

Lehrstuhl II für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München

**Charakterisierung der Bedeutung einer Zellpermeabilität vermittelnden  
Region für den Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus  
und  
Etablierung von zellpermeablen Nukleokapsiden für den  
Protein und Gentransfer**

Lars Stöckl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
	2. apl. Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider
	Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 15. Mai 2002 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie  
am 27. Juni 2002 angenommen.

***Für Ramona***

# Inhaltsverzeichnis

<b>A Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1 Etablierung von zellpermeablen Nukleokapsiden.....	1
2 Generierung von rekombinanten, im TLM mutierten Viren.....	2
<b>B Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1 Das Hepatitis B-Virus .....	3
1.1 Der Aufbau der Virionen .....	4
1.2 Das HBV-Genom .....	5
1.3 Die Replikation der Hepadnaviren .....	6
1.4 Die virale Transkription .....	7
1.5 Die Viralen Proteine.....	8
1.5.1 Die virale Polymerase (HBpol).....	8
1.5.2 Das X Protein (HBx) .....	8
1.5.3 Die Oberflächenproteine (HBsAg) .....	9
1.5.3.1 Das kleine Oberflächenprotein SHBs.....	10
1.5.3.2 Das mittlere Oberflächenprotein MHBs .....	11
1.5.3.3 Das große Oberflächenprotein LHBs .....	12
1.5.3.4 Duale Topologie des LHBs.....	13
1.5.4 Das Nukleokapsidprotein und HBeAg .....	13
2 Zellpermeable Peptide und Proteine .....	16
2.1 Beispiele zellpermeabler Peptide und Proteine .....	16
2.2 Das Translokationsmotiv (TLM).....	17
3 Gentherapie.....	17
3.1 Viraler Gentransfer.....	18
3.2 Nicht-viraler Gentransfer .....	19
3.3 Virusähnliche Partikel (VLP).....	20
<b>C Aufgabenstellung</b> .....	<b>21</b>
1 Etablierung von zellpermeablen Hepatitis B Nukleokapsiden.....	21
2 Untersuchung der Rolle des TLM im Lebenszyklus des HBV .....	22

<b>D Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
1 Nukleokapside .....	24
1.1 Expression der Kapside in <i>E.coli</i> .....	25
1.1.1 Klonierung der eubakteriellen Expressionsplasmide .....	25
1.1.2 Expressionsanalyse .....	27
1.1.3 Die rekombinanten Core-Konstrukte assemblieren zu Kapsiden	29
1.1.4 Rekombinante Kapside sind zellpermeabel.....	32
1.1.4.1 Untersuchung der Zellpermeabilität von TLM-Core-Kapsiden an HepG2-Zellen.....	32
1.1.4.2 Untersuchung der Zellpermeabilität von TLM-Core-Kapsiden an dendritischen Zellen .....	35
1.1.5 Deassemblierung und Assemblierung von Kapsiden .....	37
1.1.5.1 Untersuchung des Deassemblierungs-/Reassemblierungs- Prozesses durch Gelfiltrationschromatographie .....	37
1.1.5.2 Untersuchung des Deassemblierungs/Reassemblierungs- Prozesses durch Elektronenmikroskopie.....	40
1.1.6 Verpackung von DNA in <i>E. coli</i> exprimierten Kapsiden.....	42
1.1.7 Inkubation von HepG2 Zellen mit Nukleokapsiden.....	45
1.2 Expression der Kapside in eukaryontischen Zellen.....	46
1.2.1 Klonierung der eukaryontischen Expressionskonstrukte.....	46
1.2.2 Expressionsanalyse .....	50
1.2.3 Kapside im Zellkulturüberstand .....	51
1.2.4 EPR nach „Triple“-Transfektion von Eukaryonten.....	53
2 TLM-defiziente Hepatitis B-Viren .....	55
2.1 Mutagenese des HBV-Genoms .....	55
2.1.1 Analyse der Hydrophathieabfolge .....	58
2.1.2 Strukturelle Berechnung der Oberflächenantigene .....	59
2.1.3 Subklonierung des mutierten Genoms pSPT1.2xHBV-TLM <sub>mut</sub> .....	60
2.1.4 Expressionsanalyse des mutierten HBV Genoms .....	62
2.1.5 Mikrosomenpräparation aus transfizierten HepG2-Zellen .....	64
2.1.6 Immunfluoreszenzmikroskopie von transfizierten HepG2-Zellen	66
2.1.7 Nachweis von reifen Viruspartikeln mittels EPR .....	66

<b>E Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>69</b>
1 Generierung von HBcAg-basierenden Nukleokapsiden.....	69
1.1 Expression und Reinigung von Hepatitis B Kapsiden in <i>E. coli</i> .....	70
1.1.1 Morphologie der TLM-Fusionsvarianten .....	72
1.1.2 DNA Verpackung .....	73
1.1.3 Inkubation von eukaryontischen Zellen mit TLM-Core-Kapsiden	75
1.2 Expression und Reinigung von Hepatitis B Kapsiden in Eukaryonten ..	77
1.2.1 Kapside im Überstand transfizierter Zellen.....	77
1.2.2 Endogene Polymerase Reaktion.....	78
1.2.3 Ausblick .....	79
2 Generierung von HBV-Viren, die innerhalb des TLM mutiert sind .....	81
2.1 Mutagenese.....	81
2.2 Expressionsmuster der mutierten Viren .....	82
2.3 Topologie der mutierten LHBS-Proteine .....	82
2.4 Infektionsmechanismus .....	84
2.5 Ausblick.....	85
<b>F Material.....</b>	<b>86</b>
1 Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	86
2 Enzyme.....	87
3 Antikörper .....	88
4 Materialien für die Zellkultur .....	88
5 Längenstandards .....	88
6 Radiochemikalien.....	89
7 Verwendete Kits.....	89
8 Plasmide .....	89
9 Synthetische Oligonukleotide.....	90
10 Geräte.....	92
11 Zelllinien und Bakterienstämme.....	93
<b>G Methoden.....</b>	<b>95</b>
1 Molekularbiologische Methoden.....	95
1.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	95

