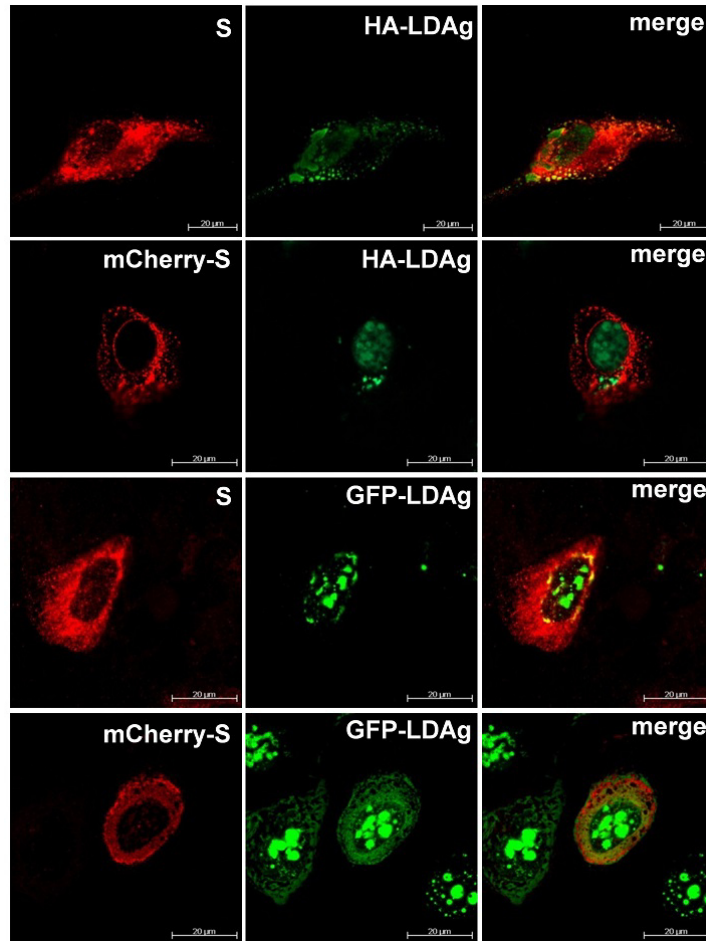


Abbildung 4.5: Lokalisation von LDag nach Kotransfektion mit WT-S oder mCherry-S. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. HA-LDAg wurde mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper und einem fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper (Alexa 488, grün), WT-S mit einem polyklonalen anti-S-Antikörper und einem fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper detektiert (Alexa 555, rot).

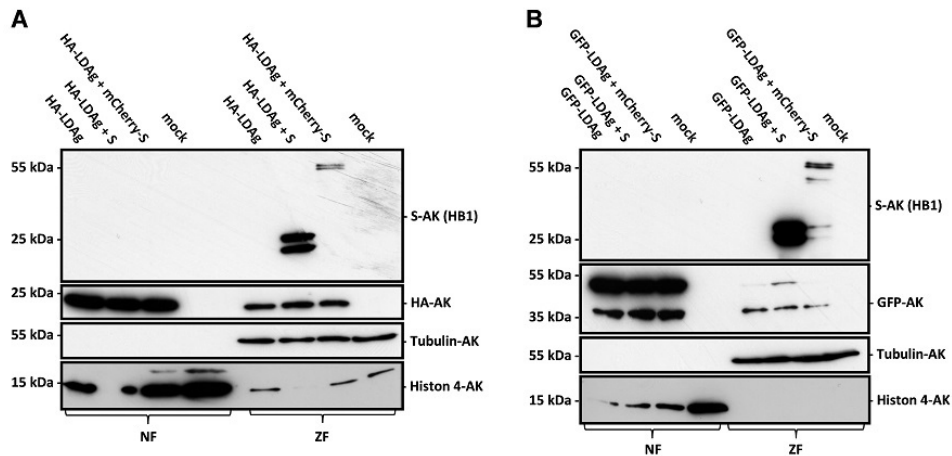


Abbildung 4.6: Fraktionierung von HuH-7-Zellen zur Untersuchung der Lokalisation von HA-LDAg (A) und GFP-LDAg (B) nach Kotransfektion mit WT-S oder mCherry-S. HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion lysiert, die nukleäre und zyttoplasmatische Fraktion mit Triton-X100 und NP40 getrennt und durch WB analysiert. HA-LDAg wurde mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper, GFP-LDAg mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper, WT-S und mCherry-S mit einem monoklonalen anti-S-Antikörper detektiert. Als zyttoplasmatische Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt. Als nukleäre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Histon 4 eingesetzt. NF: nukleäre Fraktion, ZF: zyttoplasmatische Fraktion.

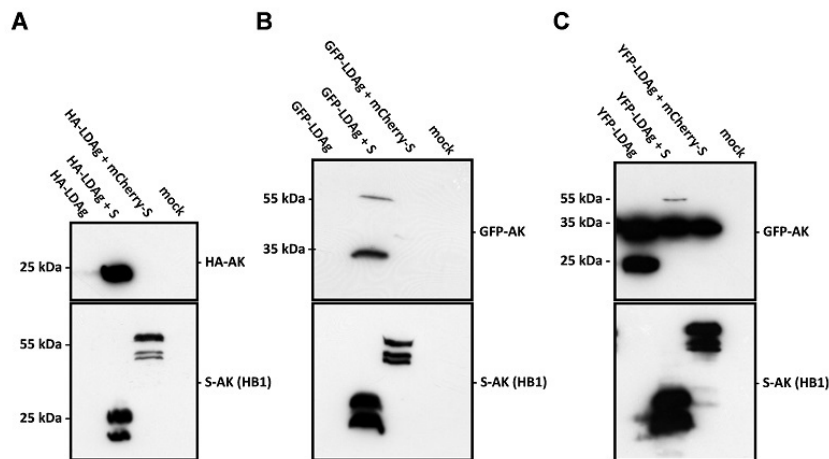


Abbildung 4.7: Sekretion von HA-LDAg (A), GFP-LDAg (B) und YFP-LDAg (C) nach Kotransfektion mit WT-S oder mCherry-S. Der Überstand transfizierter HuH-7-Zellen wurde sechs Tage nach Transfektion abgenommen, mit PEG8000 konzentriert, anschließend dialysiert und durch WB analysiert. HA-LDAg wurde mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper, GFP-LDAg mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper, WT-S und mCherry-S mit einem monoklonalen anti-S-Antikörper detektiert.

4.2 Untersuchung der Oligomerisierung des kleinen HBV-Hüllproteins S

Ziel dieses Versuchsteils war, die Oligomerisierung des HBV-S-Proteins genauer zu untersuchen. S als integrales Membranprotein wird am ER synthetisiert, assembliert sehr effizient zu SVP und wird in die Hülle von HBV- und HDV-Virionen eingebaut. Welche Rolle dabei die Oligomerisierung spielt und welche Bereiche von S daran beteiligt sind, ist bislang nicht genau geklärt. Siegler & Bruss [155] konnten zeigen, dass die TM2 von S eine wichtige Rolle im Prozess der Assemblierung von SVP und vermutlich auch bei der Oligomerisierung spielt. Deshalb konzentrierte sich die Arbeit zunächst auf die TM2 und die phänotypische Charakterisierung verschiedener TM2-Mutanten. Insbesondere wurde dabei die Stabilität, die zelluläre Lokalisation sowie die Oligomerisierungsfähigkeit der TM2-Fusionsproteine untersucht.

Im zweiten Teil wurde weitere transmembrane, luminale und zytoplasmatische Bereiche von S mit Hilfe einer Mutationsanalyse identifiziert, die am Prozess der Oligomerisierung beteiligt sind. Alle Mutanten wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Stabilität, der zellulären Lokalisation und der Oligomerisierungsfähigkeit werden.

Im letzten Teil wurden ausgewählte S-Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, weiterhin SVP, HBV-Virionen und HDV-VLP zu bilden.

4.2.1 Die Rolle der Transmembrandomäne 2 im Prozess der Oligomerisierung

4.2.1.1 TM2-Konstrukte

Um zu untersuchen, ob die Sequenz der 22 AS langen TM2 des S-Proteins (AS-Sequenz: RR-FIIFLLFILLLCLIFLLVLLD, AS 78–99 von S [155]) allein in der Lage ist, Dimere/Oligomere zu bilden, wurden zunächst Fusionsproteine der TM2 mit YFP bzw. BFP für eine FRET-Analyse hergestellt. Die fluoreszierenden Proteindomänen waren hierbei N-terminal lokalisiert. Zur Detektion der TM2-Konstrukte durch eine WB-Analyse wurde zusätzlich ein HA-Tag am C-Terminus kloniert. Da Leuzine in TM-Domänen Oligomerisierung herbeiführen können [173], wurden drei Leuzine an Position 84, 91 und 98 (relativ zur AS-Sequenz des S-Proteins) innerhalb der TM2 zu Alaninen mutiert. Des Weiteren wurden die 13 zentralen AS der TM2 durch eine Polyalanin-Sequenz ersetzt. Als Kontrolle wurde das 27 AS lange Typ-II-Signal des humanen Transferrinrezeptors I (HTR) (AS-Sequenz: CSGSICYGTIAVIVFFLLIGFMIG-YLGY, AS 62–88 des HTR [165]) ebenfalls N-terminal mit einem YFP/BFP sowie C-terminal mit einem HA-Tag fusioniert. Alle generierten TM2/HTR-Fusionsproteine und Mutanten sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

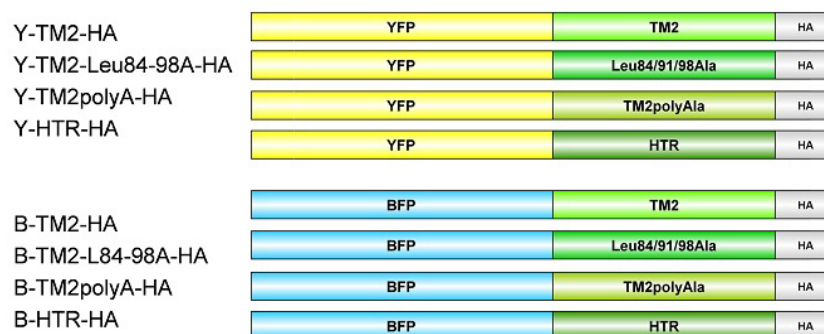


Abbildung 4.8: Darstellung der generierten YFP/BFP-TM2 und YFP/BFP-HTR-Fusionsproteine. Die TM2/HTR-Sequenz wurde C-terminal an YFP/BFP fusioniert. Der C-terminale HA-Tag diente zur Detektion der Konstrukte bei einer WB-Analyse.

4.2.1.2 Funktionelle Charakterisierung der TM2-Konstrukte

Nach Herstellung der TM2/HTR-Fusionskonstrukte (siehe Abbildung 4.8) wurde deren Expression in HuH-7-Zellen durch eine WB-Analyse untersucht.

Wie in Abbildung 4.9 zu erkennen ist, waren alle generierten Fusionsproteine drei Tage nach Transfektion im Zelllysate detektierbar (Banden bei ~25 kDa). Für die TM2polyA- und HTR-Konstrukte konnte ein etwas stärkeres Signal detektiert werden als für die TM2 und TM2-L84-98A-Konstrukte. Als zelluläre Ladekontrolle wurde Tubulin durch ein gegen Tubulin gerichteten Antikörper detektiert. Alle Spuren zeigten die gleiche Signalstärke.

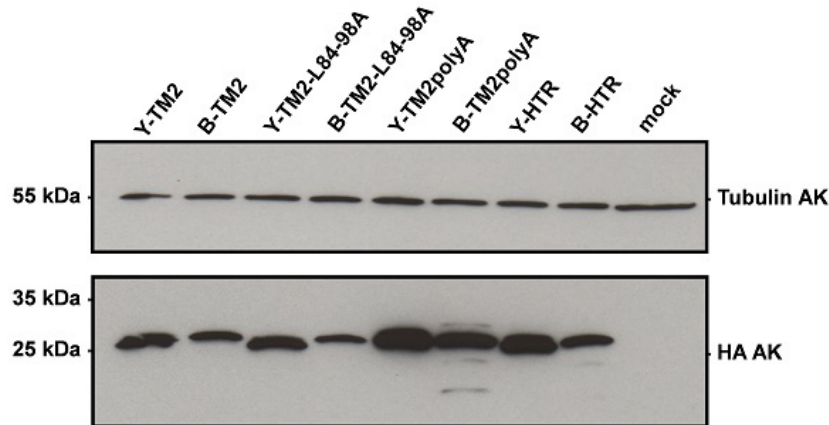


Abbildung 4.9: WB-Analyse zur Kontrolle der Proteinexpression der YFP/BFP-TM2/HTR-Fusionsproteine. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion lysiert und durch WB analysiert. Alle Fusionsproteine wurden mit einem monoklonalen HA-Antikörper detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, wo die hergestellten Konstrukte innerhalb der Zelle lokalisieren. Für diesen Versuch wurden ausschließlich die YFP-markierten Konstrukte eingesetzt. Als Marker des Golgi-Apparats wurde ein GalT-CFP-Fusionsprotein verwendet [164]. Zur Markierung des ER wurde ein Antikörper gegen das zelluläre ER-Enzym PDI verwendet. Repräsentative Aufnahmen der Lokalisationsstudie sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

Wie in Abbildung 4.10 zu erkennen ist, lokalisierten alle TM2-Fusionsproteine am Golgi und nicht wie das WT-S am ER ([96]; vgl. auch Abbildung 4.19, oben). Eine Ursache hierfür könnte das Fehlen des Typ-I-Signals des WT-S sein. Das HTR-Fusionsprotein zeigte ebenfalls eine Lokalisation am Golgi. Somit konnte das HTR-Konstrukt als Kontrolle für weitere Versuche verwendet werden.

Um biochemisch nachzuweisen, dass alle Fusionsproteine membrangebunden in der Zelle vorliegen, wurden Zelllysate mit Hilfe des Detergenz Triton-X114 in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Für diesen Versuch wurden ausschließlich die YFP-markierten Konstrukte verwendet.

Wie in Abbildung 4.11 (oben) zu erkennen ist, konnten alle Fusionsproteine hauptsächlich im Gesamtzelllysate und der Membranfraktion detektiert werden. Das zelluläre ER-Membranprotein Calnexin konnte ebenfalls hauptsächlich in der Membranfraktion detektiert werden. Das zytoplasmatische Protein Tubulin hingegen konnte ebenso wie das luminale ER-Enzym PDI hauptsächlich im Gesamtzelllysate und der löslichen Fraktion detektiert werden. Die etwas schwächeren Banden in der Membranfraktion deuten jedoch auf eine unvollständige Trennung des Lysats hin. Insgesamt lässt dieses Ergebnis aber den Schluss zu, dass alle verwendeten Fusionsproteine membrangebunden vorliegen.

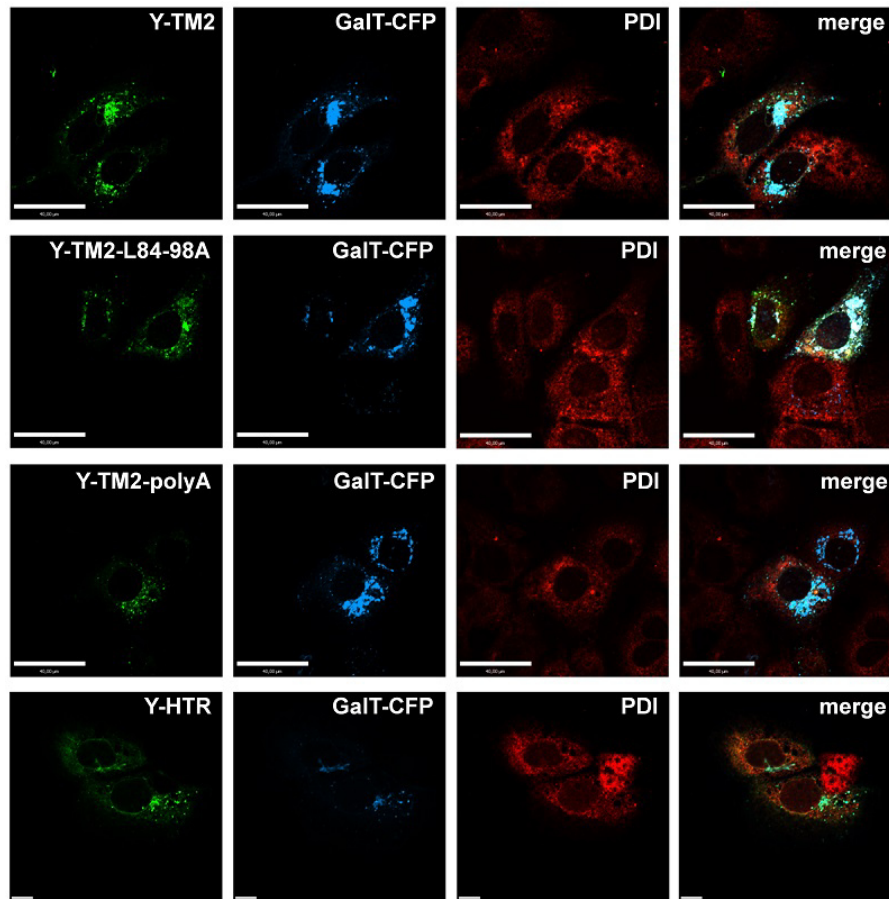


Abbildung 4.10: Lokalisation der YFP/BFP-TM2/HTR-Fusionsproteine. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die YFP/BFP-TM2/HTR-Fusionsproteine wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper und einem fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper (Alexa 488, grün), das ER mit einem monoklonalen PDI-Antikörper und einem fluorochromgekoppeltem Sekundärantikörper detektiert (Alexa 555, rot). Als Golgi-Marker diente das GalT-CFP-Fusionsprotein (blau).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle generierten Fusionsproteine expriert werden, am Golgi lokalisieren und dort vermutlich membrangebunden vorliegen.

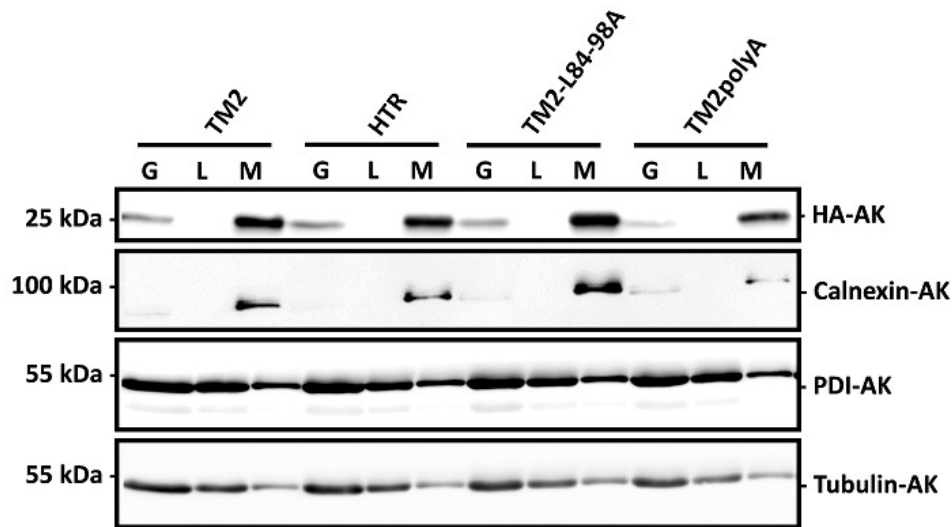


Abbildung 4.11: Membranstatus der YFP-TM2/HTR-Fusionsproteine. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion mit Triton-X114 lysiert und das Lysat anschließend in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Die YFP-TM2/HTR-Fusionsproteine wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper, Calnexin mit einem monoklonalen anti-Calnexin-Antikörper, PDI mit einem monoklonalen anti-PDI-Antikörper und Tubulin mit einem monoklonalen anti-Tubulin-Antikörper detektiert. Als Marker für die Membranfraktion diente das zelluläre ER-Membran-Protein Calnexin, als Marker für die lösliche Fraktion diente das zytoplasmatische Protein Tubulin und das luminaire ER-Enzym PDI. G: Gesamtzellysat, L: Lösliche Fraktion, M: Membranfraktion.

Durch Kolokalisationsexperimente wurde untersucht, ob die YFP/BFP-markierten TM2 und HTR-Fusionsproteine innerhalb der Zelle tatsächlich kolokalisieren, um das HTR-Fusionsprotein als Kontrolle in den folgenden FRET-Versuchen verwenden zu können. Dazu wurden HuH-7-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten kotransfiziert und einen Tag nach Transfektion fixiert. Anschließend wurden Aufnahmen von YFP/BFP-doppelt-positiven Zellen gemacht und die YFP/BFP-Bereiche markiert. Danach erfolgte die Berechnung des Pearson's Korrelations-Koeffizienten R mit Hilfe der Software Volocity als Maß für die lineare Abhängigkeit des YFP und BFP-Signals. R kann somit als Maß für die Wahrscheinlichkeit der Kolokalisation zweier Proteine verwendet werden. Ein Wert $R = 0$ bedeutet dabei eine totale Unabhängigkeit der Signale, wohingegen $R = 1$ eine Kolokalisation beider Proteine widerspiegelt. Wie in Abbildung 4.12 zu erkennen ist, konnte für die TM2- und HTR-Fusionsproteine (Positivkontrollen), wie erwartet, ein Pearson's Korrelations Koeffizient $R \geq 0.8$ errechnet werden. Eine Kotransfektion der YFP-TM2 und BFP-HTR-Konstrukte führte ebenfalls zu einem Pearson's Korrelations Koeffizient $R \geq 0.8$. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die TM2 und HTR-Fusionsproteine kolokalisierten. Das HTR-Fusionsprotein war somit eine geeignete Kontrolle.

4.2.1.3 Interaktionsstudien mittels FACS-FRET und Crosslinking

Durch eine FACS-FRET-Analyse nach Banning *et al.* [163] wurde untersucht, ob die TM2-Domäne des S-Proteins in Lage ist, mit sich selbst zu interagieren. Wie in Abbildung 4.13 (A) zu sehen ist, zeigten die Fusionsproteine Y/B-TM2 im Vergleich zur Positivkontrolle Y-B und zur Negativkontrolle (Y + B) ein FRET-Signal von 35% ($\pm 13\%$ Standardabweichung (SA)),

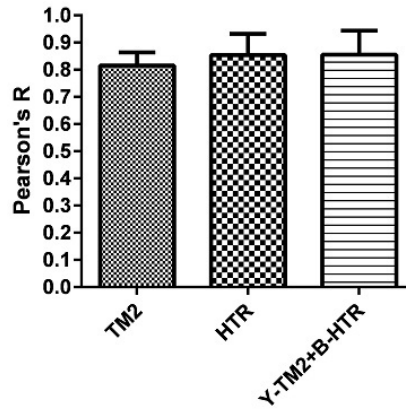


Abbildung 4.12: Kolokalisation der TM2/HTR-Fusionsproteine. Kotransfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion fixiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Pearson's Korrelations Koeffizienten R. Pro Ansatz wurden mindestens 20 YFP/BFP-doppelt-positive Zellen analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism®.

blauer Balken), was auf eine starke Interaktion hindeutet. Die Kotransfektion von Y-TM2 + B und B-TM2 + Y sowie Y-TM2 + B-MEM und B-TM2 + Y-MEM zeigten jeweils FRET-Werte von <5%. Damit konnte zum einen gezeigt werden, dass die TM2 des S-Proteins allein in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren und zum anderen, dass diese Interaktion mit Hilfe der FACS-FRET-Methode messbar ist.

Um zu zeigen, dass die Selbstinteraktion der TM2 spezifisch war, wurden die YFP/BFP-markierten HTR-Konstrukte kotransfiziert und einer FACS-FRET-Analyse unterzogen, da bereits bekannt ist, dass die HTR-Sequenz über ein Glycin-Zipper-Motiv (GxxxG) mit sich selbst interagieren kann (D.Langosch, persönliche Mitteilung). Wie in Abbildung 4.13 (B) zu erkennen ist, zeigten die HTR-Konstrukte einen FRET Wert von 45% ($\pm 25\%$ SA, violetter Balken). Wurden die HTR-Konstrukte mit den TM2-Konstrukten kotransfiziert, konnten FRET-Werte von 5–10% gemessen werden, was auf eine sehr schwache Interaktion hindeutet. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die gemessene Interaktion der TM2 und HTR-Konstrukte spezifisch war und nicht durch zufällige räumliche Nähe oder Überexpression zustande kam.

Im weiteren wurde untersucht, ob die Leuzine an Position 84, 91 und 98 (relativ zur S-Sequenz) eine Rolle bei der Selbstinteraktion der TM2 spielen. Die FACS-FRET-Analyse ergab für die TM2-L84–98A-Mutanten einen FRET-Wert von 26% ($\pm 11\%$ SA, blauer Balken), was darauf hindeutet, dass dies Mutante weiterhin in der Lage war, mit sich selbst zu interagieren. Die Substitution der 13 zentralen AS der TM2-Sequenz durch Alanine hingegen führte zu einem Rückgang des FRET-Signals auf <5% (oranger Balken). Somit konnte gezeigt werden, dass die 13 zentralen und hydrophoben AS der TM2 für dessen Selbstinteraktion verantwortlich sind.

Alle FRET-Werte der Kotransfektionen der TM2/HTR-Konstrukte mit den Y/B bzw. den Y/B-MEM-Konstrukten sind tabellarisch im Anhang aufgelistet. Des Weiteren sind beispielhaft die FACS-Primärdaten jeweils eines Versuchs im Anhang abgebildet.

Um die FRET-Daten biochemisch zu bestätigen, wurden HuH-7-Zellen mit den YFP-markierten TM2- und HTR-Konstrukten transfiziert und anschließend mit dem Crosslinker DSS behandelt. DSS reagiert bei räumlicher Nähe zweier Proteine mit deren primären Aminogruppen und führt unter Abspaltung von N-hydroxysuccinimid-Gruppen zur Bildung von Peptidbindungen. Interagieren zwei Proteine miteinander, kann diese Interaktion somit durch DSS dauerhaft stabilisiert und durch eine WB-Analyse nachgewiesen werden.

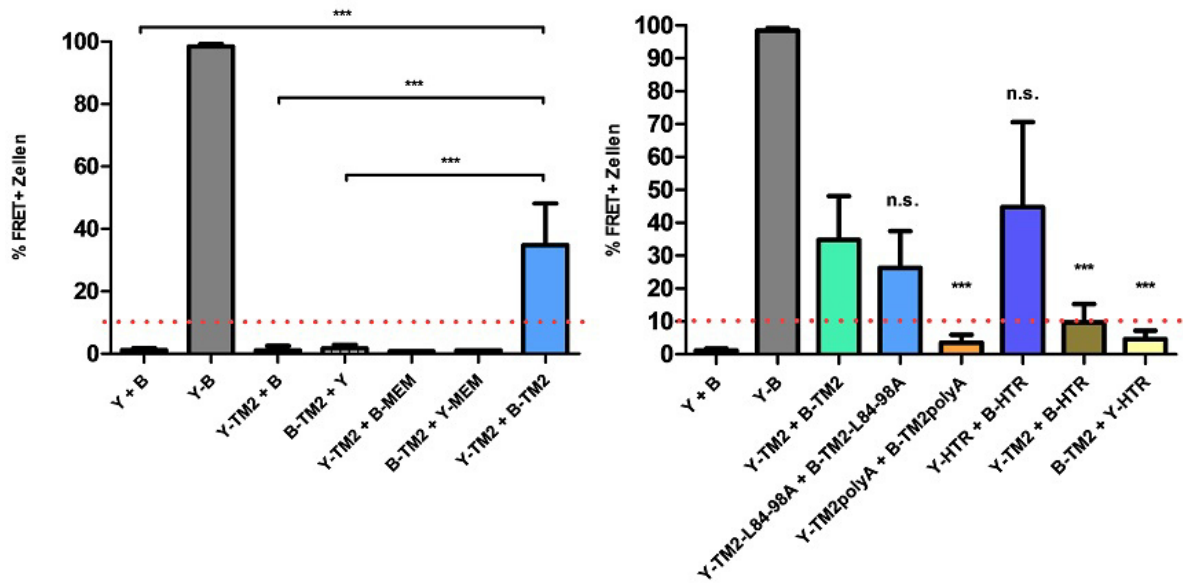


Abbildung 4.13: Analyse der Oligomerisierung der TM2/HTR-Fusionsproteine durch eine FACS-basierte FRET-Analyse. (Ko)-transfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion einer FACS-FRET-Analyse unterzogen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtmenge an FRET⁺-Zellen aus aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je zwei Ansätzen. Pro Experiment wurden mindestens 1000 YFP/BFP-doppelt-positive Zellen analysiert. Bei FRET-Werten >10 % (gestrichelt-rote Linie) wurde von einer Interaktion ausgegangen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® (n.s. = nicht signifikant, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$).

Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen ist, konnten für alle TM2/HTR-Konstrukte, die mit DSS behandelt wurden, drei Tage nach Transfektion Banden auf Höhe der 250 kDa Marker-Bande detektiert werden. Für das TM2-polyA und das HTR-Konstrukt konnten außerdem Banden im Bereich der 70 kDa Marker-Bande detektiert werden. Diese Banden repräsentieren vermutlich höhere Oligomere und deuten auf eine Selbstinteraktion der TM2/HTR-Fusionsproteine hin. Das TM2-polyA- und HTR-Konstrukt zeigten zudem eine stärkere Expression als das TM2- und das TM2-L84-98A-Konstrukt. Diese Daten stehen im Widerspruch zu den FRET-Daten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch DSS auch temporäre und schwache Interaktionen dauerhaft stabilisiert werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die TM2-Fusionsproteine mit zellulären Proteinen interagieren, diese Interaktionen durch DSS dauerhaft stabilisiert werden und zu einem höheren Molekulargewicht bei einer WB-Analyse führen.

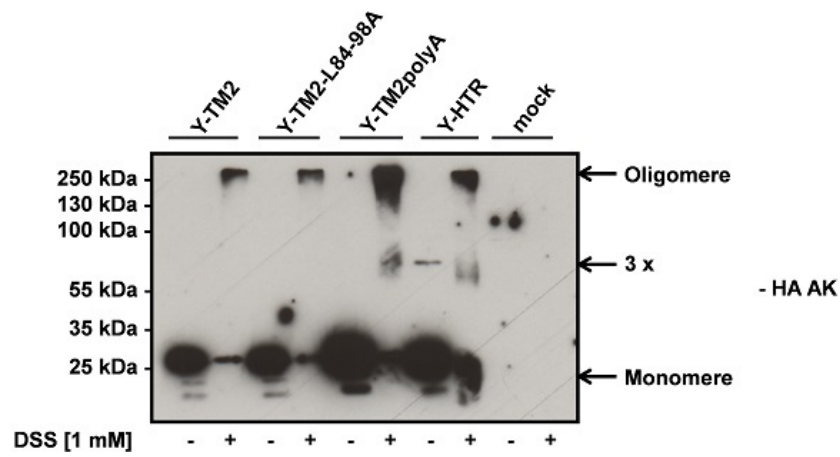


Abbildung 4.14: Analyse der Oligomerisierung der TM2/HTR-Fusionsproteine durch **Crosslinking**. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion mit DSS behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und einer WB-Analyse unterzogen. Die YFP-TM2/HTR-Fusionsproteine wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper detektiert.

4.2.2 Mutationsanalyse der Oligomerisierung von S

4.2.2.1 S-Konstrukte

Zur Analyse der Oligomerisierung des S-Proteins mittels FRET wurden YFP/BFP-Fusionskonstrukte des WT-S sowie aller generierten S-Mutanten hergestellt. Die YFP/BFP-S-Konstrukte wurden analog zum mCherry-S-Konstrukt [161] konzipiert. Als ER-Translokationssignal für die N-terminale YFP/BFP-Domäne wurde die 22 AS lange Signalsequenz des Rabiesvirus Glykoproteins am N-Terminus von YFP/BFP positioniert.

Zunächst wurden alle acht Cysteine (an Position 107, 121, 124, 137–139, 147 und 149) in der luminalen Schleife 2 von S zu Serinen mutiert, um die Bedeutung der intermolekularen Disulfidbrückenbildung im Prozess der Oligomerisierung zu untersuchen. Es ist bekannt, dass über diese Cysteine S zu stabilen Dimeren vernetzt wird [118–120]. Da in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden konnte, dass die Disulfidbrückenbildung keine Voraussetzung für die Selbstinteraktion von S ist, diente diese Mutante (S-CS) im weiteren Verlauf als Grundlage für alle weiteren Konstrukte. Somit war es möglich, eine stabile Vernetzung von S-Dimeren zu verhindern und weitere, für die Oligomerisierung von S wichtige Domänen, zu identifizieren.

Im Folgenden wurden transmembrane Bereiche wie die TM1 (AS-Sequenz: FLGPLLVLQA-GFFLLT, AS 8–23 von S [155]) und/oder TM2 (AS 78–99 von S [155]) durch das Typ-I-Signal der β -Lactamase (AS-Sequenz: VALIPFFAAFCPLVFA, AS 8–24 der β -Lactamase [174]) oder eine Poly-Alanin-Sequenz ersetzt. Weiterhin wurden verschiedene C-terminale luminal und transmembrane Bereiche von S deletiert (ab AS 178, 153 und 100), sowie Punktmutationen in der zytoplasmatischen Schleife 1 von S (C48S, C65S, C69S, C76S) eingebracht. Alle generierten YFP/BFP-Punkt-, Substitutions- und Deletionsmutanten sind schematisch in Abbildung 4.15 dargestellt. Für die Untersuchung der Partikelbildung wurden alle Mutanten auch ohne YFP/BFP-Tag aber mit einem C-terminalen HA-Tag kloniert.

4.2.2.2 Funktionelle Charakterisierung der S-Mutanten

Nach Herstellung der S-Fusionskonstrukte (siehe Abbildung 4.15) wurde die Expression der YFP-Fusionsproteine durch eine WB-Analyse untersucht.

Wie in Abbildung 4.16 zu erkennen ist, waren alle generierten YFP-Fusionsproteine drei Tage nach Transfektion im Zelllysats detektierbar (linker Blot, Banden bei ~50 kDa, rechter Blot Δ 100-Mutanten, Banden bei ~40 kDa). Die Mutanten S-CS-TM2polyA, S-CS-beta-TM2polyA, S-CS-TM1TM2polyA, und S-CS- Δ 153 wurden im Vergleich zum WT-S schwächer exprimiert. Die zusätzlichen Doppelbanden der S-CS- Δ 153- und Δ 178-Mutanten kommen möglicherweise durch das Überlesen des eingefügten Stopkodons an Position 153 bzw. 178 zustande. Das nächste Stopkodon ist außerhalb des S-ORF positioniert und würde das größere Molekulargewicht im Vergleich mit dem WT-S erklären. Die S- Δ 100-Mutanten wurden ebenfalls schwächer exprimiert als das WT-S. Um die S- Δ 100-Mutanten detektieren zu können, musste der Blot ca. 4 Mal länger belichtet werden. Bis auf die S- Δ 100-Mutanten, denen das Asn 146 fehlt, zeigten alle Fusionsproteine das charakteristische Glykosylierungsmuster von S, was auf eine Translokation der luminalen Schleife 2 in das ER-Lumen durch die TM2 hindeutet.

Zusätzlich wurden HuH-7-Zellen mit den YFP- und BFP-Fusionskonstrukten kotransfiziert und die Expression einen Tag nach Transfektion mittels FACS-Analyse überprüft. Wie in Abbildung 4.17 zu erkennen ist, konnte sowohl das YFP- (dunkelgraue Balken) als auch das BFP-Signal (hellgraue Balken) mittels FACS-Analyse detektiert werden. Dabei konnte für die YFP- und BFP-Varianten desselben Fusionsproteins immer in etwa dieselbe Anzahl an YFP- bzw. BFP-transfizierten Zellen gemessen werden. Im Vergleich zum WT-S wurden die Mutanten S-CS-TM2polyA, S-CS- Δ 178, S-CS- Δ 153, S-C48S-CS, S-C65S-CS und S-C76S-CS sowie die Δ 100-Mutanten schwächer exprimiert. Zusätzlich wurde auch die Fluoreszenzintensität (FI)

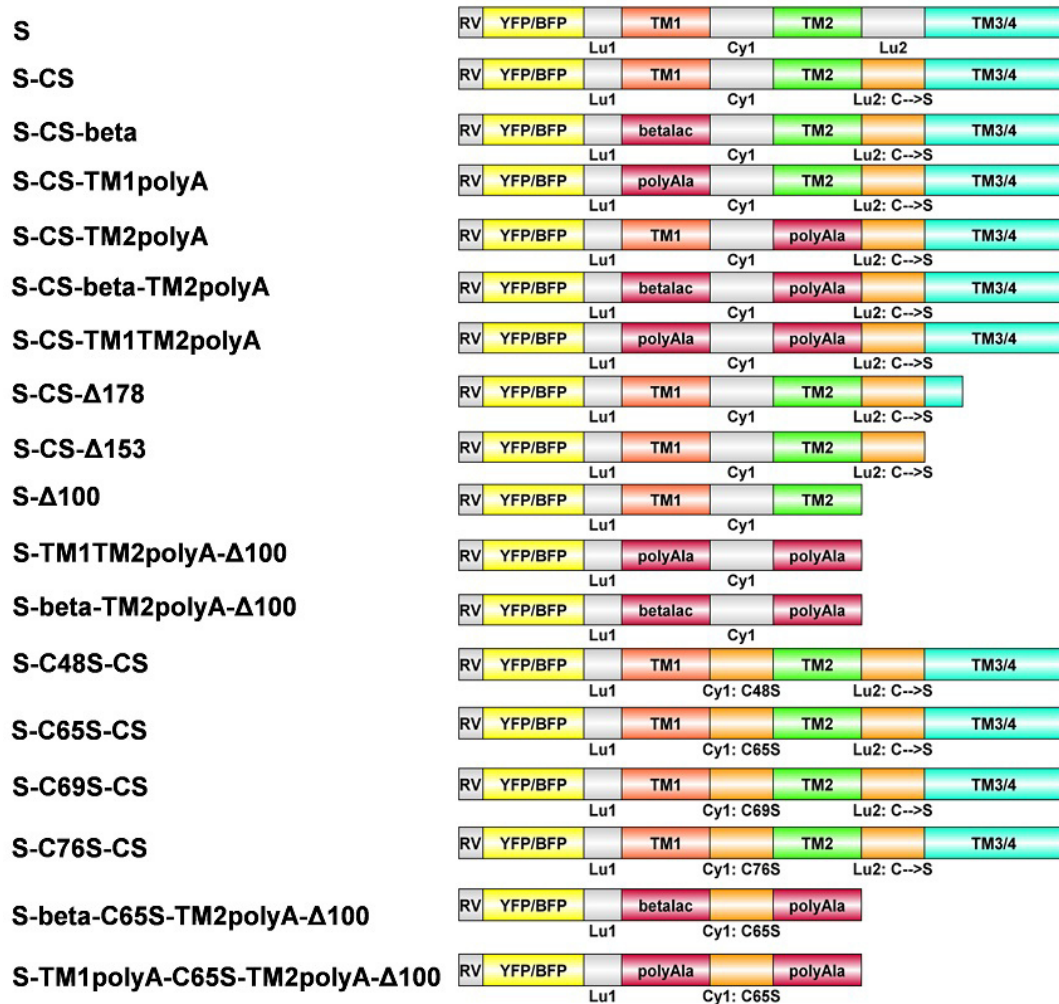


Abbildung 4.15: Darstellung der generierten YFP/BFP-S-Fusionsproteine. Die YFP/BFP-Sequenz wurde N-terminal an die S-Sequenz kloniert. Als Linker diente eine 22 AS lange Poly-Glycin-Sequenz. N-terminal vor der YFP/BFP-Sequenz wurde eine Signalsequenz des Rabiesvirus Glykoproteins kloniert (RV) [161]. Lu: luminale Schleife, Cy: zytoplasmatische Schleife, C-->S: Mutation aller acht Cysteine in der luminalen Schleife 2 zu Serinen. Ausführliche Beschreibung im Text.

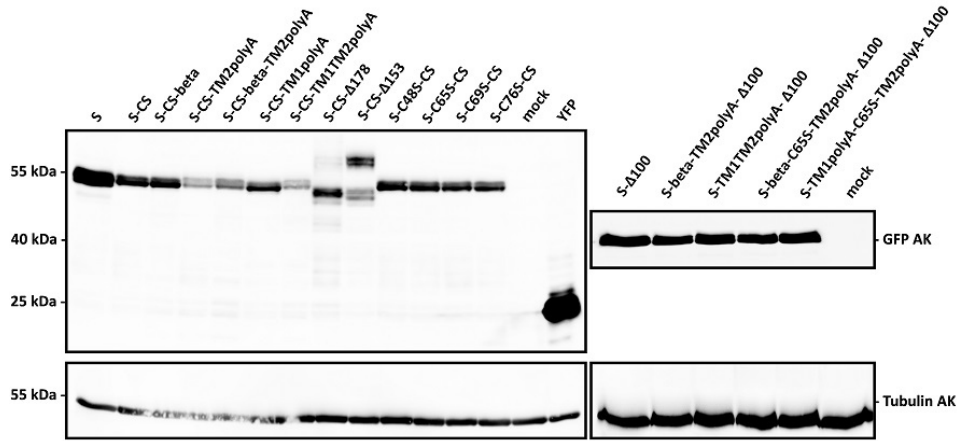


Abbildung 4.16: WB-Analyse zur Kontrolle der Proteinexpression der YFP-S-Fusionsproteine. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion lysiert und die Fusionsproteine mit einem monoklonalen GFP-Antikörper detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt.

des YFP/BFP-Signals als Maß für die Stärke der Expression analysiert (siehe Abbildung 4.18). Auch hier zeigte sich in etwa das gleiche Bild wie in Abbildung 4.17. Die FI der YFP- und BFP-Varianten desselben Fusionsproteins hatten größtenteils die gleiche Stärke. Die Mutanten S-CS- Δ 178, S-CS- Δ 153 sowie die Δ 100-Mutanten zeigten im Vergleich zum WT-S eine FI von ca. 50%.