1.2	Auffüllen überstehender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase .....	95
1.3	Dephosphorylierung von DNA .....	96
1.4	Reinigung von DNA .....	96
1.5	DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen.....	96
1.6	DNA-Ligation .....	97
1.7	Entfernen von Nukleotidmonomeren über..... Gelfiltrationschromatographie .....	97
1.8	Fällung von Nukleinsäuren.....	97
1.9	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	98
1.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	99
1.11	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion.....	99
1.12	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	99
1.13	Ortsgerichtete Mutagenese.....	100
1.14	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	100
1.15	Sequenzierung von DNA .....	101
1.16	Restriktionsverdau von DNA .....	102
1.17	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> .....	102
2	Zellbiologische Methoden .....	103
2.1	Kultivierung und Passagieren von Zellen .....	103
2.1.1	Kultivierung und Passagieren von eukaryontischen Zellen .....	103
2.1.2	Kultivierung von dendritischen Zellen .....	104
2.2	Einfrieren und Auftauen von immortalisierten Zellen .....	104
2.3	Transfektion von Säugerzellen .....	105
2.3.1	Calciumphosphat-Methode.....	105
2.3.2	Lipofektion.....	106
2.4	In vivo Markierung zellulärer Proteine von Säugerzellen.....	106
2.5	Zytosolpräparation aus eukaryontischen Zellen.....	107
2.6	Immunpräzipitation.....	107
2.7	Mikrosomenpräparation.....	107
2.8	Tryptischer Verdau der Mikrosomenpräparation.....	108
2.9	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	108
2.10	Lyse von <i>E. coli</i> .....	109
2.10.1	durch Ultraschall .....	109
2.10.2	durch Lysozym.....	109

3	Proteinchemische Methoden .....	110
3.1	Induktionskultur von <i>E. coli</i> .....	110
3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	110
3.2.1	nach Bradford .....	110
3.2.2	durch Absorptionsmessung bei 280 nm .....	111
3.3	Säulenchromatographische Methoden .....	111
3.3.1	Affinitätschromatographie .....	111
3.3.2	Gelfiltrationschromatographie .....	112
3.4	Native Gelelektrophorese.....	112
3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	113
3.6	Färben von Proteingelen.....	113
3.6.1	Coomassie-Färbung.....	113
3.6.2	Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick .....	113
3.7	Präparatfärbung für die Transmissionselektronenmikroskopie .....	114
3.8	Deassemblierung und Reassemblierung von Core-Partikeln .....	115
3.9	"Western Blotting", Immunoblot .....	115
4	Virologische Methoden .....	116
4.1	ELISA .....	116
4.2	Endogene Polymerase Reaktion (EPR) .....	116
4.2.1	Nachweis von Virionen im Zellkulturüberstand .....	116
4.2.2	Nachweis von intrazellulären Virionen.....	117
4.3	Dichtegradientenzentrifugation .....	118
4.4	Sedimentation von Core-Partikeln durch Sucrose-Kissen.....	118
4.5	Semiquantitative PCR.....	119
5	Indirekte Immunfluoreszenz .....	120
5.1	von eukaryontischen Zellen .....	120
5.2	von dendritischen Zellen.....	120
<b>H</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>122</b>
<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
<b>J</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>138</b>





## A Zusammenfassung

Im Zuge der funktionellen Charakterisierung der Hepatitis B Oberflächenproteine wurde in der PreS2-Region ein Bereich entdeckt, der zellpermeable Eigenschaften aufweist. Als Zellpermeabilität vermittelndes Motiv konnte ein  $\alpha$ -helikales Strukturelement zwischen Aminosäure 41-52 der PreS2-Region ermittelt werden. Dieses Motiv wird als Translokationsmotiv (TLM) bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Aspekte des TLM untersucht:

Zum einen konnten durch die Fusion des TLM mit Kapsiden des Hepatitis B-Virus, zellpermeable Kapsid-Partikel als ein neues Werkzeug zum Gen- und Proteintransfer etabliert werden.

Zum anderen wurde in dieser Arbeit die Bedeutung des TLM für den Lebenszyklus des HBV untersucht.

### 1 Etablierung von zellpermeablen Nukleokapsiden

Zur Vermittlung der Zellpermeabilität der Kapsid-Partikel des HBV, ist die Exposition des TLM auf der Oberfläche des Kapsides essentiell.

Dazu wurde das TLM zum einen N-terminal über einen 14 Aminosäuren langen Linker und zum anderen in eine als *spike tip* bezeichnete Region innerhalb des Kapsid-Proteins eingebracht. Für die Charakterisierung der Kapsid-Partikel wurde zunächst ein effizientes System zur Reinigung der Kapside unter nativen Bedingungen entwickelt. Durch gelchromatographische und elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte die Bildung von TLM-modifizierten Kapsiden nachgewiesen werden. Die Fähigkeit der Kapside, biologische Membranen zu überwinden wurde durch Inkubation von immortalisierten adhären Zellen, sowie von primären, dendritischen Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt.

Des Weiteren wurde versucht, zum einen im prokaryontischen als auch im eukaryontischen System spezifisch Nukleinsäure in die Kapside zu verpacken.

Hierfür wurden im prokaryontischen System hergestellte Partikel in einem ersten Schritt durch Denaturierung in Proteindimere getrennt. In einem zweiten Schritt wurden die denaturierten Proteine in Gegenwart von zu verpackender DNA renaturiert, wodurch es zur Integration der DNA in das entstehende Kapsid kam. Für die Verpackung spezifischer RNA im eukaryontischen System und deren anschließende reverse Transkription, wurden verschiedene TLM-Core-Konstrukte, die virale Polymerase sowie Verpackungs-Konstrukte verwendet. Die Bildung korrekt assemblierter Kapside wurde durch das Sedimentationsverhalten im Sucrose-Dichtegradienten nachgewiesen. Durch „Triple“-Transfektion der jeweiligen Core-Konstrukte zusammen mit der viralen Polymerase und eines Verpackungskonstruktes, sollte der natürliche virale Mechanismus zur Verpackung von RNA in die Kapside ausgenutzt werden.

## **2 Generierung von rekombinanten, im TLM mutierten Viren**

Ausgehend von einem 1,2fachen HBV-Genom des Subtyps adr4, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese vier Basen, innerhalb der für das TLM kodierenden Region, ausgetauscht, wodurch die Amphiphilie dieses Bereiches drastisch verändert wurde. Durch Strukturberechnungen konnte gezeigt werden, dass darüber hinaus die Mutationen zu einem Verlust der für die Zellpermeabilität verantwortlichen  $\alpha$ -helikalen Bereiches führen. Die  $\alpha$ -Helizität, sowie die Amphiphilie sind Voraussetzung für die Eigenschaft der Zellpermeabilität.

Da in Transfektionsexperimenten gezeigt werden konnte, dass die Zerstörung des TLM keinen Einfluss auf die Produktion der viralen Proteine, sowie der Sekretion und Reifung der Viruspartikel hat, konnte auf diese Weise ein System zur Herstellung TLM defizienter Viren etabliert werden. Damit ist es möglich die Rolle des TLM für den Infektionsvorgang in etablierten Infektionssystemen zu untersuchen.

## B Einleitung

### 1 Das Hepatitis B-Virus

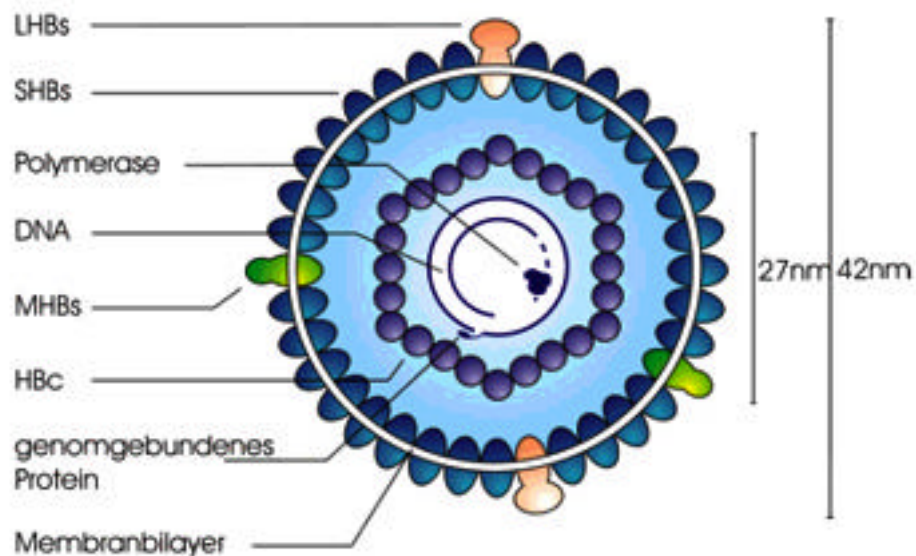
Das Hepatitis B-Virus (HBV) ist eines der kleinsten humanpathogenen Viren und wird aufgrund des strikten Lebertropismus [1-3] und der im Virus verpackten Nukleinsäure als „Hepa-DNA-Virus“ bezeichnet [4].

Die Hepadnaviren unterteilen sich in Säugetier- oder ortho-Hepadnaviren, sowie Vögel- oder avi-Hepadnaviren. Zu den ortho-Hepadnaviren gehören u.a. das *woodchuck hepatitis virus*, (WHV, Wirt: Waldmurmeltier) und das *ground squirrel hepatitis virus* (GSHV, Wirt: Erdhörnchen). Zu den avi-Hepadnaviren gehören beispielsweise das *duck hepatitis B-Virus* (DHBV, Wirt: Chinesische Hausente) sowie das *heron hepatitis virus* (HHV, Wirt: Reiher), sowie das *stork hepatitis B-Virus* (STHBV, Wirt: Storch) [5, 6].

Die Hepadnaviren zeichnen sich durch das Vorhandensein eines nur partiell doppelsträngigen DNA-Genoms und durch die Gegenwart einer RNA- und DNA-abhängigen DNA-Polymerase aus. Aufgrund ihrer Eigenschaft sich über eine prägenomische RNA-Matrize zu replizieren, werden die Hepadnaviren phylogenetisch zwischen den Retro- und den DNA-Viren eingeordnet [7]. Des weiteren zeichnen sich die Hepadnaviren durch eine hohe Gewebespezifität aus, die zum einen durch die Interaktion der viralen Oberflächenproteine mit gewebespezifischen Rezeptoren [8] als auch durch die Gegenwart von gewebespezifischen Promotoren bedingt ist [9].

## 1.1 Der Aufbau der Virionen

Das Blut akut HBV-infizierter Patienten enthält morphologisch drei unterschiedliche virusspezifische Partikel: sphärische (98-99 %) und filamentöse (1-2 %) Partikel mit einem Durchmesser von 22 nm, die nur aus der Virushülle bestehen und somit nicht infektiös sind, sowie intakte Virionen (~0,2 %) mit einem Durchmesser von 42 nm. Diese werden nach ihrer Entdeckerin auch als „Dane-Partikel“ bezeichnet [10].



**Abbildung 1: Das sog. „Dane-Partikel“**

Das Kapsid (HBC) ist von den Hüllproteinen LHBs, MHBs und SHBs umgeben, die in eine Lipiddoppelschicht eingelagert sind. Im Kapsid befinden sich die virale Polymerase, sowie das genomgebundene Protein.

Die Hülle des 42 nm großen Viruspartikels besteht aus Wirtslipiden, in denen die drei viralen Oberflächenproteine LHBs (*large hepatitis B surface antigen*), MHBs (*medium hepatitis B surface antigen*) und SHBs (*small hepatitis B surface antigen*) verankert sind [5]. Die Virushülle umschließt das 27 nm große Nukleokapsid, das aus dem Core-Antigen aufgebaut ist. Innerhalb des Nukleokapsides befinden sich die virale Polymerase [11], die partiell doppelsträngige Virus-DNA, das genomgebundene Protein [12] (siehe Abbildung 1) sowie eine in der Abbildung nicht gezeigte zelluläre Kinase [13].



Leserahmen enthält die beiden Startcodons des Hepatitis B core Antigens (HBcAg) und des Hepatitis B early Antigens (HBeAg). Ein weiterer Leserahmen kodiert für die viralen Oberflächenantigene Hepatitis B surface Antigen (HBsAg), die zusammen mit Wirtslipiden die Virushülle aufbauen [20]. Die Startcodons für LHBs, MHBs und SHBs liegen im gleichen Leseraster. Der letzte und kleinste ORF der Hepadnaviren kodiert für das Hepatitis B x Protein (HBx) [21].