Dieses Ergebnis korreliert nicht mit der WB-Analyse, was an der kürzeren Expressionszeit liegen könnte. Insgesamt kann jedoch festgehalten werden, dass alle Konstrukte exprimiert wurden und somit für weitere Analysen verwendet werden konnten.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, welchen Einfluss die eingebrachten Mutationen in S auf dessen Lokalisation hatten. Für diesen Versuch wurden das WT-S und die YFP-Fusionsproteine eingesetzt. WT-S wurde mit einem Schaf-anti-S-Antikörper detektiert. Als Marker des Golgi-Apparats wurde ein GalT-CFP Fusionsprotein [164] verwendet. Zur Markierung des ER wurde ein Antikörper gegen das zelluläre ER-Enzym PDI verwendet. Repräsentative Aufnahmen der Lokalisationsstudie sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

Wie in Abbildung 4.19 zu erkennen ist, lokalisierte WT-S erwartungsgemäß hauptsächlich am ER (siehe WT-S und [96]). Auch YFP-S lokalisierte wie WT-S am ER. Die Mutation aller acht Cysteine in der luminalen Schleife 2 hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation (siehe Mutante S-CS). Die Substitution der TM1 bzw. der TM2 durch das Typ-I-Signal der β -Lactamase bzw. durch eine Poly-Alanin-Sequenz hatte ebenfalls keine veränderte Lokalisation von S zur Folge (Mutanten S-CS-TM2polyA und S-CS-beta-TM2polyA). Mit zunehmender Deletion C-terminaler Bereiche von S hingegen zeigten die Mutanten eine stärkere Lokalisation am Golgi, vergleichbar mit den TM2-Konstrukten, die nur die TM2 des S-Proteins enthalten (vgl. Abbildung 4.10). Die Mutanten S- Δ 178 und S- Δ 153 lokalisierten hauptsächlich am ER und teilweise am Golgi. Die Mutanten S- Δ 100 und S-beta-lac-C65S-TM2polyA- Δ 100 hingegen lokalisierten ausschließlich am Golgi. Der C-Terminus scheint somit eine wichtige Rolle bei der korrekten Lokalisation von S am ER zu spielen.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die eingebrachten Mutationen, Deletionen oder Substitutionen in S auf den Membranstatus von S hatten, wurden transfizierte HuH-7-Zellen mit Hilfe des Detergenz Triton-X114 in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Für diesen Versuch wurden die HA-markierten S-Konstrukte eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.20 (oben) zu erkennen ist, konnte das WT-S, wie zu erwarten, haupt-

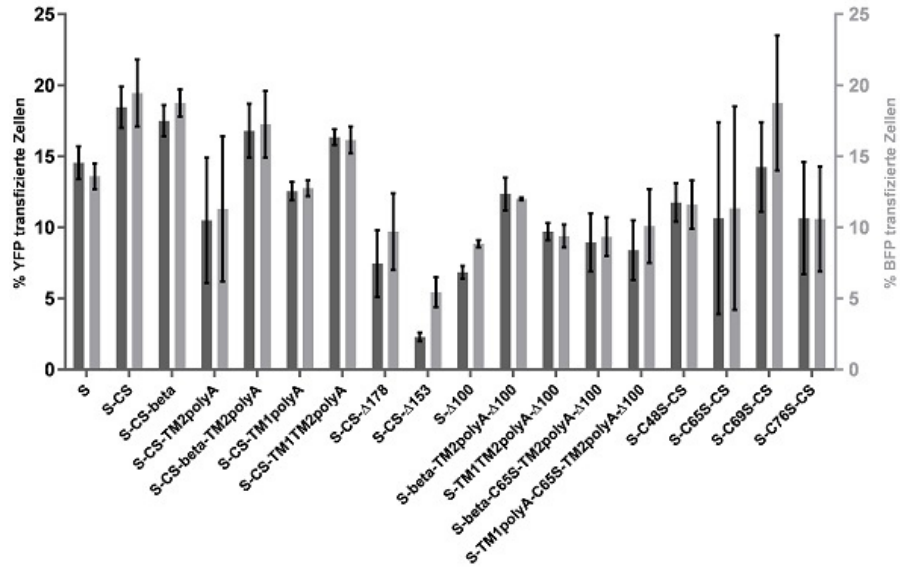


Abbildung 4.17: FACS-Analyse zur Kontrolle der Proteinexpression der YFP/BFP-S-Fusionsproteine. Kotsransfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion mittels FACS analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtmenge an YFP-positiven (dunkelgraue Balken) bzw. BFP-positiven (hellgraue Balken) Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 20000 Zellen analysiert.

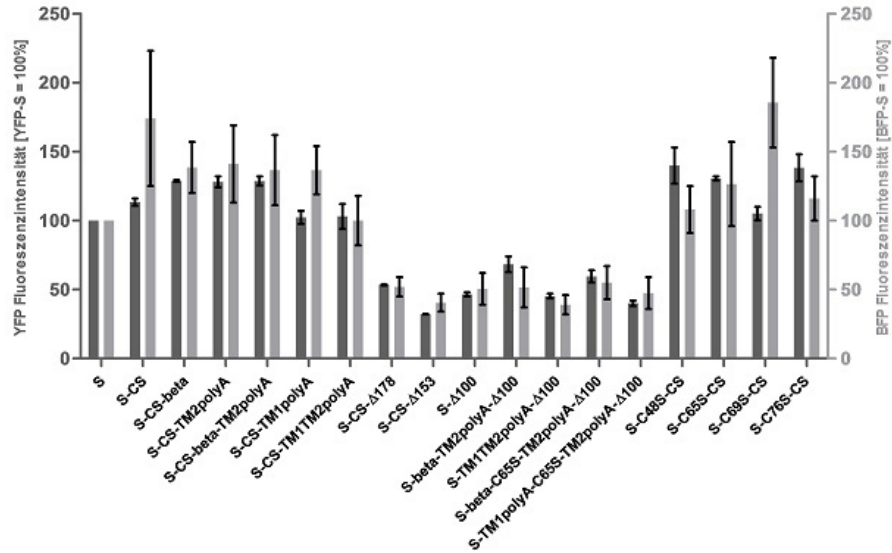


Abbildung 4.18: FACS-Analyse zur Kontrolle der Stärke der Proteinexpression der YFP/BFP-S-Fusionsproteine. Kotsransfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion mittels FACS analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten (FI) des YFP- (dunkelgraue Balken) bzw. BFP-Signals (hellgraue Balken) Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die FI von YFP/BFP-S wurde auf 100 % normiert. Pro Experiment wurden mindestens 20000 Zellen analysiert.

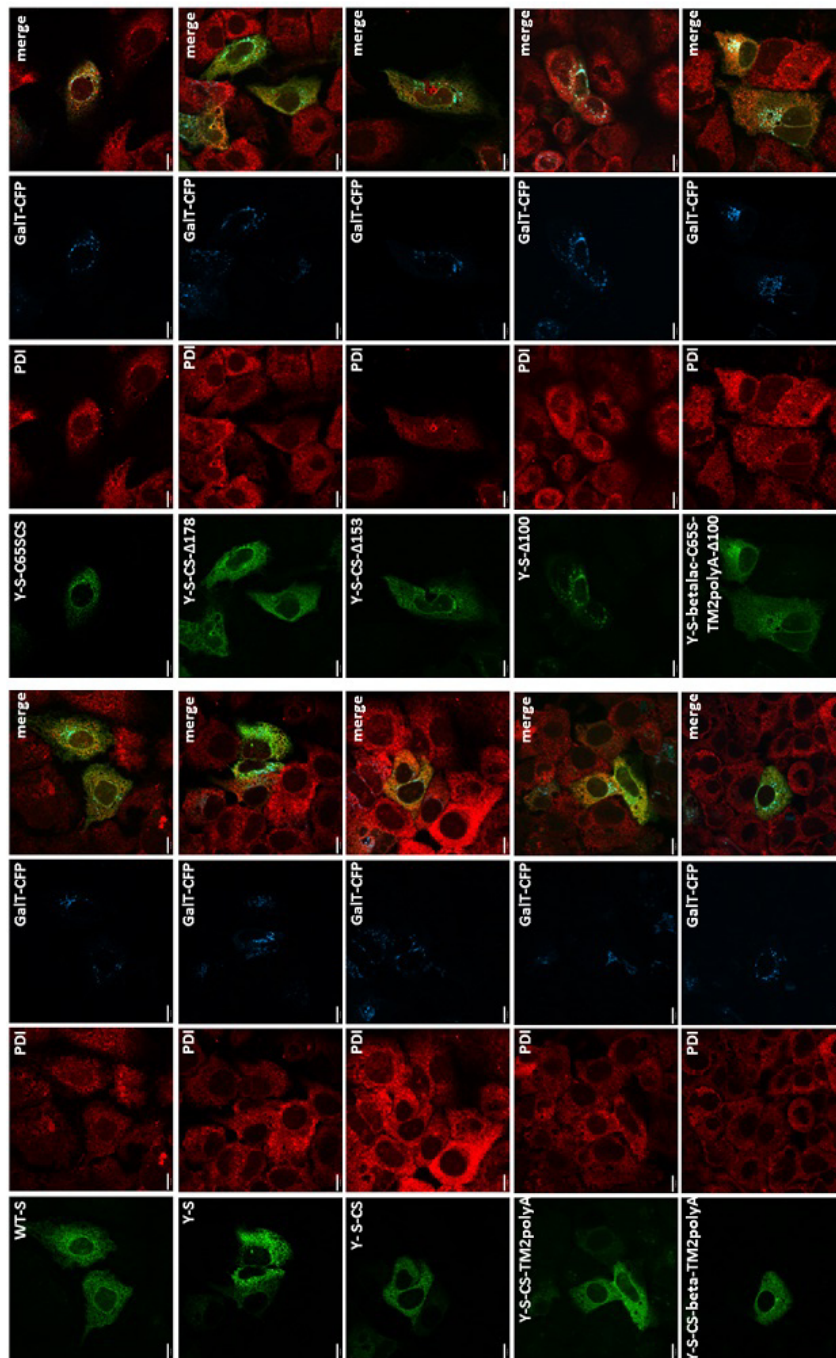


Abbildung 4.19: Lokalisation ausgewählter YFP-S-Fusionsproteine. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. WT-S wurde mit einem polyklonalen anti-S-Antikörper und einem fluorochromgekoppelten Sekundärintikörper (Alexa 488, grün), das ER mit einem monoklonalen anti-PDI-Antikörper und einem fluorochromgekoppelten Sekundärintikörper detektiert (Alexa 555, rot). Als Golgi-Marker diente das GalT-CFP-Fusionsprotein (blau).

sächlich in der Membranfraktion (Spur M) detektiert werden. Für das zelluläre ER-Membranprotein Calnexin konnte im Vergleich zur löslichen Fraktion erwartungsgemäß ebenfalls eine stärkere Bande in der Membranfraktion detektiert werden. Das zytoplasmatische Protein Tubulin hingegen konnte ebenso wie das luminaire ER-Enzym PDI hauptsächlich in der löslichen Fraktion detektiert werden (Spuren L). Damit konnte gezeigt werden, dass S und alle verwendeten Kontrollen in den zu erwarteten Fraktionen detektiert wurden und der Assay somit zur Kontrolle des Membranstatus der S-Mutanten geeignet war. Das Auftragen des Gesamtzelllysats diente der Überprüfung der Expressionslevel. Alle getesteten Mutanten wurden exprimiert (Spuren G) und ebenso wie das WT-S hauptsächlich in der Membranfraktion detektiert (Spuren M). Lediglich die Mutante S- Δ 153 zeigte zusätzlich eine schwache Bande in der löslichen Fraktion (Spur L). Die Auswertung der S- Δ 100-Mutanten (siehe Abbildung 4.21) ergab ein

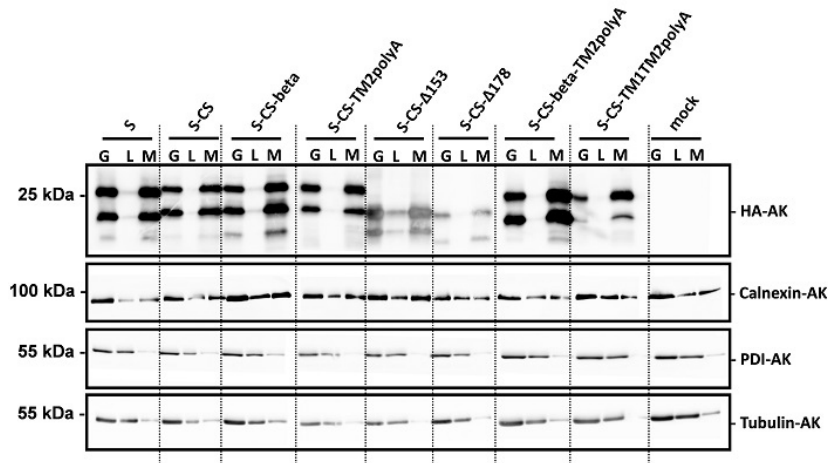


Abbildung 4.20: Membranstatus ausgewählter S-Mutanten. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion mit Triton-X114 lysiert und das Lysat anschließend in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Die S-Mutanten wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper detektiert. Als Marker für die Membranfraktion wurde das zelluläre ER-Membranprotein Calnexin, als Marker für die lösliche Fraktion das luminaire ER-Protein PDI und das zytoplasmatische Protein Tubulin verwendet. Calnexin wurde mit einem monoklonalen anti-Calnexin-Antikörper, PDI mit einem monoklonalen anti-PDI-Antikörper und Tubulin mit einem monoklonalen anti-Tubulin-Antikörper detektiert. G: Gesamtzelllysate, L: Lösliche Fraktion, M: Membranfraktion.

ähnliches Bild. Alle Mutanten wurden im Vergleich zum WT-S zwar wesentlich schwächer exprimiert (vgl. hierzu auch Abbildung 4.16 und 4.17), konnten aber ebenso hauptsächlich in der Membranfraktion detektiert werden. Auch die Kontrollen zeigten die erwartete Lokalisation in der Membranfraktion (Calnexin) bzw. der löslichen Fraktion (PDI). Lediglich für Tubulin wurde ein gleichstarkes Signal in allen Fraktionen detektiert.

Durch Kolokalisationsexperimente wurde untersucht, ob das BFP-markierte S-Fusionsprotein innerhalb der Zelle mit dem YFP-E2-Protein des HCV kolokalisiert, um E2 als Kontrolle in den folgenden FRET-Versuchen verwendet zu können (siehe dazu auch 4.2.1.3). Als Positivkontrolle diente die Kotransfektion der Y/B-S-Fusionsproteine, als Negativkontrolle die Kotransfektion von Y/B-S mit den zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen YFP und BFP.

Wie in Abbildung 4.22 zu erkennen ist, konnte für die S-Fusionsproteine ein Pearson's Korrelations-Koeffizient $R \geq 0.8$ errechnet werden. Eine Kotransfektion der Y/B-S-Konstrukte mit den Kontrollen Y/B führte hingegen zu einem Pearson's Korrelations Koeffizient R von 0.2–0.3. Eine Kotransfektion von B-S mit der YFP-markierten Variante des HCV-E2-Proteins ergab einen R -Wert von 0.7, was auf eine zumindest partielle Kolokalisation hindeutet. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass S und HCV-E2 kolokalisierten und das HCV-E2-

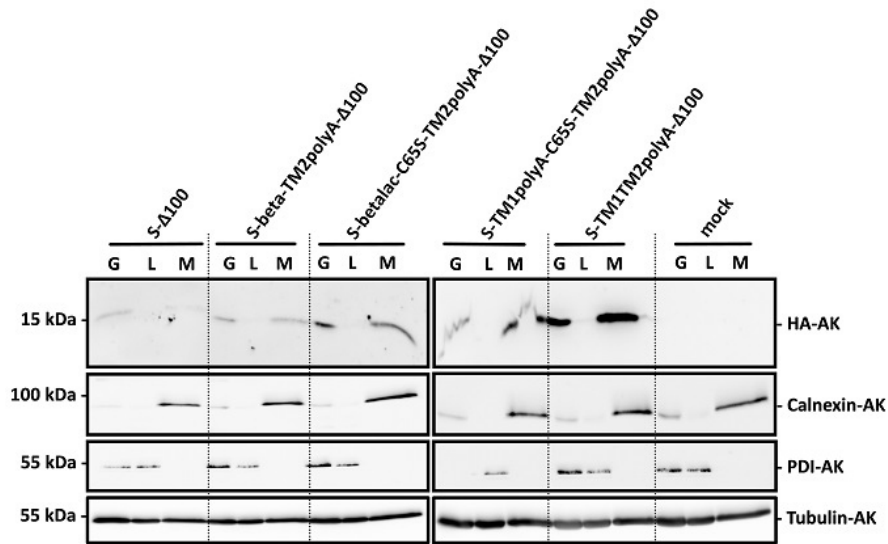


Abbildung 4.21: Membranstatus der S- Δ 100-Mutanten. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion mit Triton-X114 lysiert und das Lysat anschließend in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion getrennt. Die S-Mutanten wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper detektiert. Als Marker für die Membranfraktion wurde das zelluläre ER-Membran-Protein Calnexin, als Marker für die lösliche Fraktion das luminale ER-Protein PDI und das zytoplasmatische Protein Tubulin verwendet. Calnexin wurde mit einem monoklonalen anti-Calnexin-Antikörper, PDI mit einem monoklonalen anti-PDI-Antikörper und Tubulin mit einem monoklonalen anti-Tubulin-Antikörper detektiert. G: Gesamtzelllysate, L: Lösliche Fraktion, M: Membranfraktion.

Fusionsprotein als Kontrolle geeignet war.

4.2.2.3 Interaktionsstudien mittels FACS-FRET und Crosslinking

Durch eine FACS-FRET-Analyse nach Banning *et al.* [163] wurde zum einen untersucht ob die Oligomerisierung des S-Proteins mittels FRET messbar ist. Zum anderen sollten durch verschiedene S-Mutanten die Bereiche von S identifiziert werden, die am Prozess der Oligomerisierung beteiligt sind.

Wie in Abbildung 4.23 (A) zu sehen ist, zeigten die Fusionsproteine Y/B-S im Vergleich zur Positivkontrolle (Y-B) und zur Negativkontrolle (Y + B) ein FRET-Signal von 80 % (± 5 % SA, blauer Balken), was auf eine starke Interaktion hindeutet. Nach Kotransfektion der Y/B-S-Konstrukte mit den Kontrollen Y/B bzw. Y/B-MEM konnten jeweils FRET-Werte von < 5 % gemessen werden. YFP und BFP als zytoplasmatische Kontrollen dienen dem Nachweis, dass S nicht unspezifisch mit zytoplasmatischen Proteinen interagiert. Die MEM-Konstrukte kodieren für palmitoylierte Peptide [163], die an zellulären Membranen lokalisieren. Somit konnte nach Kotransfektion mit diesen Konstrukten auch gezeigt werden, dass die gemessene Interaktion zwischen S auch in der Membran spezifisch war. Nach Kotransfektion von B-S mit dem Y-E2-Fusionsprotein des HCV konnte keine Interaktion gemessen werden, obwohl E2 wie S ebenfalls an der ER-Membran lokalisiert [164]. Damit konnte zum einen gezeigt werden, dass die Oligomerisierung des S-Proteins mit Hilfe der FACS-FRET-Methode messbar ist und zum anderen, dass diese Interaktion spezifisch war.

Die Analyse der S-CS-Mutante zeigte, dass eine stabile Vernetzung von S über die Ausbildung von Disulfidbrücken keine Voraussetzung für die Oligomerisierung von S war (siehe Abbildung 4.23 (A), blauer Balken). Die Substitution der TM1, TM2 oder beider Transmembrandomänen durch das Typ-I-Signal der Betalactamase bzw. durch eine Poly-Alanin-Sequenz führte

4 Ergebnisse

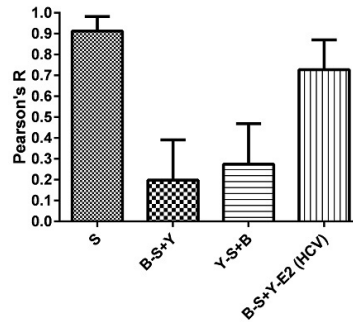


Abbildung 4.22: Analyse der Kolo-kalisation der S-Fusionsproteine. Kotransfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion fixiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Pearson's Korrelations Koeffizienten R. Pro Experiment wurden mindestens 20 YFP/BFP-doppelt-positive Zellen analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prims®.

zu einer abgeschwächten Interaktion von S (FRET-Werte im Bereich von 60–70 %). Ein deutlich stärkerer Verlust der Oligomerisierungsfähigkeit von S hingegen zeigten die C-terminalen Deletionsmutanten $\Delta 178$, $\Delta 153$ und $\Delta 100$. Wurden im Hintergrund der $\Delta 100$ -Mutante die TM1 und TM2 durch eine Poly-Alanin-Sequenz substituiert, führte dies zu einem fast vollständigen Rückgang der Oligomerisierungsfähigkeit von S. Auch die Punktmutation C65S führte zu einem deutlichen Rückgang des FRET-Wertes auf 25 %. Zu einem nahezu vollständigen Verlust der Oligomerisierungsfähigkeit führte jedoch die gleichzeitige Substitution der TM1 und TM2, die Punktmutation C65S sowie die Deletion C-terminaler Bereiche von S ab AS 100.

Alle FRET-Werte der Kotransfektionen der S-Konstrukte mit den Y/B bzw. den Y/B-MEM-Konstrukten sind tabellarisch im Anhang aufgelistet. Des Weiteren sind beispielhaft die FACS-Primärdaten jeweils eines Versuchs im Anhang abgebildet.

Wie in Kapitel 4.2.2.2 dargestellt, wurden die Y/B-S-Fusionsproteine unterschiedlich stark in HuH-7-Zellen exprimiert. Um auszuschließen, dass eine verminderte Expression der S-Mutanten auch zu einem verringerten FRET-Wert führt, wurden die Werte der Y- und B-transfizierten Zellen gegen die gemessenen FRET-Werte aufgetragen und analysiert. Es zeigte sich kein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern ($R^2 = 0.01992$, siehe Abbildung 4.24), was darauf schließen lässt, dass zwischen der Expressionsrate und dem gemessenen FRET-Wert kein Zusammenhang besteht.