Für die Strukturproteine HBc/eAg und HBsAg sowie HBx sind eigene Promotoren (SP1, SP2, CP, XP) beschrieben worden. Die virale Polymerase nutzt die Core-Promotoraktivität. Weiterhin konnten zwei *Enhancer*-Regionen (EnI und EnII) identifiziert werden, wobei die Aktivität des *Enhancer I* von verschiedenen leberspezifischen und ubiquitären Faktoren abhängt. Die Aktivität des *Enhancer II*, der innerhalb des X-Gens lokalisiert ist, hängt hingegen ausschließlich von leberspezifischen Aktivatoren ab [9, 22, 23].

Zusätzlich befindet sich noch ein *glucocorticoid responsive element* (GRE) im Bereich des S-Gens. In Zellkulturexperimenten konnte die HBV-Genexpression, vermittelt durch das GRE, in Gegenwart von Steroidhormonen um den Faktor 3-5 gesteigert werden [24].

### 1.3 Die Replikation der Hepadnaviren

Die Replikation des Virus erfolgt ausschließlich in Leberzellen und ähnelt aufgrund der Beteiligung eines reversen Transkriptionsschrittes der Replikation bei Retroviren. Allerdings ist hier im Gegensatz zur retroviralen Replikation keine Integration der DNA in das Wirtsgenom erforderlich.

Der Replikations- und Infektionszyklus des HBV beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Oberfläche von Hepatozyten. Auf der viralen Seite wird zwar eine Beteiligung aller drei HBs-Domänen (PreS1-, PreS2-, S-Domäne) der Oberflächenproteine diskutiert [8, 25-27], die Ergebnisse widersprechen sich jedoch teilweise.

Auf zellulärer Seite sind mehrere Rezeptoren für das Virus beschrieben. Beispiele sind das Endonexin II/Annexin V [28], Fibronectin [26], der Transferrin-Rezeptor [29], oder die im Fall des Entenhepatitisvirus (DHBV) gefundene, auch im Menschen vorkommende, Carboxypeptidase D (gp180) [30-32]. Die Vielfalt von virusbindenden Proteinen auf der Wirtszelle, lässt eine endgültige Klärung des

zugrundeliegenden Infektionsmechanismus noch offen. Das Entenvirus (DHBV) wird zwar durch Endozytose in die Zelle geschleust, bedarf für die Etablierung der Infektion allerdings keines sauren intralysosomalen pHs, was eine Beteiligung der Lysosomen weitgehend ausschließt [33]. Ungeklärt ist bisher auch, ob und wie das HBV-Nukleokapsid vor seiner Dissoziation an den Kern transportiert wird und durch welche zellulären Mechanismen die Kapsid-Dissoziation erfolgt. Im Zellkern findet die Vervollständigung der partiell doppelsträngigen HBV-DNA durch zelluläre Enzyme statt [34], so dass schließlich die ccc-Form (*covalently closed circular*) der viralen DNA als Minichromosom mit Nukleosomen assoziiert vorliegt [35]. Von der ccc-DNA ausgehend werden nun die mRNAs für die viralen Proteine und das RNA-Prägenom synthetisiert, dass im Zuge des Kapsidzusammenbaus, vermittelt durch die virale Polymerase, in das Viruskapsid integriert wird [36].

Ausgehend vom RNA-Prägenom wird durch die reverse Transkriptase-Aktivität und durch die RNase H Aktivität der viralen Polymerase der (-)-Strang synthetisiert und die RNA gleichzeitig bis auf ein kleines Oligonukleotid abgebaut. Dieses RNA-Oligonukleotid dient anschließend als Primer für die Synthese des (+)-Stranges [37-39].

Viruspartikel, in denen die prägenomische RNA in partiell doppelsträngige DNA transkribiert wurde, werden als „reife“ Viren bezeichnet und werden ohne lytischen Effekt von der Zelle sekretiert [40].

#### **1.4 Die virale Transkription**

In HBV-infizierten Hepatozyten lassen sich vier virale Haupttranskripte nachweisen. Die Transkription dieser viralen RNAs beginnt an verschiedenen Startpunkten innerhalb der DNA, endet jedoch an einem gemeinsam genutzten Polyadenylierungssignal. Der Transkriptionsstart wird durch die in 1.2 beschriebenen vier Promotoren initiiert. Die viralen Transkripte werden in prägenomische und subgenomische RNAs eingeteilt. Die prägenomische RNA ist mit 3,5 kB länger als das HBV Genom (3,2 kB) und terminal redundant [4]. Man unterscheidet aufgrund der heterogenen 5`-Enden zwei Klassen. Die längere preC-mRNA startet 29 Nukleotide vor dem preC-Startcodon und weist gegenüber der kürzeren ein zusätzliches Startcodon auf. Von dieser RNA wird das HBe-

Protein translatiert. Die etwas kürzere Core-mRNA beginnt 4 Nukleotide nach dem preC-ATG und enthält dadurch nur das Core-Startcodon. Sie dient zum einen als Matrize zur Synthese des HBc-Proteins und der viralen Polymerase und wird als prägenomische RNA in das Kapsid verpackt. Das subgenomische 2.1 kB Transkript codiert für MHBs und SHBs. Die selteneren Transkripte mit einer Größe von 2.3 und 1.7 kB codieren für LHBs und HBx [41, 42].

## 1.5 Die Viralen Proteine

### 1.5.1 Die virale Polymerase (HBpol)

Von der P-Region wird die virale Polymerase und das *genome linked protein* codiert [11]. Die Polymerase hat folgende enzymatische Aktivitäten: eine RNA- und eine DNA-abhängige Polymerase- sowie RNase H-Aktivität. Zusätzlich zu den enzymatischen Aktivitäten spielt die Polymerase noch eine entscheidende Rolle bei der Verpackung des Nukleokapsides [43, 44].

### 1.5.2 Das X Protein (HBx)

Das HBx Protein besteht aus 154 Aminosäuren (Subtyp ayw; siehe 1.5.3) und ist im kleinsten Leserahmen des Virus codiert. Die Rolle des HBx ist noch weitgehend ungeklärt. Beschrieben wurden vielfältige regulatorische Funktionen in der transkriptionellen Aktivierung zellulärer und viraler Gene. Dabei wirkt das X-Protein als indirekter Transkriptionsaktivator, der zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren über Protein-Protein-Wechselwirkung interagiert und verschiedenste Signalkaskaden aktiviert [45-55]. HBx interagiert zusätzlich noch mit weiteren Proteinen im Zellkern und Zytoplasma, die unter anderem in zelluläre Prozesse wie Proteolyse, Transkription, Regulation des Zellzyklus und DNA-Reparatur eingebunden sind [56-63]. Mutationen im x-Bereich des HBV legten nahe, dass das HBx-Protein nach Transfektionsexperimenten in Zellkultur *in vitro* entbehrlich für die Virusproduktion ist [64]. Dagegen führt jedoch die Transfektion von WHV-DNA ohne funktionellen WHV x-ORF in die Leber von Waldmurmeltieren zu keiner Produktion von infektiösen Viren, was somit zeigt, dass das WHV x-Gen für die Replikation *in vivo* notwendig ist [65, 66]. Die anfängliche Annahme, dass das Entenvirus (DHBV) über keinen X-Leserahmen



verfügt und somit für die Infektion nicht essentiell ist, konnte durch jüngste Ergebnisse widerlegt werden [67].

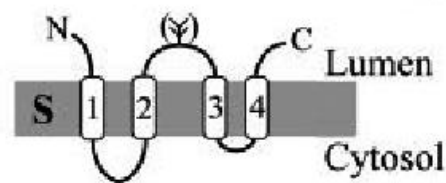
### **1.5.3 Die Oberflächenproteine (HBsAg)**

Das aus dem Blut von HBV-Patienten isolierbare HBsAg wird ausschließlich von der Leber sekretiert. Das Antigen besteht aus den drei unterschiedlich großen viralen Oberflächenproteinen, die in eine Lipidmembran zellulären Ursprungs eingelagert sind [20]. Sie werden von einem 1.2 kB großen Gen codiert, das sich aus den Regionen preS1, preS2 und S zusammensetzt. Jede dieser drei im gleichen Leserahmen liegenden Domänen besitzt ein Startcodon, wodurch drei Proteine unterschiedlicher Größe, die sich in der N-terminalen Region unterscheiden, exprimiert werden.

Die humanen Hepatitis B-Viren werden aufgrund struktureller Unterschiede des Oberflächenantigens in vier verschiedene Serotypen eingeteilt. Die Einordnung basiert auf einer einheitlichen a-Determinante zusammen mit den jeweils exklusiv vorhandenen Determinantenpaaren d oder y, sowie w oder r. Die Serotypen werden somit als adw, ayw, adr und ayr bezeichnet [68].

### 1.5.3.1 Das kleine Oberflächenprotein SHBs

Im Serum Hepatitis B-Virus infizierter Patienten macht das SHBs etwa 90 % der Oberflächenproteine aus. Die Synthese erfolgt durch einen internen Translationsstart innerhalb des 2.1 kB langen subgenomischen Transkriptes [69].



**Abbildung 3: Das kleine Oberflächenprotein SHBs**

Die Abbildung zeigt die Anordnung des SHBs in der Membran des ER.

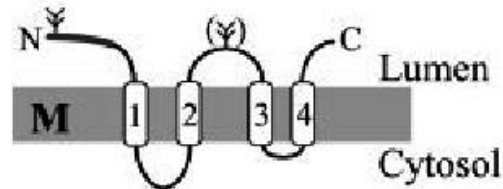
SHBs besitzt ein Molekulargewicht von 24 kD (p24) und im Falle einer Glykosylierung an Asn<sup>146</sup> 27 kD (gp27). Dieses Protein ist unerlässlich für die Generierung der 22 nm Partikel. SHBs stellt bislang die Grundlage für Impfstoffe dar, die zur Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern führen.

Die Aminosäuresequenz weist drei hydrophobe und zwei hydrophile Bereiche auf. Die ersten beiden N-terminal gelegenen hydrophoben Bereiche besitzen  $\alpha$ -helikale Strukturen und fungieren als Transmembranregion (TM). Die erste  $\alpha$ -Helix zwischen Aminosäure 11-29 wirkt als N-terminale Signalsequenz für die Translokation in das ER-Lumen [70, 71]. Die zweite  $\alpha$ -helikale Struktur wird ebenfalls in die Membran inseriert, was die Translokation C-terminal folgender Sequenzen ermöglicht [72]. Die zwischen den  $\alpha$ -Helices gelegene Region ist folglich dem Zytosol, bzw. nach der Virusknospung dem Virusinneren zugewandt. Die Struktur des C-terminalen hydrophoben Teils ist unklar. Man geht allerdings von zwei weiteren in die ER-Membran inserierten Regionen aus [73].

SHBs weist, insbesondere im Bereich der C-terminal der TM 2 gelegenen sog. „a“-Determinante eine Reihe von Cystein-Resten auf, von denen ein Teil durch die Ausbildung von intra- und intermolekularer Disulfidbrücken beim Aufbau partikulärer Strukturen beteiligt ist [73].

### 1.5.3.2 Das mittlere Oberflächenprotein MHBs

Das MHBs wird wie SHBs sekretiert (5-10 % des Serum-HBsAg) und weist zusätzlich zu SHBs aminoterminal weitere 55 Aminosäuren (die PreS2-Region) auf.



**Abbildung 4: Das mittlere Oberflächenprotein MHBs**

Die Abbildung zeigt die Anordnung des MHBs in der Membran des ER.

Durch die Gegenwart von zwei Glykosylierungsstellen ( $\text{Asn}^4$  in der PreS2-Region und  $\text{Asn}^{146}$  in der S-Region), können drei MHBs spezifische Molekulargewichte detektiert werden: unglykosyliert (p30), einfach glykosyliert (gp33) und zweifach glykosyliert (gp36) [74]. Im Gegensatz zu SHBs und LHBs ist die Anwesenheit von MHBs nicht zwingend für die Virusmorphogenese erforderlich [27].

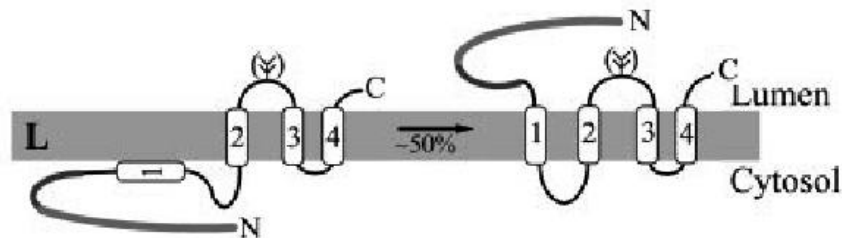
Ein auffälliges Charakteristikum ist die Fähigkeit der PreS2-Region (Aminosäuren 13-29) an polymeres Humanes Serum Albumin (pHSA) zu binden. Da Hepatozyten auch an pHSA binden, wurde hier ein möglicher Mechanismus für die Bindung des Virus an die Leberzelle gesehen [75, 76]. Allerdings ist die Relevanz der *in vitro* gezeigten pHSA vermittelten Bindung von MHBs an die Lebermembran für die *in vivo* Situation derzeit nicht geklärt.