Um die FRET-Daten ausgewählter S-Mutanten biochemisch zu bestätigen, wurden transfizierte HuH-7-Zellen mit dem Crosslinker DSS behandelt und anschließend durch WB analysiert. Wie in Abbildung 4.25 zu erkennen ist, konnten für das WT-S drei Tage nach Transfektion Banden auf Höhe der 25 kDa, 55 kDa, 100 kDa und 250 kDa Marker-Banden detektiert werden. Diese S-Derivate repräsentieren Monomere und vermutlich Dimere und höhere Oligomere. Somit konnte für das WT-S die Oligomerisierung auch biochemisch nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Mutation aller acht Cysteine in der luminalen Schleife von S keinen Einfluss auf die Oligomerisierungsfähigkeit von S hatte. Auch für die Mutanten S- $\Delta 178$, S- $\Delta 153$, S-C48S-CS, S-C69S-CS und S-C76S-CS konnten Oligomere detektiert werden, wobei die Dimere deutlich überwiegen. Für die Mutanten S-TM1polyA-C65S-TM2polyA- $\Delta 100$ und S-C65S-CS hingegen waren keine höheren Oligomere, sondern nur schwache Dimere zu detektieren. Da die S-TM1polyA-C65S-TM2polyA- $\Delta 100$ -Mutante allerdings sehr schwach exprimiert wurde, lässt sich hier keine eindeutige Aussage über die Oligomerisierungsfähigkeit treffen. Diese Ergebnisse decken sich jedoch weitestgehend mit der FACS-FRET-Analyse.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl transmembrane und luminal als auch zytoplasmatische Bereiche von S am Prozess der Oligomerisierung beteiligt sind.

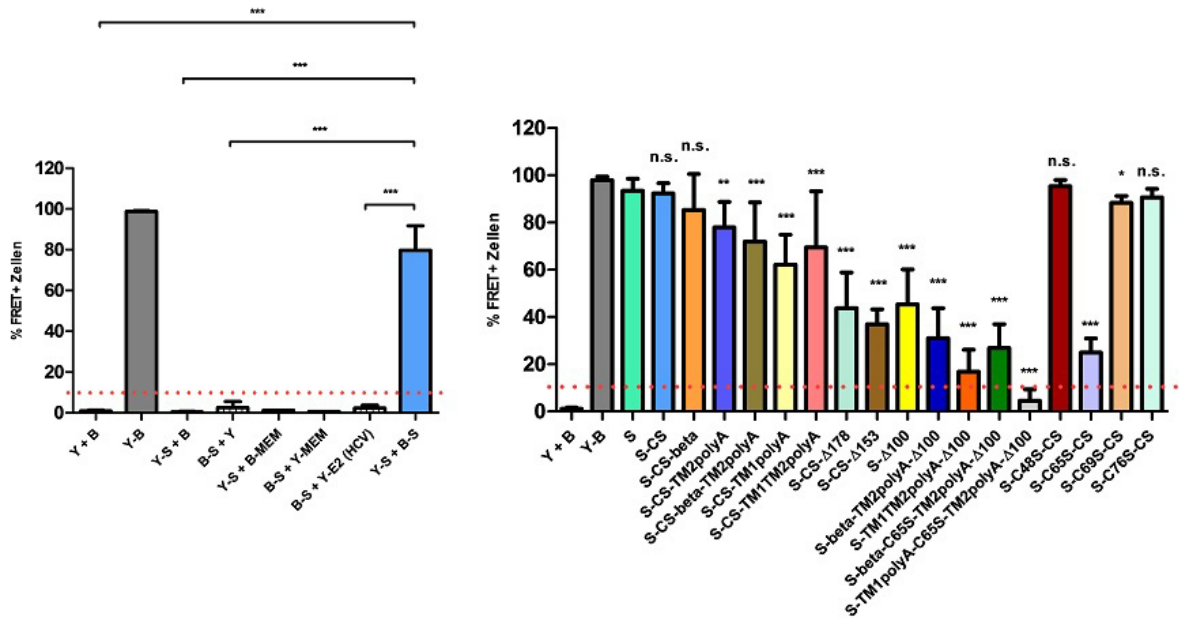


Abbildung 4.23: Analyse der Oligomerisierung der S-Fusionsproteine durch eine FACS-basierte FRET-Analyse. (Ko-)transfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion einer FACS-FRET-Analyse unterzogen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gesamtmenge an FRET⁺-Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je zwei Ansätzen. Pro Experiment wurden mindestens 2000 YFP/BFP-doppelt-positive Zellen analysiert. Bei FRET-Werten $\geq 10\%$ (gestrichelt-rote Linie) wurde von einer Interaktion ausgegangen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® (n.s. = nicht signifikant, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$).

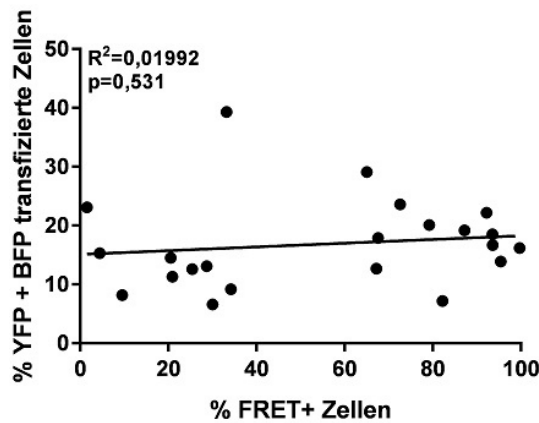


Abbildung 4.24: Korrelation zwischen Expressionsrate und FRET-Wert der S-Fusionsproteine. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden einen Tag nach Transfektion mittels FACS analysiert. Untersucht wurden mindestens 2000 YFP/BFP-doppelt-positive Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism®.

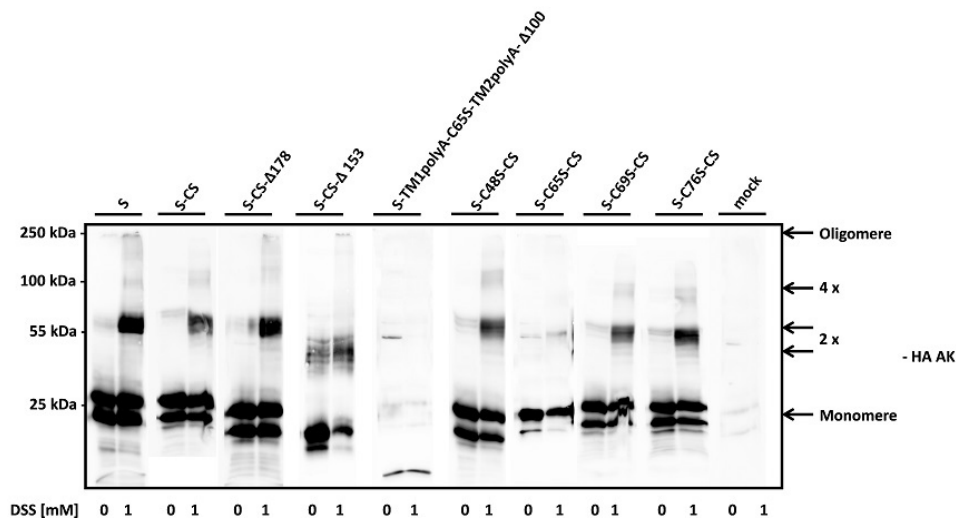


Abbildung 4.25: Analyse der Oligomerisierung ausgewählter S-Mutanten durch Crosslinking. Transfizierte HuH-7-Zellen wurden drei Tage nach Transfektion mit DSS behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und einer WB-Analyse unterzogen. Alle S-Mutanten wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper detektiert.

4.2.3 Partikelbildung ausgewählter S-Mutanten

4.2.3.1 Bildung subviraler Partikel

Um die Fähigkeit der verschiedenen S-Mutanten zu analysieren, weiterhin subvirale Partikel zu bilden, wurde der Partikel-haltige Zellkulturüberstand sowie das Zelllysat drei Tage nach Transfektion mittels WB analysiert. Um sicherzustellen, dass alle S-Mutanten detektiert werden konnten, wurden die HA-markierten Varianten für diesen Versuch verwendet, da einige Mutanten Mutationen oder Deletionen im Hauptepitop von S trugen. Wie in den Abbildungen 4.26 und 4.28 zu erkennen ist, zeigten alle Volllänge-Varianten sowie die C-terminalen Deletionsmutanten S- Δ 178 und S- Δ 153 im Vergleich zum WT-S vergleichbare intrazelluläre Expressionslevel. Lediglich die S-TM1TM2polyA-Mutante zeigte eine verringerte Expression. Alle Mutanten zeigten das charakteristische Glykosylierungsmuster von S, was auf eine korrekte Membrantopologie hindeutet. Die S- Δ 100-Mutanten wurden wesentlich schwächer exprimiert. Um diese Mutanten detektieren zu können, wurde dieser Blot ca. 4 Mal länger belichtet (siehe Abbildung 4.27). Für die S- Δ 100-Mutanten konnte nur eine Bande detektiert werden, da ihnen die Glykosylierungsstelle am Asn 146 fehlt. Im Gegensatz zur Oligomerisierungsfähigkeit wurde von S lediglich die Substitution der TM1 durch eine Poly-Alanin-Sequenz sowie die Deletion der C-terminalen 48 AS hinsichtlich der Bildung von SVP toleriert (siehe Mutanten S-TM1polyA und S- Δ 178 in Abbildung 4.26). Dies lässt den Schluss zu, dass die Oligomerisierung von S nicht ausreichend für die Sekretion von SVP ist, sondern dass die mutierten oder deletierten Bereiche weitere Funktionen erfüllen.

4.2.3.2 HBV-Virusproduktion

Für das S-Protein ist bekannt, dass es sehr effizient zu Oligomeren und anschließend zu SVP assemblieren kann. Welchen Einfluss die Oligomerisierung jedoch auf die Bildung von infektiösen Virionen hat ist bislang nicht geklärt. Wie in Kapitel 4.2.2.3 und 4.2.3.1 gezeigt werden konnte, war die C65S-Mutante nur noch eingeschränkt in der Lage zu oligomerisieren und konnte keine SVP in den Überstand sekretieren. Um zu analysieren, welchen Einfluss diese Punktmutation auf die Bildung von Virionen hat, wurden HuH-7-Zellen mit den in Kapitel 3.1.9 beschriebenen

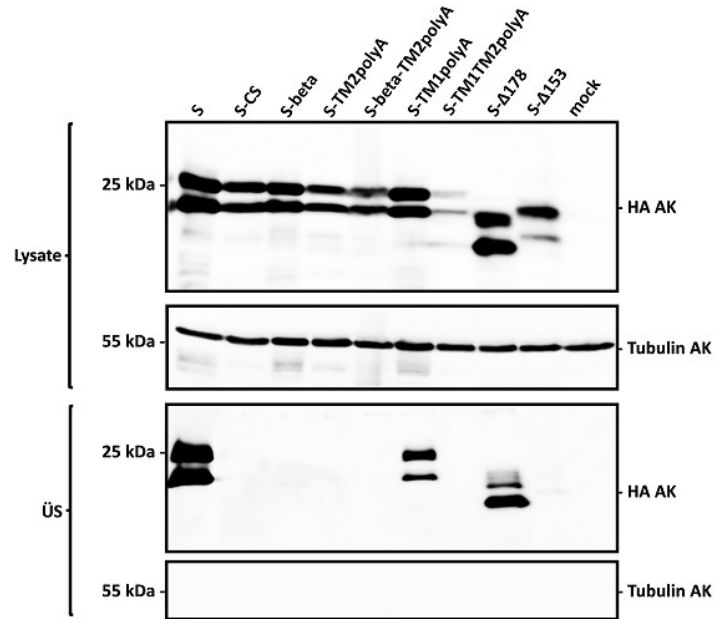


Abbildung 4.26: WB-Analyse zur Kontrolle der SVP-Bildung der S-Mutanten. Das Zellysate und der Zellkulturüberstand (ÜS) transfizierter HuH-7-Zellen wurde drei Tage nach Transfektion durch WB analysiert. Alle S-Mutanten wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt.

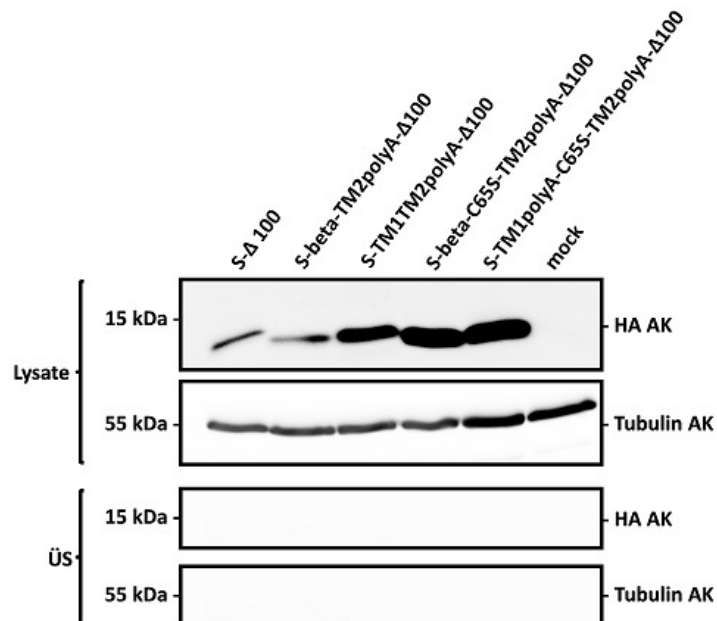


Abbildung 4.27: WB-Analyse zur Kontrolle der SVP-Bildung der S-Mutanten. Das Zellysate und der Zellkulturüberstand (ÜS) transfizierter HuH-7-Zellen wurde drei Tage nach Transfektion durch WB analysiert. Alle S-Mutanten wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt.

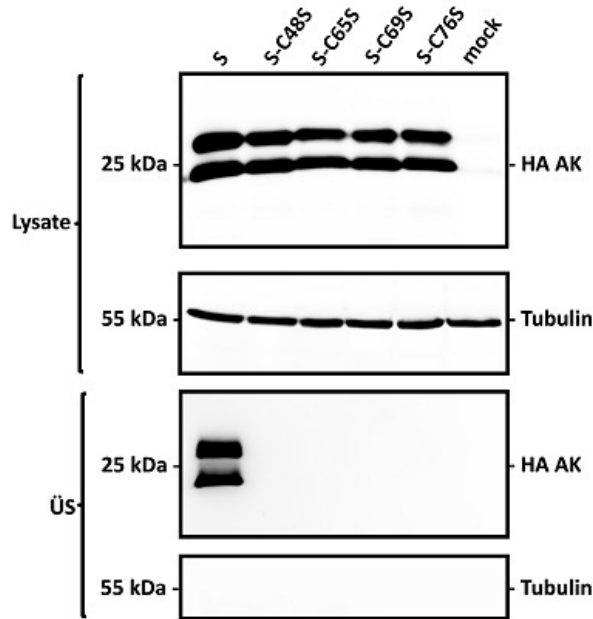


Abbildung 4.28: WB-Analyse zur Kontrolle der SVP-Bildung der S-Mutanten. Das Zellysate und der Zellkulturüberstand (ÜS) transfizierter HuH-7-Zellen wurde drei Tage nach Transfektion durch WB analysiert. Alle S-Mutanten wurden mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt.

Plasmiden transfiziert, Partikel im Zellkulturüberstand fünf Tage nach Transfektion präzipitiert, die HBV-Genome gereinigt und über eine HBV-genomspezifische qPCR nachgewiesen. Als Positivkontrolle des Assays diente 1 µl konzentriertes Serum eines HBV-positiven Spenders.

Wie in Abbildung 4.29 (A) zu erkennen ist, war die Punktmutation C65S ausreichend, um die Virusproduktion vollständig zu verhindern. Die C65S-Mutation führte im Hintergrund des M und L-Proteins auch zu einer vollständigen Verhinderung der Sekretion von S, M und L. Da die S-C65S-Mutante keine SVP sekretieren kann, wurde in einem zweiten Ansatz (Abbildung 4.29 A und B, Ansatz WT -S und C65S -S) nur das Plasmid pSVHBV1.1LE- mit pSV45-57 bzw. der entsprechenden Mutante kotransfiziert, um eine eventuelle inhibitorische Wirkung durch die Überexpression und intrazelluläre Retention von S auszuschließen. Ohne eine zusätzliche Expression von S wurden jedoch deutlich weniger WT-Virionen gebildet. Somit konnte dieser Effekt ausgeschlossen werden.

Wie in Kapitel 4.2.3.1 gezeigt, war die S-Δ178-Mutante weiterhin in der Lage, SVP zu bilden. Wie in Abbildung 4.30 zu erkennen ist, unterstützte diese Mutante allerdings die Virionenbildung nicht mehr.

4.2.3.3 HDV-Partikelbildung

Für die Bildung von HDV-Virionen und HDV-VLP ist die Interaktion des LDAg mit dem HBV-S-Protein essentiell [39]. Die Interaktion des LDAg mit dem S-Protein wird über das Prenylierungsmotiv des LDAg und das Trp 196 des S-Proteins vermittelt [175, 176]. Aus diesem Grund wurde die S-Δ178-Mutante als Negativkontrolle verwendet. Um den Einfluss der Punktmutation C65S in S hinsichtlich der Bildung von HDV-VLP zu testen, wurden der Zellkulturüberstand transfizierter HuH-7-Zellen fünf Tage nach Transfektion konzentriert und anschließend mittels WB analysiert.

Wie in Abbildung 4.31 (A) zu erkennen ist, wurde das LDAg intrazellulär exprimiert (Banden

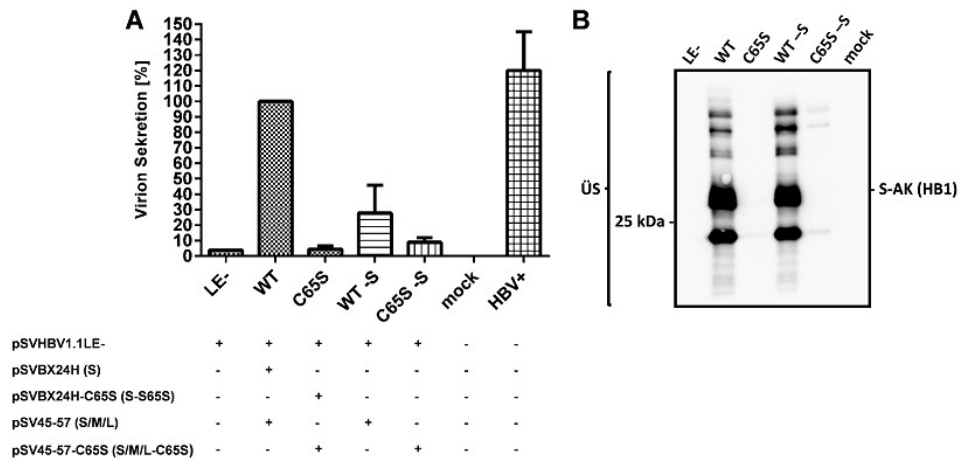


Abbildung 4.29: Nachweis der Virusproduktion S-C65S-Mutante durch qPCR. (A) Quantifizierung von HBV-Genomen durch eine HBV-spezifische qPCR in Zellkulturüberständen (ko)-transfizierter HuH-7-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte und SA aus drei unabhängigen Experimenten (B) WB-Analyse zur Kontrolle der Sekretion von HBV-Oberflächenproteinen im Zellkulturüberstand. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten.

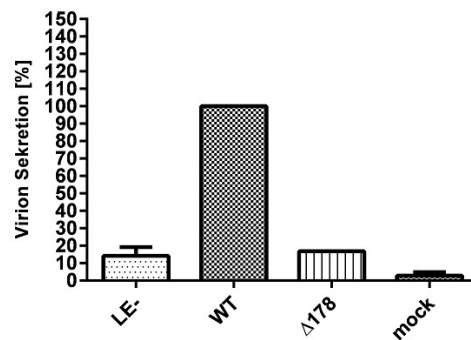


Abbildung 4.30: Nachweis der Virusproduktion der S- Δ 178-Mutante durch qPCR. Quantifizierung von HBV-Genomen durch eine HBV-spezifische qPCR in Zellkulturüberständen (ko)-transfizierter HuH-7-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte und SA aus zwei unabhängigen Experimenten.

auf Höhe von ~27 kDa). Eine alleinige Transfektion mit dem LDAG-Konstrukt ist jedoch nicht ausreichend für die Sekretion des LDAG. Auch die Kotransfektion mit der S- Δ 178-Mutante führte erwartungsgemäß nicht zur Sekretion des LDAG (Spur 3). Lediglich die Kotransfektion mit WT-S führte zur Sekretion des LDAG (Spur 2). Auch die S-C65S-Mutante war nicht in der Lage, mit dem LDAG zu interagieren, es zu umhüllen und schließlich in den Zellkulturüberstand zu sekretieren. In Abbildung 4.31 (B) wurden sowohl das LDAG als auch die S-Derivate im Lysat und Zellkulturüberstand analysiert. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung A. S- Δ 178, S-C65S und auch S-C48S waren nicht mehr in der Lage LDAG zu sekretieren. Lediglich nach Kotransfektion des LDAG mit S und S-TM1polyA konnte LDAG im Überstand detektiert werden, wobei das Ergebnis für die TM1polyA-Mutanten hier nicht eindeutig ist.