MHBs ist ein reines Strukturprotein. Im Gegensatz zu der C-terminal verkürzten Form ( $\text{MHBs}^{\dagger}$ ), die durch zufällige Integration von Virus-DNA in das zelluläre Genom entstehen kann, weist MHBs keine transkriptionellen Aktivitäten auf [77]. Die aktivierende Funktion der C-terminal verkürzten Proteine sind für die Konstrukte  $\text{MHBs}^{\text{t}53}$  bis  $\text{MHBs}^{\text{t}207}$  gegeben. Darüber hinaus findet keine Aktivierung statt [78, 79]. Der Grund hierfür ist die im Gegensatz zum MHBs zytoplasmatische Orientierung der für die aktivierende Funktion verantwortlichen PreS2-Region beim  $\text{MHBs}^{\dagger}$  [79].

Die transkriptionelle Aktivierung erstreckt sich pleiotrop auf eine Vielzahl von Promotoren [79].

### 1.5.3.3 Das große Oberflächenprotein LHBS

Die Synthese des LHBS geht vom Startcodon der preS1 Region aus und ist aufgrund der HNF (*hepatocyte nuclear factor*) -Abhängigkeit des SP1-Promotors leberspezifisch [80].



**Abbildung 5: Das große Oberflächenprotein LHBS**

Die Abbildung zeigt die beiden vorkommenden Topologien.

Das große Oberflächenprotein macht ca. 5 % der Oberflächenantigene aus und kommt in zwei Formen vor: der unglykosylierten 39 kDa Form (p39) und der glykosylierten Form (gp42). Die Glykosylierung erfolgt an Asn<sup>146</sup> innerhalb des SHBs. Als zusätzliche Modifikation weist LHBS eine Myristoylierung an Gly<sup>2</sup> auf, welche für die Fixierung des N-Terminus in der Membran verantwortlich ist [81]. Überraschenderweise wird LHBS innerhalb der PreS2-Region nicht glykosyliert, obwohl die Glykosylierungsstelle intakt ist. Das Ausbleiben der Glykosylierung ist darin begründet, dass im Falle von LHBS die PreS1/PreS2-Region nicht kotranslational in das Lumen des ER transloziert wird, und die Glykosylierungsstelle somit nicht genutzt werden kann [82].

Während des Ausknospens des Virus wird bei einem Teil der Proteine die PreS1/PreS2-Region posttranslational über die ER-Membran transloziert, wodurch eine Exposition dieser Region auf der Oberfläche des Virus erfolgt [82-84]. LHBS wird in Abwesenheit von SHBs nicht sekretiert, sondern reichert sich in der Zelle an [85]. Die Zellen werden als Milchglashepatozyten bezeichnet [86]. LHBS ist notwendig für den Zusammenbau viraler Partikel, da die dafür erforderliche Interaktion der Hüllproteine mit dem Kapsid über die PreS1-Region vermittelt wird [27, 87-90]. Die PreS1-Region besitzt darüber hinaus zwischen den Aminosäuren 21 und 47 eine für die Bindung viraler Partikel an Hepatozyten essentielle Domäne, die als Hepatozytenbindestelle oder Neurath-Sequenz bezeichnet wird [8].

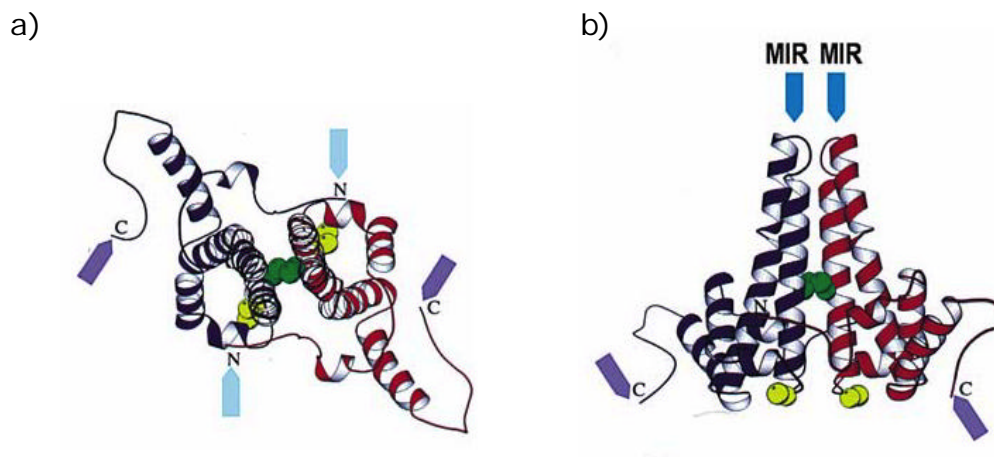
#### 1.5.3.4 Duale Topologie des LHBs

Während der HBV-Replikation spielt die PreS1-Region eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit Oberflächenantigenen der Zielzelle [8]. Andererseits ist dieser Bereich auch für die Umhüllung des viralen Kapsides verantwortlich [27, 91], was eine duale Topologie des LHBs in der Membran des ER voraussetzt. Bisher sind die molekularen Mechanismen, die zu dieser Anordnung der PreS1/PreS2-Region führen, nicht vollständig geklärt. Die Transmembranregion 2 und C-terminal folgende Sequenzen werden ebenso wie die analogen Bereiche des MHBs und SHBs kotranslational in die Membran des ER transloziert. Verantwortlich hierfür sind Signalsequenzen innerhalb der zweiten Transmembranregion in der S-Region [72, 92]. Eine in der Transmembranregion 1 lokalisierte Signalsequenz ist für die kotranslationale Translokation der PreS2-Region im Zuge der Integration von MHBs in die ER-Membran verantwortlich [71, 83]. Sie bewirkt dies aber nicht im Fall der zusätzlich vorhandenen PreS1-Region von LHBs. Die Translokation der PreS1/PreS2-Region des großen Oberflächenproteins in das ER-Lumen erfolgt für einen Teil der LHBs-Proteine posttranslational [82-84]. Der Rest verbleibt in der nicht translozierten Topologie (siehe Abbildung 5). In diesem Zusammenhang wurde die Interaktion mit zytosolischen Bindungspartnern wie Hsc-70, Hsp-90 und p53 diskutiert, die die kotranslationale Translokation zumindest partiell verhindern [93, 94]. Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Oberflächenantigene postuliert, durch Zusammenlagerung von zwei LHBs, MHBs oder SHBs Molekülen mit deren Transmembranregionen TM1, TM3 und TM4 einen Kanal zu bilden, durch den die hydrophile PreS1/PreS2-Region die ER-Membran durchqueren kann [95-98]. Jüngste Untersuchungen konnten dies allerdings nicht bestätigen [99].

#### 1.5.4 Das Nukleokapsidprotein und HBeAg

Obwohl das HBV-C Gen nur zwei *in-frame* ATG-Startcodons besitzt, werden durch diesen Bereich vier verschiedene Genprodukte hergestellt: p25, p22, p21 und p17 [100]. Wird das erste Startcodon genutzt, kommt es zur Expression des p25, das durch eine in der PreC-Region liegende Signal-Sequenz in den sekretorischen Pathway geleitet wird. Hier erfolgt durch N-terminale Proteolyse

die Prozessierung zu p22 und anschließend durch Spaltung an Aminosäure 149 die Erzeugung von p17, das als HBe-Ag von der Zelle sekretiert wird [101]. Das überwiegend hergestellte p21 Polypeptid wird vom zweiten Startcodon aus gebildet und stellt das HBcAg dar, das für die Bildung des Virus-Kapsides verantwortlich ist.

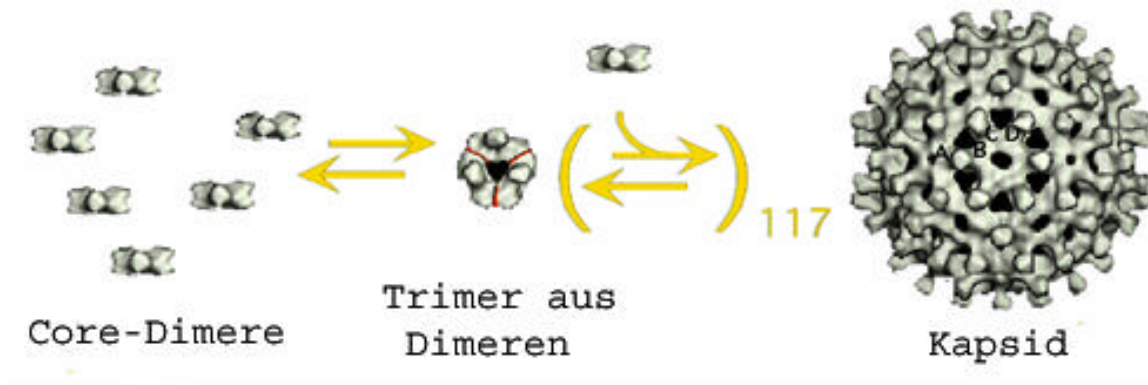


**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Core-Protein Dimeres**

Das Core-Protein Dimer entlang (a) und senkrecht (b) zur C2-Symmetrieachse [102]. Mit MIR ist die immundominante Region gekennzeichnet.

Das Core-Protein besteht aus 183 Aminosäuren und besitzt im C-terminalen Bereich auffallend viele Argininreste, die die Interaktion mit Nukleinsäuren vermitteln [103]. Nach der Deletion des argininreichen C-terminalen Endes, das 33 Aminosäuren umfasst, lassen sich die Kapside in eubakteriellen Expressionssystemen mit hohen Ausbeuten herstellen [104]. Die auf diese Weise produzierten Kapside kommen in zwei Modifikationen vor. Neben den 180 Monomere umfassenden Kapsiden mit einem Durchmesser von 30 nm und einer Triangulationszahl  $T=3$ , werden Kapside mit 240 Core-Protein Monomeren gebildet, die einen Durchmesser von 34 nm besitzen und die Triangulationszahl  $T=4$  aufweisen [104]. Das Gleichgewicht aus  $T=4$  und  $T=3$  Partikeln kann durch weitere Deletionen am C-Terminus zu Gunsten der  $T=3$  Partikel verschoben werden [105]. Der N-Terminus wird im Gegensatz zum C-terminalen Bereich im assemblierten Kapsid auf der Oberfläche exponiert [106, 107] und eignet sich dadurch für die Fusion von zu exponierenden Proteinen und Peptiden.

Das Hepatitis B Core-Protein besitzt die Eigenschaft des spontanen Selbstzusammenbaus beim Überschreiten einer kritischen Konzentration an Core-Protein Dimeren von ca.  $0,8 \mu\text{M}$  [108].



#### Abbildung 7: Ablauf des Kapsidzusammenbaus

Core-Proteine lagern sich spontan zu Dimeren zusammen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Bildung eines Trimeres aus Dimeren. Die Anlagerung von weiteren Core-Dimeren an diesen Komplex erfolgt anschließend sehr rasch [105].

Neben der Funktion der Kapsidbildung besitzt das Core-Protein weitere wichtige Funktionen im Zuge der Virusreplikation. So stellt es einen Kofaktor der viralen Polymerase im Zuge der Synthese von doppelsträngiger DNA dar. Das Kapsid interagiert mit spezifischen Bereichen innerhalb der Hüllproteine SHBs und LHBs [27, 87-90]. Welcher Bereich auf Seiten des Kapsides für die Interaktion mit den Hüllproteinen verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert [89, 109]. Allerdings konnten jüngste Untersuchungen zeigen, dass die Interaktion des Kapsides mit den Hüllproteinen über Bereiche in den Furchen des Kapsides, also am Ansatz der *spike tips* vermittelt wird [110].

Die Phosphorylierung von C-terminal vorhandenen Serinen innerhalb von drei sich wiederholenden SPRRR Motiven, spielt eine Rolle bei der Verpackung von prägenomischer RNA [111, 112] und bei der Interaktion des Cores mit dem Kernporenkomplex von infizierten Zellen [113].