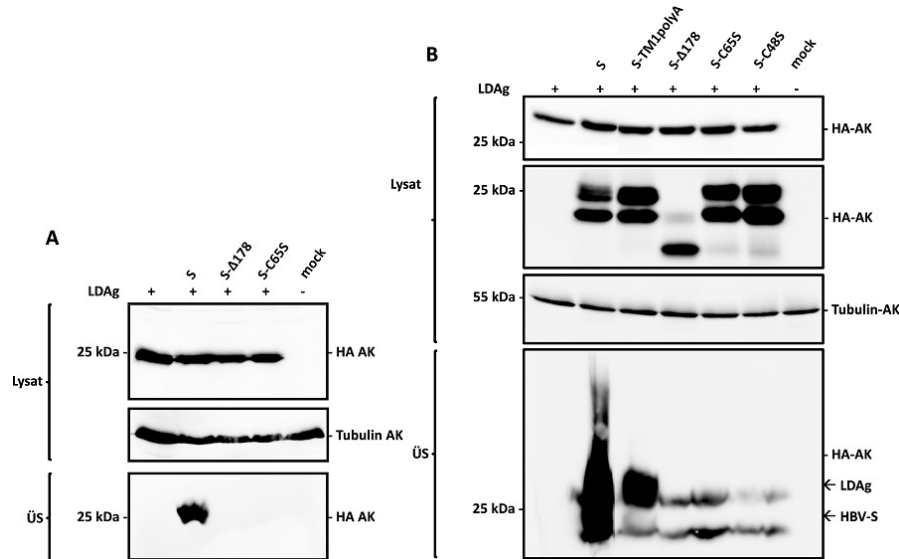


Abbildung 4.31: WB-Analyse zur Kontrolle der HDV-VLP-Bildung ausgewählter S-Mutanten. Der Zellkulturüberstand transfizierter HuH-7-Zellen wurde fünf Tage nach Transfektion mit PEG8000 konzentriert. Anschließend wurden LDAG und S mit einem monoklonalen HA-Antikörper detektiert. Als zelluläre Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das zelluläre Protein Tubulin eingesetzt. (A) HuH-7-Zellen wurden mit dem LDAG und dem WT-S oder den S-Mutanten Δ 178 und C65S kotransfiziert. Hier wurde nur das LDAG im Lysat und Zellkulturüberstand detektiert. (B) HuH-7-Zellen wurden mit dem LDAG und dem WT-S oder den S-Mutanten TM1polyA, Δ 178, C65S und C48S kotransfiziert. Hier wurden sowohl S als auch LDAG im Lysat und Zellkulturüberstand detektiert.

4.2.4 Übersicht der Ergebnisse zur Charakterisierung der S-Mutanten

Um die Phänotypen der einzelnen S-Mutanten besser vergleichen zu können, sind alle Ergebnisse in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die Mutanten wurden dabei hinsichtlich ihrer mutierten Bereiche in die Kategorien transmembran, luminal, zytoplasmatisch, C-terminal und kombiniert zusammengefasst, um die funktionellen Bereiche von S zu verdeutlichen.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Mutationsanalyse von S

	S	S-CS	S-beta	S-TM2polyA	S-beta-TM2polyA	S-TM1polyA	S-TM1TM2polyA	S-Δ178	S-Δ153	S-Δ100	S-beta-TM2polyA-Δ100	S-TM1TM2polyA-Δ100	S-beta-C65S-TM2polyA-Δ100	S-TM1polyA-C65S-TM2polyA-Δ100	S-C48S	S-C65S	S-C69S	S-C76S
Expression	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
Lokalisation																		
Membranstatus	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	(+)
Oligomerisierung	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	(+)
SVPs	+	+	+	·	·	(+)	·	(+)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Virus	+	+	+	·	·	(+)	·	(+)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
VLPs	+	+	+	·	·	(+)	·	(+)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
				transmembran				C-terminal				kombiniert			luminal			

+: Wie WT
 (+): Attenuierte Aktivität im Vergleich zum WT
 -: Inaktiv
 G: Lokalisation am Golgi
 leer: nicht analysiert

5 Diskussion

5.1 Herstellung von doppelt-fluoreszenzmarkierten HDV-Partikeln

Die Mechanismen, die der Hepatitis-Delta-Virus-Morphogenese und Infektion von Hepatozyten zu Grunde liegen, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Um den Prozess der Virusaufnahme, des intrazellulären Transports und der Morphogenese von neu synthetisierten HDV-Partikeln mit Hilfe von *Live-Cell-Imaging* untersuchen zu können, sollten doppelt-fluoreszenzmarkierte HDV-Partikel generiert werden. Shih & Lo [170] konnten bereits zeigen, dass ein Fusionsprotein aus GFP und dem LDAg weiterhin funktionell blieb, in HDV-VLP eingebaut und effizient sekretiert wurde. Des Weiteren konnte in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ein Fusionsprotein aus dem rot fluoreszierenden Protein mCherry und dem HBV-S-Protein sowohl 20 nm SVP bildet als auch in die Hülle des HBV integriert wird [161].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass alle genierten LDAg-Fusionskonstrukte stabil exprimiert wurden und die korrekte nukleäre Lokalisation in Abwesenheit von HBV-S aufwiesen (siehe Abbildung 4.2 und 4.3). Des Weiteren wurden alle LDAg-Fusionskonstrukte nach Kotransfektion mit dem WT-S, aber nicht mit dem mCherry-S, ins Zytoplasma transloziert. Offensichtlich kam es zu keiner, die zelluläre Verteilung des LDAg verändernden Interaktion zwischen GFP-LDAg und mCherry-S. Dies konnte sowohl durch IF-Untersuchungen als auch biochemisch bestätigt werden (siehe Abbildung 4.4 und 4.5). Passend zu diesen Daten ist der Befund, dass mCherry-S auch nicht in der Lage war, HDV-VLP mit HA-LDAg, GFP-LDAg oder YFP-LDAg zu bilden (siehe Abbildung 4.7). Dies ist insofern überraschend, da die Interaktion zwischen LDAg und HBV-S über Trp 196, 199 oder 201 von S und die C-terminale Prenylierung des Cys 211 des LDAg vermittelt wird [32, 176, 177] und diese Elemente in den Konstrukten unverändert blieben. Die Fluoreszenzproteine GFP/YFP bzw. mCherry wurden an den N-Terminus von LDAg bzw. S positioniert und sollten demnach diese Interaktion nicht inhibieren. Ein möglicher Grund könnte die Größe der Fluoreszenzprotein-Domäne sein (~25 kDa). Schon in früheren Arbeiten wurde versucht, HBV-S mit dem wesentlich kleineren Tetracystein-(TC)-Tag (AS-Sequenz: CCPGCC) [178] zu markieren. Eine Färbung des S-TC-Konstrukts war allerdings nicht erfolgreich [179].

Da sowohl HDV-VLP, SVP und HBV-Virionen an unterschiedlichen zellulären Kompartimenten assemblieren, wäre es denkbar, dass die Fusion von großen Protein-Tags wie GFP oder mCherry die Assemblierung von HDV-VLP am *trans*-Golgi-Netzwerk, jedoch nicht die effiziente Knospung von SVP am ER/ERGIC oder die Bildung von HBV-Virionen an MVB verhindert. Vorstellbar ist auch eine ineffiziente Interaktion mit bislang unbekanntem zellulären Faktoren, die für die Knospung von HDV essentiell sind.

5.2 Untersuchung der Oligomerisierung des kleinen HBV-Hüllproteins S

5.2.1 Die Rolle der Transmembrandomäne 2 im Prozess der Oligomerisierung

Nach der Synthese des kleinen HBV-Hüllproteins S an der ER-Membran kommt es zur Knospung von S an der ER/ERGIC-Membran und zur Bildung von subviralen Partikeln. In früheren Deletions- und Mutationsstudien konnte die essentielle Rolle der TM2 im Prozess der Partikelmorphogenese und als topologisches Signal zur Verankerung in der ER-Membran gezeigt werden. So führt beispielsweise eine teilweise oder komplette Deletion der TM2 nicht nur zu einem kompletten Verlust der Sekretionsfähigkeit, sondern auch zu einer Destabilisierung von S [180–182]. Weiterhin konnten Siegler & Bruss [155] zeigen, dass die Insertion eines Alanins an C-terminaler, zentraler oder N-terminaler Position innerhalb der TM2 zu einer verminderten aber stabilen Expression und der korrekten Translokation C-terminaler Bereiche von S führte, die Sekretionsfähigkeit von S jedoch vermutlich durch die induzierte Helixdrehung um 100 °C vollständig verhindert wurde. Wurden die Alanin-Insertionsmutanten mit dem WT-S kotransfiziert wurde die Sekretion von S transdominant von diesen Mutanten inhibiert. Dies lässt den Schluss zu, dass eine durch die Alanin-Insertionen induzierte Helixdrehung zwar die Interaktion mit dem WT-S nicht beeinträchtigte, hinsichtlich der Sekretion von SVP aber nicht toleriert wurde. Die Substitution der TM2 durch die homologe TM2-Sequenz des DHBV oder des Typ-II-Signals des HTR hatten ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die stabile Expression und die korrekte Translokation C-terminaler Bereiche von S, führten aber ebenfalls zu einem vollständigen Verlust der Sekretionsfähigkeit von S. Im Gegensatz zu den Alanin-Insertionsmutanten zeigten diese Mutanten allerdings keinen transdominant-negativen Effekt nach Kotransfektion mit dem WT-S. Dies würde bedeuten, dass die WT-TM2-Sequenz entweder wichtig für die Ausbildung von intramolekularen Interaktionen zwischen anderen Transmembransegmenten von S und somit für die Ausbildung von stabilen Dimeren ist, oder dass die TM2-Sequenz direkt an der intermolekularen Interaktion zwischen S-Proteinen beteiligt ist.

Für einige virale Proteine wie z. B. das Bovine Papillomavirus-E5-Protein [183], den M2-Protonen-Kanal des Influenza-A-Virus [184], das G-Protein des Vesikulären Stomatitis-Virus [185] oder das HIV-1 Vpu-Protein [186] ist bekannt, dass sie über Transmembrandomänen miteinander interagieren und Dimere oder höhere Oligomere ausbilden. Auch die Heterodimerbildung der HCV-Glykoproteine E1 und E2 wird über Transmembrandomänen vermittelt [187]. Für viele zelluläre Proteine wie z. B. das humane Glycophorin A [188] oder den MHC-II-Komplex [189] konnte ebenfalls eine Interaktion über ihre TM-Domänen nachgewiesen werden.

In diesem Teil der Arbeit wurde nun die Fähigkeit der TM2, mit sich selbst zu interagieren, analysiert. Dazu wurde der von Banning *et al.* [163] etablierte FACS-FRET-Assay verwendet. Zunächst wurden die in Abbildung 4.8 dargestellten und erfolgreich klonierten YFP/BFP-Fusionskonstrukte funktionell charakterisiert. Sie wurden stabil exprimiert und waren somit geeignet für die weitere Analyse (siehe Abbildung 4.9). Im Gegensatz zum WT-S lokalisierten alle TM-Fusionsproteine am Golgi (siehe Abbildung 4.10). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie weiterhin mit Membranen assoziiert waren (siehe Abbildung 4.11). Dies könnte zum einen am Fehlen der TM1-Sequenz liegen, die das WT-S und seine N-terminalen Bereiche in das ER translozieren. Zum anderen konnte bereits gezeigt werden, dass das zelluläre Enzym PDI für die Ausbildung der Disulfidbrücken von S verantwortlich ist [96]. Durch das Fehlen der luminalen Schleife 2 von S und somit der in die Disulfidbrückenbildung involvierten Cysteine kommt es womöglich zu einem schnellen Transport der TM2-Fusionsproteine über das ERGIC zum Golgi. Auch die fehlende N-Glykosylierungsstelle am Asn 146 könnte hierfür eine Ursache sein. Des Weiteren konnten Mades *et al.* [190] zeigen, dass die intra- und extrazelluläre Konzentration der HBV-Hüllproteine über den zellulären Faktor Sec63 reguliert wird. Sec63

ist Teil des Sec61-Proteinkomplexes der ER-Membran, der für die Translokation, Integration und den Transport von neusynthetisierten Proteinen in das ER bzw. entlang der ER-Membran verantwortlich ist [191]. Sec63 reguliert dabei nur Proteine mit mehreren TM-Domänen, wie z. B. das HBV-S-Protein [190]. Proteine oder Peptide wie die TM2- oder HTR-Fusionsproteine mit nur einer TM werden deshalb wahrscheinlich über den konstitutiven Signalweg zum Golgi transportiert.

Die Interaktionsstudie zeigte eine deutliche Selbstinteraktion der WT-TM2-Sequenz (siehe Abbildung 4.13). Somit konnte in dieser Arbeit zum einen die Funktionalität des FACS-FRET-Assay für Transmembrankonstrukte bestätigt werden und zum anderen eine Selbstinteraktion der TM2 zum ersten Mal nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass TM-Interaktionen über spezifische Sequenzmotive wie z. B. Glycin-Zipper (GxxxG), QxxS-Motive oder Ser/Thr-Cluster vermittelt werden [192]. Im Gegensatz zur TM-Sequenz des HTR, die über ein Glycin-Zipper Motiv mit sich selbst interagieren kann (D. Langosch, persönliche Mitteilung), konnte in der TM2-Sequenz von S kein spezifisches Motiv gefunden werden. Betrachtet man jedoch die AS-Sequenz der TM2 (siehe Abbildung 5.1), fällt auf, dass diese hauptsächlich aus den aliphatischen AS Ile, Leu und Val und der aromatischen AS Phe besteht.

Heptadmotiv	. . GA . . DE . GA . . DE . GA . . DE
HBV-S-TM2	RRFIIFLFIILLCLIFLLVLLD
HBV-S-TM2-Leu84-98A	RRFIIFAFILLCAIFLLVLLD
HBV-S-TM2polyA	RRFIIAAAAAAAAAAAAVLLD

X	sauer (-)
X	basisch (+)
X	polar ungeladen
X	hydrophob unpolar

Abbildung 5.1: TM2-, TM2-Leu84-98Ala-, TM2polyA-Sequenz und Leuzin-Zipper-Heptad-Motiv.

Gurezka *et al.* [193] konnten zeigen, dass neben löslichen und membrangebundenen viralen Proteinen, wie z. B. das Tegumentprotein pUL71 des HCMV [194] oder des HN-Protein des *Newcastle-Disease-Virus* [195] auch artifizielle, membrangebundene Peptide über Leuzin-Zipper-Motive interagieren können. Die Interaktion wird über ein sogenanntes Heptad-Motiv vermittelt (*gaxxdexgaxxdexga*), wobei die Positionen *a*, *d*, *e* und *g* mit hydrophoben AS besetzt sind und die Positionen *a* und *d* den hydrophoben Kern des Interaktionsmotivs darstellen. Vergleicht man dieses Heptad-Motiv mit der TM2-Sequenz (siehe Abbildung 5.1), erkennt man, dass alle *a*, *d*, *e* und *g* Positionen bis auf eine Ausnahme (AS Asp an letzter Position der TM2-Sequenz) mit aliphatischen AS besetzt sind. Alle *a* und *d* Positionen sind bis auf eine Ausnahme (AS Ile an vierter Position der TM2-Sequenz) mit Leuzinen besetzt. Aus diesem Grund wurde eine Mutante generiert, bei der die Leuzine an Position 84, 91 und 98 der TM2-Sequenz (relativ zur S-Sequenz) zur Alaninen mutiert wurden (in Sequenz hellgrün markiert), um die Bedeutung dieser AS bei der Interaktion zu untersuchen. Wie in Abbildung 4.13 dargestellt, hatten diese Mutationen keinen signifikanten Rückgang der Interaktion zur Folge. Eine Ursache hierfür könnten die weiterhin vorhandenen hydrophoben AS an den *a*, *g* und *e* Positionen sein. Um die Bedeutung dieser Positionen zu untersuchen, aber gleichzeitig die Membranlokalisation der TM2 aufrechtzuerhalten, wurden die 13 zentralen AS der TM2-Sequenz zu Alaninen mutiert. Alanine führen in TM-Domänen zu einem starken Verlust der Oligomerisierungsfähigkeit [193]. Diese Substitution führte, wie in Abbildung 4.13 beschrieben, zu einem fast vollständigen

digen Rückgang der Interaktion der TM2. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die TM2 nicht unspezifisch mit dem Typ-II-Signal des HTR interagiert. Durch diese Interaktionsstudie konnte die Bedeutung der TM2 im Prozess der Oligomerisierung nachgewiesen werden. Das Typ-II-Signal des S-Proteins interagiert spezifisch mittels eines Leuzin-Heptad-Motivs mit sich selbst.

5.2.2 Mutationsanalyse der Oligomerisierung von S

Welche Sequenzbereiche von S kurz nach der Synthese am Prozess der Oligomerisierung beteiligt sind, ist bislang nicht geklärt. Allerdings sind direkte intra- oder intermolekulare Interaktionen von S auf Domänen beschränkt, die im selben Zellkompartiment lokalisieren. Es ist bereits bekannt, dass S intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen der luminalen Schleife 2 bildet (siehe Abbildung 1.6) [96, 118–120]. Eine Beteiligung zytoplasmatischer oder transmembraner Bereiche ist bislang jedoch nicht dokumentiert. Die Arbeit von Siegler & Bruss [155] und die vorliegenden und diskutierten Daten aus dem vorangegangenen Kapitel 5.2.1 dieser Arbeit lassen jedoch den Schluss zu, dass die TM2 am Prozess der Oligomerisierung von S beteiligt ist.

Um diese Hypothese im Hintergrund des S-Proteins zu testen, wurde zunächst das WT-S N-terminal mit YFP/BFP fusioniert, um die Interaktion von S mittels FACS-FRET [163] messen zu können. Eine N-terminal vor YFP/BFP positionierte Signalsequenz des Rabiesvirus-Glykoproteins diente der korrekten Translokation von S ins ER. Die funktionelle Charakterisierung ergab, dass das YFP/BFP-S-Fusionsprotein stabil exprimiert wurde (siehe Abbildung 4.16 und 4.17) und wie das WT-S am ER lokalisierte (siehe Abbildung 4.19 und 4.22). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen somit, dass eine Fusion von S mit den fluoreszierenden Proteinen YFP oder BFP weder die Stabilität, noch die Lokalisation von S beeinträchtigen. Auch wurde das Fusionsprotein topologisch korrekt in der Membran verankert, was durch das typische Glykosylierungsmuster bestätigt wird. Somit konnten alle auftretenden Phänotypen der YFP/BFP-S-Mutanten auf die eingebrachten Mutationen, Deletionen oder Substitutionen zurückgeführt werden. Allerdings bildeten diese Mutanten keine SVP, obwohl sie sehr ähnlich zum mCherry-S-Konstrukt waren, das SVP bilden kann (siehe Abbildung 4.7). Da sowohl YFP als auch BFP im Gegensatz zu mCherry schwach dimerisieren [196], könnte die unterschiedliche Faltung oder Größe der Fluoreszenzproteine eine Ursache hierfür sein.

Die Interaktion von YFP/BFP-S war mittels FRET spezifisch nachweisbar. Eine Interaktion mit den zytoplasmatischen Kontrollen YFP/BFP oder der Membrankontrolle MEM war wie erwartet nicht messbar. Auch war eine Interaktion mit dem HCV-E2-Protein selbst bei räumlicher Nähe, Überexpression und der partiellen Kolo-kalisation mit S nicht nachweisbar (siehe Abbildung 4.23). Diese Kontrollen belegten, dass ein FRET-Signal der S-Derivate eine spezifische Wechselwirkung widerspiegelt.

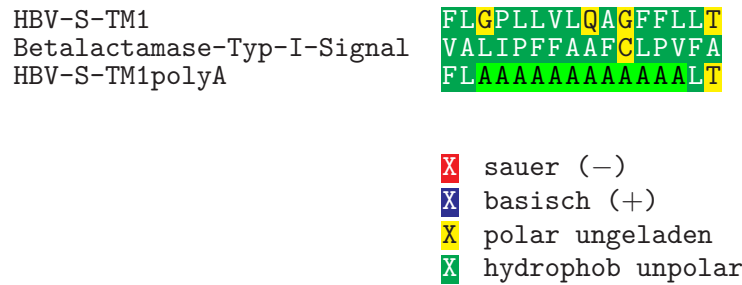
Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit getesteten Mutanten zeigten sehr unterschiedliche Expressionsraten im Vergleich zu YFP/BFP-S. Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass eine verminderte Expression nicht automatisch ein vermindertes FRET-Signal zur Folge hatte. Dies bestätigte die Funktionalität des Assays auch im Hintergrund von S (siehe Abbildung 4.24). Biochemisch konnte mit Hilfe des Crosslinkers DSS nachgewiesen werden, dass S intrazellulär nicht nur als Monomer und Dimer vorliegt. Es wurden schwache Banden auf Höhe mutmaßlicher Tetramere und höherer Oligomere detektiert (siehe Abbildung 4.25). Dies lässt den Schluss zu, dass S nach der Dimerisierung zu höheren Oligomeren assembliert.

Im weiteren Verlauf wurden alle acht Cysteine in der luminalen Schleife 2 gemeinsam zu Serinen mutiert, um die stabile Vernetzung von S zu Dimeren zu verhindern. Dadurch war es zum einen möglich zu untersuchen, ob die Disulfidbrückenbildung Voraussetzung für eine

stabile Oligomerisierung ist, und wenn nicht, mittels Mutagenese und des FACS-FRET-Assays weitere, involvierte Bereiche von S zu identifizieren. Die S-CS-Mutante wurde mit WT-Effizienz exprimiert und zeigte dieselbe Lokalisation an ER-Membranen wie das WT-S. Auch konnte kein Rückgang des FRET-Wertes und somit der Oligomerisierungsfähigkeit beobachtet werden. Diese Daten wurden teilweise durch Crosslinking-Experimente gestützt. Im Gegensatz zum WT-S konnten jedoch nur Monomere, Dimere und Tetramere beobachtet werden. Dieser Phänotyp wird später bezüglich der Partikelmorphogenese genauer besprochen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Fusionierung des S-Proteins mit YFP/BFP weder einen Einfluss auf die Proteinstabilität noch eine veränderte Lokalisation zur Folge hatte, die Interaktion von S mittels FACS-FRET und Crosslinking messbar war und die stabile Vernetzung von S zu Dimeren durch Disulfidbrückenbildung keine Voraussetzung für eine Interaktion war, wurden weitere Mutanten auf Grundlage der S-CS-Mutante zur Identifizierung von Interaktionsmotiven generiert. Auf Grundlage der Daten aus Kapitel 4.2.1 wurden zunächst die 13 zentralen, hydrophoben und für die TM2-Interaktion wichtigen AS durch Alanine substituiert, was eine verminderte Proteinstabilität im Vergleich zum WT zur Folge hatte. Dies deutet darauf hin, dass die TM2 neben der Verankerung in der Membran auch eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von S z. B. über direkte Interaktionen bei der Dimerisierung spielt. Diese Daten decken sich mit denen früherer Arbeiten, die eine wichtige Rolle der WT-TM2-Sequenz bei der Stabilität zeigen konnten [155, 180]. Trotz der verminderten Stabilität der S-CS-TM2polyA-Mutante lokalisierte diese jedoch am ER und wies die korrekte Topologie auf, was darauf schließen lässt, dass die mutierte TM2polyA für eine Verankerung in der Membran ausreichend ist. Die durchgeführte Interaktionsstudie zeigte, dass die PolyA-Sequenz innerhalb der TM2 nur einen geringen Einfluss auf die Oligomerisierungsfähigkeit des Gesamtproteins hatte, was bedeutet, dass die nachgewiesene Interaktion der TM2 durch andere Domänen von S kompensiert werden konnte.

Betrachtet man die Sequenz der TM1, fällt auf (siehe Abbildung 5.2), dass diese ebenso wie die TM2-Sequenz hauptsächlich aus hydrophoben AS wie Phe, Leu und Val besteht. Allerdings konnte auch in der TM1 kein spezifisches Interaktionsmotiv wie z. B. ein Glyzin-Zipper identifiziert werden. Da TM-Interaktionen aber auch über polare Reste wie Asn, Gln, Asp, His oder Trp vermittelt werden können [192], wurden die 12 zentralen AS der TM1 durch das Typ-I-Signal der β -Lactamase oder ebenfalls durch eine PolyA-Sequenz substituiert, um den Effekt des Gln und der umgebenden hydrophoben AS zu untersuchen (siehe Abbildung 5.2). Diese Substitutionen hatte nur einen geringen Einfluss auf die Proteinstabilität und keine veränderte Lokalisation zur Folge. Dies steht im Einklang mit vorangegangenen Arbeiten mit TM1-Substitutionsmutanten [155]. Auch Bruss & Ganem [180] konnten zeigen, dass eine Deletion der TM1 die Proteinstabilität nicht veränderte. Die Interaktionsstudie ergab bei der S-CS-beta-Mutante keine Reduktion des FRET-Signals. Für die S-CS-TM1polyA-Mutante konnte ein signifikant verringerter FRET-Wert detektiert werden, dieser lag aber immer noch bei ca. 60 %, was auf eine weiterhin starke Interaktion schließen lässt. Dieses Ergebnis lässt zwei Schlüsse zu. Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Typ-I-Signal der β -Lactamase selbst fähig zur Interaktion ist. Deshalb wird bei allen weiteren TM1-Mutanten der Fokus auf die TM1polyA-Mutanten gelegt. Zum anderen ist die TM1 allein, wie erwartet, nicht essentiell für die Oligomerisierung von S. Selbst bei einer Beteiligung der TM1 an Interaktionen könnte die TM2 vermutlich diesen Ausfall kompensieren. Dafür spricht auch der transdominant-negative Effekt der S-beta-Mutante im Hinblick auf die Sekretion von SVP nach Kotransfektion mit dem WT-S [155]. Weiterhin wird für die TM1 eher eine Rolle bei der Membranfusion und dem Infektionsprozess angenommen [126].

Abbildung 5.2: HBV-S-TM1-, TM1polyA und β -Lactamase-Typ-I-Signal.

Um zu testen, ob neben TM1 und TM2-Sequenzen weitere Proteinbereiche für die Interaktion von S verantwortlich sind, wurde eine doppelte Substitutionsmutante generiert bei der die TM1 und TM2 durch eine PolyA-Sequenz substituiert wurde (Mutante S-CS-TM1TM2polyA). Diese Mutante zeigte hinsichtlich der Stabilität und Lokalisation, wie erwartet, den gleichen Phänotyp wie die S-CS-TM2polyA-Mutante. Zwar konnte ein signifikant niedrigerer FRET-Wert im Vergleich zum WT-S gemessen werden, dieser lag jedoch immer noch bei ca. 60%. Diese Daten lassen darauf schließen, dass weitere Domänen von S im Prozess der Oligomerisierung involviert sind. Da in den C-terminalen Bereichen von S ab AS 179 zwei weitere Transmembrandomänen vermutet werden, wurde der C-Terminus von S ab AS 178 deletiert (Mutante S-CS- Δ 178). Eine Deletionsmutante ab AS 153 (Mutante S-CS- Δ 153) wurde generiert, weil vermutet wird, dass eine potentielle amphipathische Helix (AS 154–174) eine Funktion bei der Membranassoziation übernimmt (C. Sureau, persönliche Mitteilung). Die AS-Sequenz des C-Terminus von S ist in Abbildung 5.3 dargestellt.

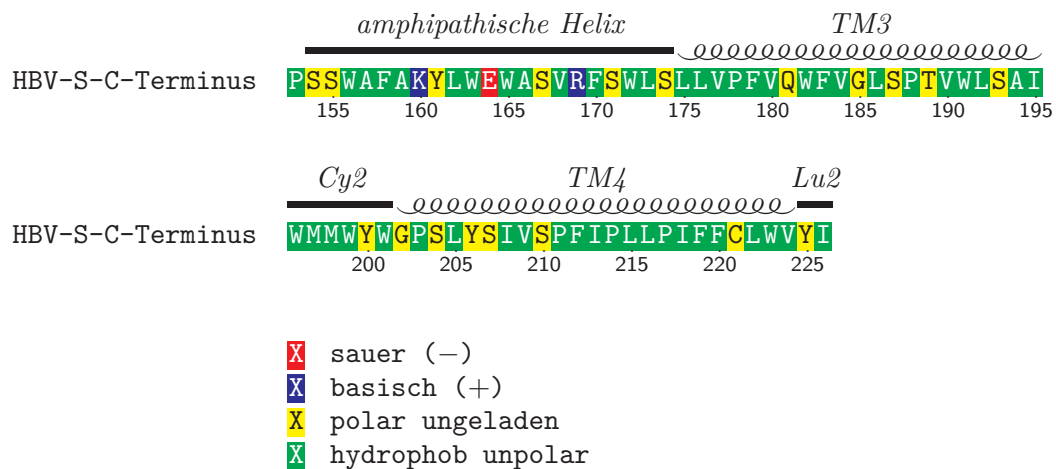


Abbildung 5.3: C-Terminus von S ab AS 153

Um einen Effekt der luminalen Schleife 2 zu untersuchen, wurde außerdem eine Deletionsmutante ab AS 100 generiert (Mutante S- Δ 100). Die phänotypische Charakterisierung der C-terminalen Deletionsmutanten ergab eine abgeschwächte Expression, je größer die Deletion C-terminaler Bereiche war. Des Weiteren lagen zwar alle Mutanten membrangebunden vor, zeigten aber eine zunehmende Lokalisation am Golgi. Dies steht im Einklang mit Berichten über die Funktion von potentiellen amphipatischen Helices. Diese scheinen wichtig für den Prozess der Membrankrümmung zu sein [197]. So konnten Aberle *et al.* [198] für das Pestivirus

Glykoprotein eine wichtige Bedeutung der amphipatischen Helix in der Membranverankerung zeigen. Eine verhinderte Membrankrümmung und eine daraus resultierende möglicherweise falsche Proteinfaltung oder Insertion in die ER-Membran könnte zu einem verstärkten Abbau am ER oder zu einer Mislokalisierung am Golgi führen.

Die Interaktionsstudie ergab ungefähr gleich starke FRET-Werte für alle C-terminalen Deletionsmutanten. Diese waren signifikant verringert und hatten Werte von ca. 40 %. Damit waren die gemessenen FRET-Werte geringer, als die der TM1 und TM2-Mutanten, was auf eine größere Bedeutung des C-Terminus beim Prozess der Oligomerisierung hindeutet. So konnten Ito *et al.* [199] zum Beispiel zeigen, dass die Punktmutationen R169P/G/L im C-Terminus von S ausreichen, um die Partikelsekretion zu hemmen. Ebenso führten Substitutionen C-terminaler Bereiche von S (AS 164–168, 169–173, 184–188, 194–198, 209–213) zu einem kompletten Sekretionsverlust von SVP, was die Bedeutung des C-Terminus unterstreicht [176]. Wie Bruss & Ganem [180] allerdings zeigen konnten wird eine C-terminale Deletionsmutante ab AS 164 mit dem WT-S weiterhin sekretiert. Da wie in der TM1 und TM2-Sequenz keine spezifischen Interaktionsmotive gefunden werden konnten, aber der C-Terminus von S sehr tryptophanreich ist, besteht auch die Möglichkeit, dass diese Tryptophane an direkten Interaktionen beteiligt sind. Die zytoplasmatischen Tryptophane an Position 196, 199 und 201 sind z. B. für die direkte Interaktion von S mit dem HDV-LDAG essentiell [177]. Auch ist für transmembrane Tryptophane bekannt, dass sie an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind [192]. Auch eine direkte Interaktion mit dem zellulären Sec61-Komplex zur ER-Translokation ist vorstellbar [191]. Ob dies beim S-Protein der Fall ist, müssen genauere Untersuchungen zeigen.

Sowohl die Substitution der TM1 und TM2 als auch die Deletion C-terminaler Bereiche von S hatten signifikant verminderte FRET-Werte zur Folge. Die Kombination dieser Mutationen resultierte in der Mutante S-TM1TM2polyA- Δ 100. Diese Mutante wurde im Vergleich zum WT wesentlich schwächer exprimiert, lag jedoch membrangebunden vor und lokalisierte, wie erwartet, am Golgi (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass diese Mutante trotz der Deletion und Substitution großer Bereiche von S weiterhin bis zum Schritt der Synthese und der Integration in die Membran funktionell blieb und für eine Interaktionsstudie verwendet werden konnte. Es zeigte sich ein FRET-Wert von unter 20 %, was auf eine nur noch sehr schwache Interaktion hindeutet. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sowohl das bestätigte Typ-I und Typ-II-Signal als auch die vermuteten Transmembrandomänen 3 und 4 und die amphipatische Helix im Prozess der Oligomerisierung involviert sind.

Da jedoch immer noch eine schwache Interaktion messbar war, wurde die Rolle der vier Cysteine in der zytoplasmatischen Schleife 1 von S genauer untersucht. Drei der vier Cysteine an Position 48, 65, 69 und 76 sind innerhalb der *Hepadnaviridae* konserviert und für die Sekretion von SVP des HBV essentiell (Subgenotyp *ayw*) [118]. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Subgenotyp *adw2* ist auch das Cys 76 essentiell. Für alle vier Cysteine konnte keine Beteiligung an der intermolekularen Disulfidbrückenbildung nachgewiesen werden [118–120]. Die Punktmutanten S-CS-C48S, C65S, C69S und C76S wurden etwas schwächer exprimiert als das WT-S, zeigten jedoch eine ER-Membranlokalisation und die korrekte Topologie. Überraschenderweise ergab die Interaktionsstudie der C65S-Punktmutante ein drastisch reduziertes FRET-Signal auf 25 %. Die C48S, C69S und C76S-Punktmutanten interagierten hingegen auf WT-Niveau. Eine Kombination der C65S-Punktmutation mit der S-TM1TM2polyA- Δ 100-Mutante (S-TM1polyA-C65S-TM2polyA- Δ 100) ergab einen weiteren Rückgang des FRET-Wertes auf unter 5 %. Dies ist insofern erstaunlich, da Curdt [200] zeigen konnte, dass Insertionen von bis zu 41 AS in der zytoplasmatischen Schleife 1 zwischen AS 50 und 51 nicht zu einem Sekretionsverlust von SVP führten. Da die Oligomerisierung essentiell für die SVP-Bildung ist, würde dieses Ergebnis gegen eine direkte Beteiligung des Cys 65 an diesem Prozess sprechen. Jedoch ist das C65 für die SVP-Bildung essentiell und wurde in seiner Funktion trotz großer Insertionen nicht beeinträchtigt. Auch eine Modifikation mit Fettsäuren wie z. B. eine Palmitoylierung

konnte bislang nicht gezeigt werden [109]. Eine mögliche Prenylierung des Cys 65 ist auch unwahrscheinlich, da Prenylierungen meistens am C-Terminus stattfinden, wie z. B. beim LDAG des HDV [32]. Auch erste Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigten keine Prenylierung des S-Proteins (Daten nicht gezeigt). Gegen eine posttranslationale Modifikation spricht auch die korrekte Lokalisation der C65S-Mutante, da z. B. eine Acetylierung oder Prenylierung meist an einer korrekten Membranassoziation beteiligt sind. Hier sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Da alle vier Cysteine konservativ durch die sehr ähnliche AS Serin ausgetauscht wurden, ist ein Einfluss auf die Konformation von S eher unwahrscheinlich. Cystein und Serin unterscheiden sich lediglich durch den Austausch eines Schwefels zu einem Sauerstoff in ihrer Seitenkette. Sauerstoff (3.44) ist dabei geringfügig elektronegativer als Schwefel (2.58) und würde eventuell auftretende Wasserstoffbrückenbindungen eher begünstigen. Eine mögliche Funktion der vier Cysteine 48, 65, 69 und 76 wäre die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken mit anderen Cysteinen des S-Proteins, wobei für die Oligomerisierung nur die Disulfidbrückenbildung des Cys 65 und für die SVP-Bildung die Ausbildung von Disulfidbrücken an allen Cysteinen essentiell wäre. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Cys 65 an der Interaktion mit zellulären Faktoren, wie dem Sec61-Komplex [191], beteiligt ist, um die Insertion in die ER-Membran oder die Membrankrümmung und somit die Interaktion zwischen einzelnen S-Proteinen zu ermöglichen. Zudem scheint eine Interaktion von S mit dem Membranprotein LC3, das ein Teil der zellulären Autophagozytose-Maschinerie ist, eine wichtige Rolle bei der Umhüllung von HBV zu spielen [99]. Tian *et al.* [98] haben gezeigt, dass S mit dem zellulären Chaperon CypA interagiert und dass CypA mit S kosekretiert wird. Es wird spekuliert, dass die Interaktion mit CypA über Proline in der zytoplasmatischen Schleife 1 von S vermittelt wird [143]. Zwei Proline an Position 66 und 67 liegen direkt neben dem Cys 65. Eine Mutation zu Serin könnte somit eventuell ein potentiell Interaktionsmotiv beeinträchtigen. Interessanterweise konnte eine S-Mutante (R169P), die nicht mehr zur Sekretion von SVP fähig war, auch keine Sekretion von CypA induzieren aber weiterhin mit CypA interagieren [98]. Auch für das HIV-1 Gag-Protein, das HCV-NS5B-Protein und das M1-Protein des Influenza-A-Virus konnte eine Assoziation mit CypA gezeigt werden und unterstreicht damit die wichtige Rolle dieser Interaktion [201]. Auch für das HBV-L-Protein konnten Interaktionen mit zellulären Faktoren gezeigt werden, so z. B. mit den Chaperonen Hsc70 und BiP [143]. Für eine Beteiligung des Cys 65 oder weiterer angrenzender AS an Interaktionen mit zellulären Faktoren würde auch die Lokalisation des Cys 65 in der zytoplasmatischen Schleife sprechen. Um neue Interaktionspartner von S bzw. Interaktionsmotive zu identifizieren, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

5.2.3 Partikelbildung ausgewählter S-Mutanten

Hinsichtlich der HBV und HDV-Partikelbildung wurden ausgesuchte S-Mutanten untersucht. Es ist bekannt, dass S sowohl der Hauptbestandteil von HBV-SVP als auch der Hülle von HBV-Virionen HDV-Partikeln ist [47, 202].

5.2.3.1 Bildung subviraler HBV-Partikel

Zunächst wurden alle Mutanten hinsichtlich ihrer intrazellulären Expression und der Bildung von SVP analysiert. Dafür wurden HA-getaggte und nicht YFP/BFP-getaggte Varianten benutzt, um den blockierenden Einfluss von YFP/BFP auf die Sekretion zu eliminieren. Der HA-Tag wurde eingeführt, um Mutanten detektieren zu können, die Mutationen im Hauptepitop von S trugen. Damit waren alle Mutanten mit demselben Antikörper detektierbar und die Expressions- und Sekretionslevel vergleichbar. Es ist bekannt, dass die Mutation der acht Cysteine in der luminalen Schleife 1 zur Verhinderung der Sekretion von S in verschiedenen Genotypen führt. Die Sekretion konnte im Hintergrund des M-Proteins jedoch wiederhergestellt werden [118–120]. Auch in der vorliegenden Arbeit war die S-CS-Mutante nicht in der Lage, SVP zu sekretieren, wurde allerdings ähnlich stark wie das WT-S exprimiert. Aus diesem Grund wurden alle anderen Mutanten nicht im S-CS, sondern im S-Hintergrund getestet. Es zeigte sich in Übereinstimmung mit früheren Mutationsanalysen, dass die Punktmutanten C48S, C65S, C69S und C76S auf WT-Niveau exprimiert wurden, aber nicht mehr in der Lage waren, SVP zu sekretieren. Für die Mutanten S-CS, C48S, C69S und C76S konnten FRET-Werte ähnlich der des WT gemessen werden, in der Crosslinking Analyse zeigte sich jedoch, dass hier nur maximal Tetramere aber keine höheren Oligomere detektiert werden konnten. Dies lässt den Schluss zu, dass für die Sekretion von S die Knospung von Tetrameren in zelluläre Membranen nicht ausreichend, sondern die kovalente Verbindung von S zu höheren Oligomeren essentiell ist. Für die C65S-Mutante konnten in Crosslinking-Analysen nur schwache Banden auf Höhe von S-Dimeren detektiert werden, was mit der FRET-Analyse korreliert.

Es ist ebenso bereits bekannt, dass die Substitution der TM1 oder TM2 durch homologe Sequenzen des DHBV oder durch fremde Typ-I (der β -Lactamase) bzw. Typ-II-Signale (des HTR) hinsichtlich der SVP-Bildung nicht toleriert wurden [155]. Die Substitution der TM1 durch die TM des HIV-1 gp41 oder der TMs der HCV-Proteine E1/2 führte jedoch weiterhin zur Sekretion von SVP [203]. Die S-beta-Mutante in dieser Arbeit bestätigte die früheren Ergebnisse von Siegler & Bruss [155]. Auch die S-TM2polyA-Mutante war nicht mehr in der Lage, SVP zu bilden. Überraschenderweise wurde die S-TM1polyA-Mutante weiterhin sekretiert. Dies würde bedeuten, dass die zwei N- und C-terminal flankierenden WT-AS der TM1 zusammen mit der PolyA-Sequenz ausreichend sind, um die Funktion der TM1 aufrecht zu erhalten. Im Gegensatz zur TM2 scheint damit die komplette Sequenz der TM1 weder für die SVP-Bildung noch für die Interaktion von S essentiell zu sein. Vielmehr spielt die TM1 bei der Infektion und hier bei der Interaktion mit zellulären Rezeptoren eine essentielle Rolle [126]. Die TM2 hingegen ist an der Oligomerisierung von S beteiligt und ist auch für die SVP-Bildung essentiell. Erwartungsgemäß wurden auch die doppelten Substitutionsmutanten nicht mehr sekretiert, da ihnen das WT-TM2-Signal fehlte.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Lokalisations- und Interaktionsstudien führte auch eine zunehmende Deletion C-terminaler Bereiche zu einer schwächeren Expression von S. C-terminale Deletionen ab AS 153 und auch alle Δ 100-Mutanten wurden nicht mehr sekretiert. Nur die Δ 178-Mutante war noch in der Lage, SVP zu bilden und zu sekretieren. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Jenna & Sureau [176], die zeigen konnten, dass Deletionen ab AS 162 zu einer stark verminderten Expression von S und einem totalen Verlust der Sekretionsfähigkeit von S führten. Übereinstimmend war hingegen jedoch die Tatsache,

dass die sekretieren SVP hauptsächlich in unglykosylierter Form vorlagen, obwohl die Glykosylierungsstelle am Asn 146 liegt. Durch den fehlenden C-Terminus kam es vermutlich zu einer veränderten Proteinfaltung, die nicht mehr kompatibel mit der Glykosylierung von S war. Da die Glykosylierung jedoch nicht essentiell für die Sekretion von SVP ist, wurden folglich hauptsächlich unglykosyliertes S-Protein im Zellkulturmedium detektiert.

5.2.3.2 HBV-Virusproduktion

Für die Bildung und Ausschleusung infektiöser Virionen benötigt das HBV, im Gegensatz zur Bildung von SVP, die zelluläre ESCRT-Maschinerie. Es konnte gezeigt werden, dass L mit γ 2-Adaptin und Core mit Nedd4 interagiert. Der L/ γ 2-Adaptin/Core/Nedd4-Komplex rekrutiert dann vermutlich den ESCRT-II/III-Komplex und Vps4, die zusammen die intraluminale Knospung in MVB und die Umhüllung von Virionen initiieren [140–142, 204]. Obwohl die Interaktion mit γ 2-Adaptin nicht über die S, sondern über die präS1-Domäne des L-Proteins vermittelt wird [138] und keine Interaktionen von S mit ESCRT-Proteinen bekannt sind, wurde die Rolle ausgewählter S-Mutanten bei der Virusmorphogenese untersucht, da S Hauptbestandteil der viralen Hülle und essentiell für Bildung von Virionen ist. Sowohl die C65S als auch die Δ 178-Mutante waren nicht mehr in der Lage Virionen zu sekretieren. Erwähnt werden muss hierbei, dass die Mutation bzw. die Deletion aufgrund der verwendeten Plasmide in alle drei Hüllproteine S, M und L eingebracht wurde. Da die C65S-Mutante auch nicht in der Lage war, SVP zu bilden, muss zusammen mit dem hier vorliegenden Ergebnis angenommen werden, dass eine Mutation des Cys 65 essentiell für sowohl für die SVP als auch die HBV-Virionen-Bildung ist. Ob, wie in Kapitel 5.2.2 diskutiert, fehlende posttranslationale Modifikationen, die Verhinderung intramolekularer Disulfidbrücken oder die Inhibition von Interaktionen mit zellulären Faktoren dafür verantwortlich sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Interessanterweise war auch die Δ 178-Mutante nicht mehr in der Lage, Virionen zu bilden, obwohl diese weiterhin SVP sekretieren konnte. Möglicherweise ist der fehlende C-Terminus wichtig für die Ausbildung der I-präS-Konformation von L, die für die Interaktion mit γ 2-Adaptin essentiell ist [138]. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Mechanismus aufzuklären.

5.2.3.3 HDV-Partikelbildung

HDV als Virusoid benötigt für seine Umhüllung die HBV-Hüllproteine. Dabei ist die Interaktion des LDAg mit Trp 196, 199 oder 201 von S essentiell [176, 177]. Aus diesem Grund wurde die Δ 178-Mutante als Negativkontrolle in diesem Assay verwendet. Wie zu erwarten, konnte diese Mutante das LDAg nicht mehr umhüllen und wurde nur als SVP in das Zellkulturmedium abgegeben. Die TM1polyA-Mutante hingegen war in der Lage, HDV-VLP zu bilden und zu sekretieren. Dies steht im Einklang mit vorangegangenen Ergebnissen und bestätigt die nicht essentielle Rolle der TM1 bei der Reifung und Ausschleusung von S. Das Ergebnis der C65S-Mutante bestätigt ebenso die vorangegangenen Ergebnisse. Die C65S-Mutation verhindert die Bildung von HDV-VLP ebenso wie die Sekretion von SVP und HBV-Virionen, obwohl alle drei Partikelformen unterschiedliche zelluläre Sekretionswege nutzen.

5.3 Ausblick

Die Ergebnisse der Interaktionsstudien sollten durch Koimmunpräzipitations-(CoIP)-Experimente bestätigt werden. Dazu müsste ein CoIP-Protokoll für Transmembranproteine etabliert werden. Des Weiteren könnte in bestimmten Bereichen von S, wie z. B. der TM2 oder dem C-Terminus über das Einbringen von Punktmutationen versucht werden, mögliche Interaktionsmotive einzugrenzen oder die für die Oligomerisierung essentiellen AS zu identifizieren.

Eine Analyse von S mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie kann Aufschluss über mögliche, bislang nicht entdeckte posttranslationale Modifikationen von S oder über Wechselwirkungen zwischen S-Proteinen geben.

Ferner könnte mit Hilfe einer Hepatozyten-spezifischen YFP/BFP-cDNA-Bank ein FACS-basiertes High-Throughput-Screening entwickelt werden, um mit Hilfe des YFP/BFP-Fusionsproteins neue zelluläre Interaktionspartner von S zu identifizieren. Mit Hilfe der bereits vorhandenen Mutanten wäre es so auch möglich, Interaktionsmotive für neue oder bereits bekannte zelluläre Faktoren wie LC3 oder CypA einzugrenzen. Diese Motive stellen Angriffspunkte für Inhibitoren der HBV/HDV-Morphogenese dar, da S, wie gezeigt, essentiell für die HDV/HBV-Partikelmorphogenese ist.

Literatur

1. Blumberg, B. S. *et al.* A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* **66**, 924–31 (Mai 1967).
2. Summers, J. *et al.* Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4597–601 (Nov. 1975).
3. Mason, W. S. *et al.* Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**, 829–36 (Dez. 1980).
4. Okamoto, H. *et al.* Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* **69** (Pt 10), 2575–83 (Okt. 1988).
5. Norder, H. *et al.* Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* **47**, 289–309 (2004).
6. Gerlich, W. H. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Viol J* **10**, 239 (2013).
7. WHO. *Hepatitis B* (Hrsg. WHO) zuletzt besucht: 2015-02-17. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>> (2015).
8. Ganem, D. & Prince, A. M. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* **350**, 1118–29 (März 2004).
9. Rehermann, B. & Nascimbeni, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**, 215–29 (2005).
10. Bauer, T. *et al.* Immune control of hepatitis B virus. *Dig Dis* **29**, 423–33 (2011).
11. Dandri, M. & Locarnini, S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* **61**, 6–17 (Mai 2012).
12. Lucifora, J. *et al.* Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* **343**, 1221–8 (März 2014).
13. Valenzuela, P. *et al.* Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**, 347–50 (Juli 1982).
14. McAleer, W. J. *et al.* Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**, 178–80 (Jan. 1984).
15. Komatsu, H. Hepatitis B virus: where do we stand and what is the next step for eradication? *World J Gastroenterol* **20**, 8998–9016 (Juli 2014).
16. Colombo, M. *et al.* Long-term delta superinfection in hepatitis B surface antigen carriers and its relationship to the course of chronic hepatitis. *Gastroenterology* **85**, 235–9 (Aug. 1983).
17. Farci, P. *et al.* Delta hepatitis in inapparent carriers of hepatitis B surface antigen. A disease simulating acute hepatitis B progressive to chronicity. *Gastroenterology* **85**, 669–73 (Sep. 1983).
18. Rizzetto, M. *et al.* Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of the delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Intern Med* **98**, 437–41 (Apr. 1983).

19. Fattovich, G. *et al.* Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *J Infect Dis* **155**, 931–5 (Mai 1987).
20. Fattovich, G. *et al.* Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* **46**, 420–6 (März 2000).
21. Hughes, S. A. *et al.* Hepatitis delta virus. *Lancet* **378**, 73–85 (Juli 2011).
22. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife* **1** (2012).
23. Xia, Y. P. *et al.* Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *J Virol* **66**, 914–21 (Feb. 1992).
24. Yamaguchi, Y. *et al.* Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science* **293**, 124–7 (Juli 2001).
25. Lai, M. M. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus. *J Virol* **79**, 7951–8 (Juli 2005).
26. Taylor, J. M. Hepatitis delta virus. *Virology* **344**, 71–6 (Jan. 2006).
27. Taylor, J. M. Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **307**, 1–23 (2006).
28. Kos, A. *et al.* The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA. *Nature* **323**, 558–60 (Okt. 1986).
29. Wang, K. S. *et al.* Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* **323**, 508–14 (Okt. 1986).
30. Weiner, A. J. *et al.* A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. *J Virol* **62**, 594–9 (Feb. 1988).
31. Jayan, G. C. & Casey, J. L. Inhibition of hepatitis delta virus RNA editing by short inhibitory RNA-mediated knockdown of ADAR1 but not ADAR2 expression. *J Virol* **76**, 12399–404 (Dez. 2002).
32. Glenn, J. S. *et al.* Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science* **256**, 1331–3 (Mai 1992).
33. Chang, M. F. *et al.* Mutational analysis of delta antigen: effect on assembly and replication of hepatitis delta virus. *J Virol* **68**, 646–53 (Feb. 1994).
34. Li, Y. J. *et al.* Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *J Virol* **78**, 13325–34 (Dez. 2004).
35. Chen, Y. S. *et al.* ERK1/2-mediated phosphorylation of small hepatitis delta antigen at serine 177 enhances hepatitis delta virus antigenomic RNA replication. *J Virol* **82**, 9345–58 (Okt. 2008).
36. Hong, S. Y. & Chen, P. J. Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *J Virol* **84**, 1430–8 (Feb. 2010).
37. Tseng, C. H. *et al.* Modification of small hepatitis delta virus antigen by SUMO protein. *J Virol* **84**, 918–27 (Jan. 2010).

38. Gudima, S. *et al.* Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol* **76**, 3709–19 (Apr. 2002).
39. Wang, C. J. *et al.* Small-form hepatitis B surface antigen is sufficient to help in the assembly of hepatitis delta virus-like particles. *J Virol* **65**, 6630–6 (Dez. 1991).
40. Sureau, C. The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol* **307**, 113–31 (2006).
41. Huang, C. *et al.* Large hepatitis delta antigen is a novel clathrin adaptor-like protein. *J Virol* **81**, 5985–94 (Juni 2007).
42. Dane, D. S. *et al.* Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**, 695–8 (Apr. 1970).
43. Kaplan, P. M. *et al.* DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* **12**, 995–1005 (Nov. 1973).
44. Zhou, S. & Standring, D. N. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10046–50 (Nov. 1992).
45. Crowther, R. A. *et al.* Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**, 943–50 (Juni 1994).
46. Roseman, A. M. *et al.* A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15821–6 (Nov. 2005).
47. Bruss, V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* **13**, 65–73 (Jan. 2007).
48. Glebe, D. & Urban, S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* **13**, 22–38 (Jan. 2007).
49. Hruska, J. F. *et al.* Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* **21**, 666–72 (Feb. 1977).
50. Landers, T. A. *et al.* Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol* **23**, 368–76 (Aug. 1977).
51. Sattler, F. & Robinson, W. S. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* **32**, 226–33 (Okt. 1979).
52. Wang, G. H. & Seeger, C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* **71**, 663–70 (Nov. 1992).
53. Dejean, A. *et al.* Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5350–4 (Sep. 1984).
54. Beck, J. & Nassal, M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**, 48–64 (Jan. 2007).
55. Will, H. *et al.* Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* **61**, 904–11 (März 1987).
56. Summers, J. & Mason, W. S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**, 403–15 (Juni 1982).
57. Bartenschlager, R. & Schaller, H. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *Embo j* **7**, 4185–92 (Dez. 1988).

58. Pollack, J. R. & Ganem, D. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J Virol* **68**, 5579–87 (Sep. 1994).
59. Zoulim, F. & Seeger, C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol* **68**, 6–13 (Jan. 1994).
60. Bartenschlager, R. *et al.* The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol* **64**, 5324–32 (Nov. 1990).
61. Hirsch, R. C. *et al.* Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* **344**, 552–5 (Apr. 1990).
62. Bartenschlager, R. & Schaller, H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *Embo j* **11**, 3413–20 (Sep. 1992).
63. Tavis, J. E. *et al.* Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer. *J Virol* **68**, 3536–43 (Juni 1994).
64. Nassal, M. & Rieger, A. A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first-strand DNA synthesis. *J Virol* **70**, 2764–73 (Mai 1996).
65. Radziwill, G. *et al.* Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* **64**, 613–20 (Feb. 1990).
66. Lien, J. M. *et al.* Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* **57**, 229–36 (Jan. 1986).
67. Staprans, S. *et al.* Mutations affecting hepadnavirus plus-strand DNA synthesis dissociate primer cleavage from translocation and reveal the origin of linear viral DNA. *J Virol* **65**, 1255–62 (März 1991).
68. Bavand, M. *et al.* The hepatitis B virus-associated reverse transcriptase is encoded by the viral pol gene. *J Virol* **63**, 1019–21 (Feb. 1989).
69. Kock, J. *et al.* Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology* **38**, 1410–8 (Dez. 2003).
70. Weber, M. *et al.* Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol* **68**, 2994–9 (Mai 1994).
71. Gallina, A. *et al.* 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**, 4645–52 (Nov. 1989).
72. Nassal, M. *et al.* Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. *J Mol Biol* **225**, 1013–25 (Juni 1992).
73. Zheng, J. *et al.* The structure of hepadnaviral core antigens. Identification of free thiols and determination of the disulfide bonding pattern. *J Biol Chem* **267**, 9422–9 (Mai 1992).
74. Hatton, T. *et al.* RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* **66**, 5232–41 (Sep. 1992).
75. Nassal, M. 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**, 4107–16 (Juli 1992).

76. Tan, Z. *et al.* The interface between HBV capsid proteins affects self-assembly, pgRNA packaging, and reverse transcription. *J Virol* (Jan. 2015).
77. Ou, J. H. *et al.* 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 U S A* **83**, 1578–82 (März 1986).
78. Bruss, V. & Gerlich, W. H. Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* **163**, 268–75 (Apr. 1988).
79. Chang, C. *et al.* Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. *J Virol* **61**, 3322–5 (Okt. 1987).
80. Chen, M. T. *et al.* A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14913–8 (Okt. 2004).
81. Liaw, Y. F. HBeAg seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* **3**, 425–33 (Sep. 2009).
82. Lucifora, J. *et al.* Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatology* **55**, 996–1003 (Nov. 2011).
83. Andrisani, O. M. Dereglulation of epigenetic mechanisms by the hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis. *Viruses* **5**, 858–72 (März 2013).
84. Tian, Y. *et al.* Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol Cell Biol* **33**, 2810–6 (Aug. 2013).
85. Heermann, K. H. *et al.* Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* **52**, 396–402 (Nov. 1984).
86. Cattaneo, R. *et al.* Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* **305**, 336–8 (Sep. 1983).
87. Sheu, S. Y. & Lo, S. J. Preferential ribosomal scanning is involved in the differential synthesis of the hepatitis B viral surface antigens from subgenomic transcripts. *Virology* **188**, 353–7 (Mai 1992).
88. Stibbe, W. & Gerlich, W. H. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol* **46**, 626–8 (Mai 1983).
89. Schmitt, S. *et al.* Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol* **85**, 2045–53 (Juli 2004).
90. Prange, R. & Streeck, R. E. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *Embo j* **14**, 247–56 (Jan. 1995).
91. Eble, B. E. *et al.* Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* **6**, 1454–63 (Mai 1986).
92. Eble, B. E. *et al.* Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**, 3591–601 (Okt. 1987).
93. Stirk, H. J. *et al.* A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* **33**, 148–58 (1992).
94. Gavilanes, F. *et al.* Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem* **257**, 7770–7 (Juli 1982).

95. Peterson, D. L. *et al.* Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J Biol Chem* **257**, 10414–20 (Sep. 1982).
96. Huovila, A. P. *et al.* Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* **118**, 1305–20 (Sep. 1992).
97. Zhao, C. *et al.* Proteomic analysis of hepatitis B surface antigen positive transgenic mouse liver and decrease of cyclophilin A. *J Med Virol* **79**, 1478–84 (Okt. 2007).
98. Tian, X. *et al.* Hepatitis B virus (HBV) surface antigen interacts with and promotes cyclophilin a secretion: possible link to pathogenesis of HBV infection. *J Virol* **84**, 3373–81 (Apr. 2010).
99. Li, J. *et al.* Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J Virol* **85**, 6319–33 (Juli 2011).
100. Eble, B. E. *et al.* The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* **64**, 1414–9 (März 1990).
101. Liu, Y. *et al.* The role of the downstream signal sequences in the maturation of the HBV middle surface glycoprotein: development of a novel therapeutic vaccine candidate. *Virology* **365**, 10–9 (Aug. 2007).
102. Bruss, V. & Ganem, D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1059–63 (Feb. 1991).
103. Fernholz, D. *et al.* Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. *J Hepatol* **13 Suppl 4**, S102–4 (1991).
104. Bruss, V. *et al.* Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *Embo j* **13**, 2273–9 (Mai 1994).
105. Ostapchuk, P. *et al.* A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *Embo j* **13**, 1048–57 (März 1994).
106. Grgacic, E. V. *et al.* Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation. *J Virol* **74**, 2455–8 (März 2000).
107. Lambert, C. & Prange, R. Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem* **276**, 22265–72 (Juni 2001).
108. Lambert, C. *et al.* Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins. *J Gen Virol* **85**, 1221–5 (Mai 2004).
109. Persing, D. H. *et al.* The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol* **61**, 1672–7 (Mai 1987).
110. Prange, R. *et al.* Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol* **65**, 3919–23 (Juli 1991).
111. Bruss, V. & Vieluf, K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* **69**, 6652–7 (Nov. 1995).
112. Gripon, P. *et al.* Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* **213**, 292–9 (Nov. 1995).
113. Bruss, V. *et al.* Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* **218**, 396–9 (Apr. 1996).

114. Le Seyec, J. *et al.* Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* **73**, 2052–7 (März 1999).
115. Chouteau, P. *et al.* A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol* **75**, 11565–72 (Dez. 2001).
116. Blanchet, M. & Sureau, C. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J Virol* **81**, 5841–9 (Juni 2007).
117. Le Duff, Y. *et al.* The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *J Virol* **83**, 12443–51 (Dez. 2009).
118. Mangold, C. M. & Streeck, R. E. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol* **67**, 4588–97 (Aug. 1993).
119. Mangold, C. M. *et al.* Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. *Virology* **211**, 535–43 (Aug. 1995).
120. Wunderlich, G. & Bruss, V. Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch Virol* **141**, 1191–205 (1996).
121. Schulze, A. *et al.* Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* **46**, 1759–68 (Dez. 2007).
122. Huang, H. C. *et al.* Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol* **86**, 9443–53 (Sep. 2012).
123. Macrae, D. R. *et al.* Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology* **181**, 359–63 (März 1991).
124. Glebe, D. *et al.* Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* **129**, 234–45 (Juli 2005).
125. Blanchet, M. & Sureau, C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* **80**, 11935–45 (Dez. 2006).
126. Lepere-Douard, C. *et al.* The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J Virol* **83**, 11819–29 (Nov. 2009).
127. Eckhardt, S. G. *et al.* Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol* **65**, 575–82 (Feb. 1991).
128. Kann, M. *et al.* Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **145**, 45–55 (Apr. 1999).
129. Bock, C. T. *et al.* Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* **8**, 215–29 (Juli 1994).
130. Newbold, J. E. *et al.* The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* **69**, 3350–7 (Juni 1995).
131. Brechot, C. *et al.* Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* **286**, 533–5 (Juli 1980).

132. Hai, H. *et al.* Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* **20**, 6236–43 (Mai 2014).
133. Zoulim, F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol* **42**, 302–8 (März 2005).
134. Gerelsaikhan, T. *et al.* Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* **70**, 4269–74 (Juli 1996).
135. Bruss, V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* **71**, 9350–7 (Dez. 1997).
136. Löffler-Mary, H. *et al.* Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* **270**, 358–67 (Mai 2000).
137. Ponsel, D. & Bruss, V. Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol* **77**, 416–22 (Jan. 2003).
138. Hartmann-Stuhler, C. & Prange, R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* **75**, 5343–51 (Juni 2001).
139. Rost, M. *et al.* Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J Biol Chem* **281**, 29297–308 (Sep. 2006).
140. Kian Chua, P. *et al.* Potent inhibition of human Hepatitis B virus replication by a host factor Vps4. *Virology* **354**, 1–6 (Okt. 2006).
141. Lambert, C. *et al.* Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* **81**, 9050–60 (Sep. 2007).
142. Watanabe, T. *et al.* Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10205–10 (Juni 2007).
143. Prange, R. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med Microbiol Immunol* **201**, 449–61 (Nov. 2012).
144. Patzer, E. J. *et al.* Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **58**, 884–92 (Juni 1986).
145. Urban, S. *et al.* The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol* **52**, 282–4 (Feb. 2010).
146. Aggerbeck, L. P. & Peterson, D. L. Electron microscopic and solution X-ray scattering observations on the structure of hepatitis B surface antigen. *Virology* **141**, 155–61 (Feb. 1985).
147. Ganem, D. & Varmus, H. E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* **56**, 651–93 (1987).
148. Peterson, D. L. The structure of hepatitis B surface antigen and its antigenic sites. *Bioessays* **6**, 258–62 (Juni 1987).
149. Vanlandschoot, P. *et al.* Hepatitis B virus surface antigen suppresses the activation of monocytes through interaction with a serum protein and a monocyte-specific receptor. *J Gen Virol* **83**, 1281–9 (Juni 2002).
150. Chen, Y. *et al.* Impaired function of hepatic natural killer cells from murine chronic HBsAg carriers. *Int Immunopharmacol* **5**, 1839–52 (Dez. 2005).

151. Op den Brouw, M. L. *et al.* Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology* **126**, 280–9 (Feb. 2009).
152. Novellino, L. *et al.* Circulating hepatitis B surface antigen particles carry hepatocellular microRNAs. *PLoS One* **7**, e31952 (2012).
153. Kondo, Y. *et al.* Hepatitis B surface antigen could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *ISRN Gastroenterol* **2013**, 935295 (2013).
154. Gilbert, R. J. *et al.* Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14783–8 (Okt. 2005).
155. Siegler, V. D. & Bruss, V. Role of transmembrane domains of the hepatitis B virus small surface proteins in subviral particle biogenesis. *J Virol* (Nov. 2012).
156. Roingard, P. & Sureau, C. Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. *Hepatology* **28**, 1128–33 (Okt. 1998).
157. Patient, R. *et al.* Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* **81**, 3842–51 (Apr. 2007).
158. Patient, R. *et al.* Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol* **11**, 1561–70 (Nov. 2009).
159. Patzer, E. J. *et al.* Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J Virol* **51**, 346–53 (Aug. 1984).
160. Nakabayashi, H. *et al.* Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**, 3858–63 (Sep. 1982).
161. Patra, M. *Construction and characterization of an RFP-labeled envelope protein of HBV.* Master Thesis (TUM, HMGU, Sep. 2010).
162. Gerhardt, E. & Bruss, V. Phenotypic mixing of rodent but not avian hepadnavirus surface proteins into human hepatitis B virus particles. *eng. J Virol* **69**, 1201–1208 (Feb. 1995).
163. Banning, C. *et al.* A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS One* **5**, e9344 (2010).
164. Hagen, N. *et al.* The intraviral protein interaction network of hepatitis C virus. *eng. Mol Cell Proteomics* **13**, 1676–1689 (Juli 2014).
165. McClelland, A. *et al.* The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* **39**, 267–74 (Dez. 1984).
166. Schittl, B. & Bruss, V. Mutational profiling of the variability of individual amino acid positions in the hepatitis B virus matrix domain. *eng. Virology* **458-459**, 183–189 (Juni 2014).
167. Valenzuela, P. *et al.* The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. *Fields, R. Jaenisch, and C. F. Fox (ed.), Animal virus genetics. Academic Press, Inc., New York.* 57–70 (1980).
168. Ren, J. *et al.* DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *eng. Cell Res* **19**, 271–273 (Feb. 2009).
169. Beitz, E. TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics* **16**, 135–139 (Feb. 2000).

170. Shih, K. N. & Lo, S. J. The HDV large-delta antigen fused with GFP remains functional and provides for studying its dynamic distribution. *Virology* **285**, 138–52 (Juni 2001).
171. Chang, M. F. *et al.* Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA-binding activity. *J Virol* **62**, 2403–10 (Juli 1988).
172. Alves, C. *et al.* Characterization of the nuclear localization signal of the hepatitis delta virus antigen. *Virology* **370**, 12–21 (Jan. 2008).
173. Gurezka, R. & Langosch, D. In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT. *J Biol Chem* **276**, 45580–7 (Dez. 2001).
174. Koshland, D. *et al.* Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of beta-lactamase in *Salmonella typhimurium*. *eng. Cell* **30**, 903–914 (Okt. 1982).
175. Hwang, S. B. & Lai, M. M. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J Virol* **67**, 7659–62 (Dez. 1993).
176. Jenna, S. & Sureau, C. Mutations in the carboxyl-terminal domain of the small hepatitis B virus envelope protein impair the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol* **73**, 3351–8 (Apr. 1999).
177. Komla-Soukha, I. & Sureau, C. A tryptophan-rich motif in the carboxyl terminus of the small envelope protein of hepatitis B virus is central to the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol* **80**, 4648–55 (Mai 2006).
178. Griffin, B. A. *et al.* Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *eng. Science* **281**, 269–272 (Juli 1998).
179. Beer, M. *Untersuchung der Biogenese von subviralen 20 nm Hepatitis B Virus (HBV) Partikeln mittels eines fluoreszenzmarkierten HBV Oberflaechenproteins* Magisterarb. (TUM, 2009).
180. Bruss, V. & Ganem, D. Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* **65**, 3813–20 (Juli 1991).
181. Prange, R. *et al.* Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol* **66**, 5832–41 (Okt. 1992).
182. Jenna, S. & Sureau, C. Effect of mutations in the small envelope protein of hepatitis B virus on assembly and secretion of hepatitis delta virus. *Virology* **251**, 176–86 (Nov. 1998).
183. Mattoon, D. *et al.* Identification of the transmembrane dimer interface of the bovine papillomavirus E5 protein. *eng. Oncogene* **20**, 3824–3834 (Juni 2001).
184. Schnell, J. R. & Chou, J. J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *eng. Nature* **451**, 591–595 (Jan. 2008).
185. Unterreitmeier, S. *et al.* Phenylalanine promotes interaction of transmembrane domains via GxxxG motifs. *J Mol Biol* **374**, 705–18 (Nov. 2007).
186. Lu, J.-X. *et al.* Oligomerization state and supramolecular structure of the HIV-1 Vpu protein transmembrane segment in phospholipid bilayers. *eng. Protein Sci* **19**, 1877–1896 (Okt. 2010).
187. Op De Beeck, A. *et al.* The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *eng. J Biol Chem* **275**, 31428–31437 (Okt. 2000).

188. Lemmon, M. A. *et al.* Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *eng. J Biol Chem* **267**, 7683–7689 (Apr. 1992).
189. Cosson, P. & Bonifacino, J. S. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *eng. Science* **258**, 659–662 (Okt. 1992).
190. Maded, A. *et al.* Role of human sec63 in modulating the steady-state levels of multi-spanning membrane proteins. *PLoS One* **7**, e49243 (2012).
191. Schnell, D. J. & Hebert, D. N. Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *eng. Cell* **112**, 491–505 (Feb. 2003).
192. Langosch, D. & Arkin, I. T. Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices. *eng. Protein Sci* **18**, 1343–1358 (Juli 2009).
193. Gurezka, R. *et al.* A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem* **274**, 9265–70 (Apr. 1999).
194. Meissner, C. S. *et al.* A leucine zipper motif of a tegument protein triggers final envelopment of human cytomegalovirus. *J Virol* **86**, 3370–82 (März 2012).
195. McGinnes, L. *et al.* Mutations in the transmembrane domain of the HN protein of Newcastle disease virus affect the structure and activity of the protein. *eng. Virology* **196**, 101–110 (Sep. 1993).
196. I., W. & M., B. *Fluoreszierende Proteine als Werkzeuge in der Mikrobiologie* zuletzt besucht: 2015-06-19. <http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=1021659> (2015).
197. Prinz, W. A. & Hinshaw, J. E. Membrane-bending proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**, 278–291 (2009).
198. Aberle, D. *et al.* Structure of the membrane anchor of pestivirus glycoprotein E(rns), a long tilted amphipathic helix. *PLoS Pathog* **10** (Feb. 2014).
199. Ito, K. *et al.* Impairment of hepatitis B virus virion secretion by single-amino-acid substitutions in the small envelope protein and rescue by a novel glycosylation site. *J Virol* **84**, 12850–61 (Dez. 2010).
200. Curdt, S. *Untersuchung zur transmembrane Topologie des kleinen Hepatitis-B-Virus-Hüllproteins* Diss. (Universität Göttingen, 2005).
201. Zhou, D. *et al.* Cyclophilin A and viral infections. *Biochem Biophys Res Commun* **424**, 647–50 (Aug. 2012).
202. Bonino, F. *et al.* Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol* **58**, 945–50 (Juni 1986).
203. Berkower, I. *et al.* Hepatitis B virus surface antigen assembly function persists when entire transmembrane domains 1 and 3 are replaced by a heterologous transmembrane sequence. *J Virol* **85**, 2439–48 (März 2011).
204. Stieler, J. T. & Prange, R. Involvement of ESCRT-II in hepatitis B virus morphogenesis. *PLoS One* **9**, e91279 (2014).

Anhang

	B	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9	B-10	B-11
Y	1.2 (0.6)		1.0 (1.1)	1.0 (1.2)	0.8 (0.7)	0.6 (1.0)	2.6 (3)	1.5 (1.2)	0.5 (0.3)	0.8 (0.7)	2.0 (0.7)	4.2 (2.8)
Y-1			1.1 (0.9)	0.8 (1.1)	1.5 (1.0)	2.7 (1.2)	0.7 (0.4)	1.3 (0.8)	1.5 (1.2)	1.5 (1.0)	2.9 (1.0)	4.0 (3.3)
Y-2	1.0 (1.2)	0.8 (0.5)	34.8 (13.4)			9.7 (5.6)						
Y-3	0.2 (0.1)	0.5 (0.2)		26.2 (11.2)								
Y-4	0.2 (0.2)	0.3 (0.1)			3.6 (2.4)							
Y-5	0.9 (1.1)	0.4 (0.5)	4.6 (2.6)			44.8 (25.9)						
Y-6	0.4 (0.4)	1.2 (0.5)					93.4 (5.1)					
Y-7	0.8 (0.5)	0.5 (0.3)						92.4 (4.3)				
Y-8	2.2 (0.9)	1.0 (0.7)							85.4 (15.2)			
Y-9	0.2 (0.2)	0.3 (0.1)								77.9 (10.9)		
Y-10	1.1 (1.1)	2.5 (1.5)									71.9 (16.6)	
Y-11	0.2 (0.2)	2.4 (0.6)										62.2 (12.7)
Y-12	1.0 (0.0)	2.4 (0.6)										
Y-13	0.6 (0.4)	0.5 (0.0)										
Y-14	0.5 (0.5)	1.1 (1.0)										
Y-15	0.4 (0.6)	0.4 (0.3)										
Y-16	0.2 (0.3)	0.7 (0.4)										
Y-17	0.2 (0.2)	0.3 (0.3)										
Y-18	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)										
Y-19	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)										
Y-20	1.2 (0.7)	0.8 (0.3)										
Y-21	0.2 (0.2)	1.3 (0.8)										
Y-22	1.4 (0.3)	1.2 (0.5)										
Y-23	0.8 (0.7)	2.1 (1.3)										
Y-24	1.1 (0.5)	0.8 (0.5)					2.3 (1.5)					

	B-12	B-13	B-14	B-15	B-16	B-17	B-18	B-19	B-20	B-21	B-22	B-23
Y	5.6 (0.2)	3.2 (0.4)	4.0 (1.7)	0.4 (0.3)	0.0 (0.0)	4.4 (3.8)	0.0 (0.0)	4.7 (6.6)	3.1 (1.4)	1.3 (1.2)	2.1 (0.7)	0.0 (0.0)
Y-1	2.4 (.03)	2.5 (0.4)	5.3 (2.7)	1.5 (0.7)	0.5 (0.3)	5.0 (2.2)	0.0 (0.0)	5.3 (7.4)	2.5 (1.2)	1.2 (0.7)	1.8 (1.0)	0.4 (0.3)
Y-2												
Y-3												
Y-4												
Y-5												
Y-6												
Y-7												
Y-8												
Y-9												
Y-10												
Y-11												
Y-12	69.4 (23.8)											
Y-13		43.8 (15.1)										
Y-14			36.9 (6.3)									
Y-15				45.3 (14.8)								
Y-16					31.0 (12.7)							
Y-17						26.8 (10.1)						
Y-18							16.8 (9.3)					
Y-19								4.6 (4.7)				
Y-20									95.3 (2.8)			
Y-21										25.0 (5.9)		
Y-22											88.3 (2.9)	
Y-23												90.6 (3.5)
Y-24												

Abbildung 5.4: FRET-Werte aller Konstrukte und Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte der FRET-Werte (und Standardabweichungen) aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen (jeweils Duplikate). Y=YFP, B=BFP, 1=MEM, 2=TM2, 3=TM2-Leu84-98Ala, 4=TM2polyA, 5=HTR, 6=S, 7=S-CS, 8=S-CS-beta, 9=S-CS-TM2polyA, 10=S-CS-beta-TM2polyA, 11=S-CS-TM1polyA, 12=S-CS-TM1TM2polyA, 13=S-CS- δ 178, 14=S-CS- δ 153, 15=S- δ 100, 16=S-beta-TM2polyA- δ 100, 17=S-beta-C65S-TM2polyA- δ 100, 18=S-TM1TM2polyA- δ 100, 19=S-TM1polyA-C65S-TM2polyA- δ 100, 20=S-C48S-CS, 21=S-C65S-CS, 22=S-C69S-CS, 23=S-C76S-CS, 24=HCV-E2.

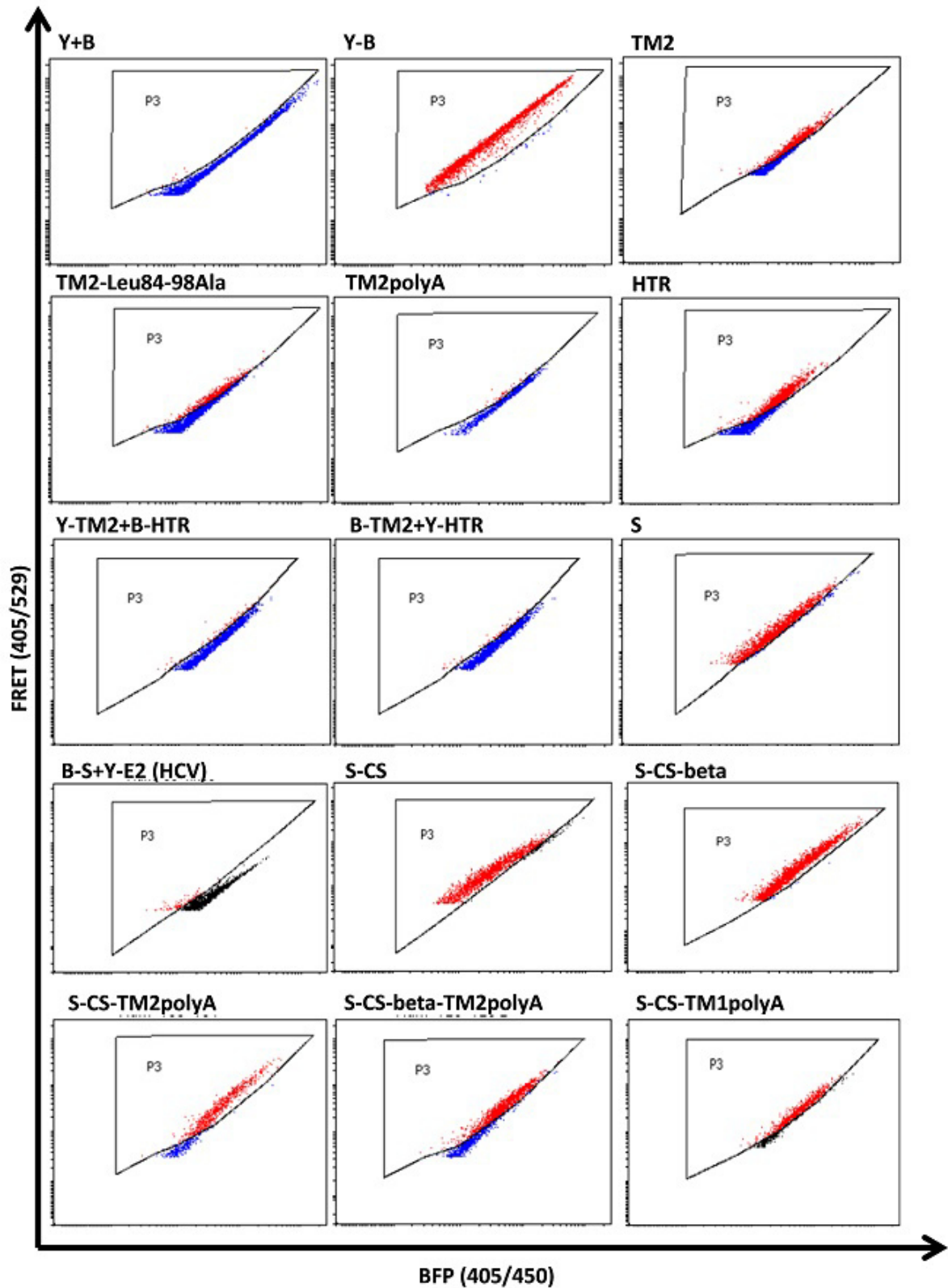


Abbildung 5.5: FACS-FRET-Primärdaten. Abgebildet ist die BFP (Anregungs-/Emissionswellenlänge: 405 nm/450 nm)/FRET (Anregungs-/Emissionswellenlänge: 405 nm/529 nm)-doppelt-positive Zellpopulation. Zellen innerhalb des P3-Gates sind FRET⁺ und in rot dargestellt.

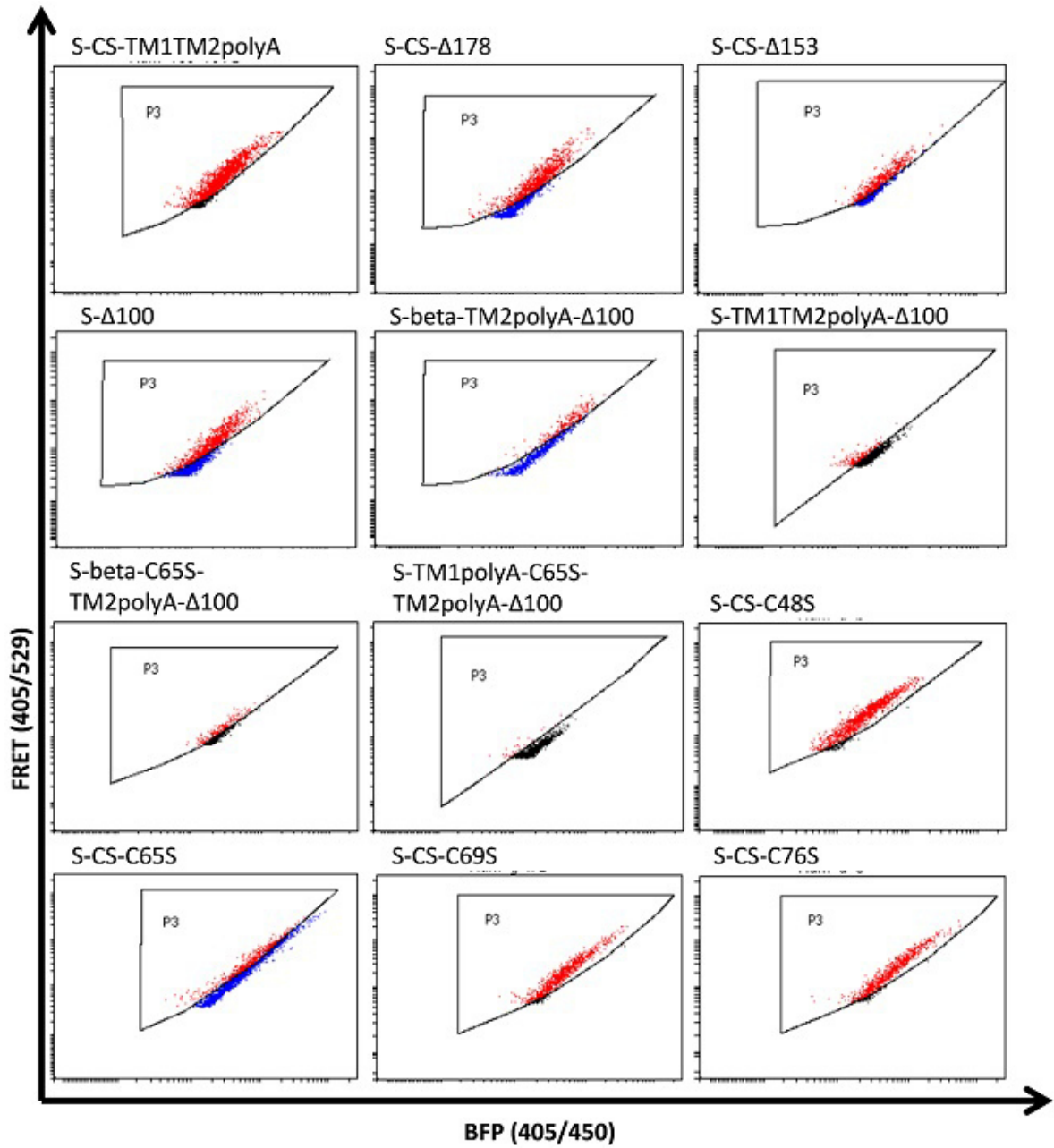


Abbildung 5.6: FACS-FRET-Primärdaten. Abgebildet ist die BFP (Anregungs-/Emissionswellenlänge: 405 nm/450 nm)/FRET (Anregungs-/Emissionswellenlänge: 405 nm/529 nm)-doppelt-positive Zellpopulation. Zellen innerhalb des P3-Gates sind FRET⁺ und in rot dargestellt.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Volker Bruß für die Ermöglichung dieses Projekts, die wissenschaftliche Betreuung sowie das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonders geschätzt habe ich die stets offene Tür zu seinem Büro, die immer konstruktive Kritik und die Freiheit mein Projekt eigenständig vorantreiben zu können.

Bei Frau Prof. Dr. Iris Antes möchte ich mich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und die Erstellung des Gutachtens bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch für die unkomplizierte Übernahme des Vorsitz der Prüfungskommission.

Der Leiterin des Instituts für Virologie Frau Prof. Dr. Ulrike Protzer danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel für diese Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Michael Schindler sowie Herrn Prof. Dr. Klaus Conzelmann für ihre Hilfestellung und die guten wissenschaftlichen Diskussionen.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Regina Geiger für die Hilfe bei allen administrativen Angelegenheiten sowie an alle Mitarbeiter des Instituts für Virologie für das tolle Arbeitsklima.

Meiner Familie und insbesondere Natalie und Markus danke ich für die tolle Unterstützung gerade in einer zwischenzeitlich sehr schwierigen Phase.