## 2 Zellpermeable Peptide und Proteine

### 2.1 Beispiele zellpermeabler Peptide und Proteine

In jüngster Zeit konnten einige Peptide und Proteine beschrieben werden, welche die Fähigkeit besitzen, biologische Membranen zu überwinden. Obwohl sie zum Großteil keine klassischen lipophilen Substanzen, sondern geladene hydrophile Moleküle darstellen, diffundieren sie in einem energieunabhängigen Mechanismus durch die Zellmembran. Beispiele für derartige Peptide sind das Antennapedia-Homöoboxprotein und die daraus abgeleiteten Penetratine [114, 115], das hierzu strukturverwandte, aus der Islet-1 Homöodomäne abgeleitete Peptid pIS1 [116], das aus dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) stammende TAT-Protein [117], die aus dem Herpes Simplex Virus und dem Marek's Disease Virus stammenden homologen Proteine HSV-1 VP-22 und MDV-1 VP-22 [118][119], der Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktor [120], sowie das im Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus entdeckte, 12 Aminosäuren umfassende, Translokationsmotiv (TLM) [121].

Neben diesen, aus natürlich vorkommenden Proteinen stammenden Motiven konnten auch Fusionsproteine beschrieben werden, die zellpermeable Eigenschaften aufweisen. Zu diesen Peptiden gehören das Transportan [122] und das MPG-Motiv [123, 124]. Transportan stellt ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen Bereich des Galanins und des C-terminalen Bereich des Mastoparans dar und verfügt ebenso wie das MPG-Motiv über 27 Aminosäuren. Das MPG-Motiv setzt sich aus der fusogenen Sequenz des HIV-gp41 und der Kernlokalisationsdomäne des SV40 T-Antigens zusammen. Des Weiteren konnte auch für synthetisch hergestellte Peptide, wie für den Protein-Carrier Pep-1 [125], sowie für synthetische Peptide, die eine  $\alpha$ -helikale amphiphatische Struktur einnehmen, die Membrangängigkeit beschrieben werden [126].

Mit Hilfe der zellpermeablen Peptide können eine Vielzahl von biologisch wirksamen Substanzen, wie Peptide und Proteine, aber auch Polyamid Nukleotid Analoga (PNA), sowie DNA- und RNA-Fragmente zur Antisense-Therapie in eine Vielzahl von Ziel-Zellen eingebracht werden [127].



## 2.2 Das Translokationsmotiv (TLM)

Für den Bereich zwischen Aminosäure 41 und 52 (PLSSIFSRIGDP, Subtyp ayw) in der PreS2-Region des Hepatitis B-Virus konnte die Eigenschaft der Zellpermeabilität nachgewiesen werden [121]. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass dieses 12 Aminosäuren umfassende Peptid eine  $\alpha$ -helikale amphiphatische Struktur besitzt [79]. Durch Mutationen in diesem Bereich (PSSSSSRIGDP) erfolgt die Umlagerung in eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, wodurch die Eigenschaft der Zellpermeabilität verloren geht.

Die Eigenschaft der Zellpermeabilität ist nicht auf Leberzellen beschränkt. Sie umfasst die Penetration permanenter Zelllinien und primärer Zellen in der Zellkultur, sowie auch Zellen pflanzlichen Ursprungs. Die Applikation des Proteins in die Pfortader von Mäusen *in vivo*, zeigte die Verteilung der mit dem TLM fusionierten Proteine in mehrere, an das Endothel angrenzende, Zellschichten. Mit Hilfe dieses Motives wurden funktionelle Peptide und Proteine bis zu einer Größe von 160 kDa (IgG) in Zellen eingeschleust (unveröffentlichte Ergebnisse). Durch Kombination des TLM mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne ist es möglich DNA in Zellen einzuschleusen und dort zur Expression zu bringen [128].

Vergleichbare amphiphatische Bereiche, die eine Tendenz zur Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix aufweisen, wurden in allen Säuger- sowie avianen Hepadnaviren gefunden [129].

## 3 Gentherapie

Der Gentransfer stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Therapie von bisher nicht, oder nur schwer therapierbaren Erkrankungen dar und wird zur Zeit in zahlreichen klinischen Studien mit den verschiedensten Vektorsystemen getestet [130]. Ein Grund für diese weitreichenden Forschungsbemühungen ist der oft unzureichende Therapieerfolg von traditionellen Behandlungsmethoden. So sind z.B. Krankheiten die auf einem so genannten monokausalen Defekt beruhen, wie angeborene Stoffwechselkrankheiten (z.B. zystische Fibrose), durch traditionelle Methoden schwer zu behandeln.

Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten des Gentransfers:

Die erste ist die sogenannte *ex vivo*-Therapie, bei der Zellen aus dem Körper entnommen werden, mit dem therapeutischen Gen transfiziert und wieder in den Körper eingebracht werden. Ein weiteres Verfahren ist die *in situ*-Therapie, wobei der Vektor direkt in das zu therapierende Gewebe appliziert wird. Die letzte Möglichkeit ist die *in vivo* Therapie, bei der der Vektor in die Blutbahn injiziert wird und im Idealfall Zellen durch Wechselwirkung mit spezifischen Oberflächenrezeptoren transfiziert.

Es werden sowohl virale als auch nicht-virale Vektoren eingesetzt.

### 3.1 Viraler Gentransfer

Für die Herstellung von viralen Vektorsystemen wird in der Regel ein für die Replikation essentieller Bereich aus dem Virusgenom deletiert und durch Reportergene oder therapeutische Sequenzen ersetzt. Die für die Virusproduktion erforderlichen deletierten Bereiche werden durch Kotransfektion mit einem sog. Helferplasmid bzw. durch die Transfektion des rekombinanten viralen Konstruktes in eine stabil mit dem Helferplasmid transfizierte Verpackungszelllinie eingebracht.

Die auf diese Weise hergestellten rekombinanten Viren sind in normalen Zellen replikationsdefizient. Großes Augenmerk wird dabei auf retrovirale Systeme gelegt, da diese Viren die Eigenschaft besitzen das virale Genom in das Genom der Zelle zu integrieren. Allerdings infizieren diese Viren nur proliferierende Zellen [131]. Hingegen können ruhende Zellen von Lentiviralen Vektoren infiziert werden [132]. Da diese Vektoren ein hohes pathogenes Potential besitzen (z.B. HIV) werden sie derzeit nicht in klinischen Studien untersucht.

Für *in situ*-Gentherapieprotokolle, werden häufig adenovirale Vektoren verwendet. Diese Viren zeichnen sich durch einen hohen Virustiter aus und verfügen über eine große Kapazität an einzubringender Fremd DNA (8-9 kB) [133].

Des Weiteren sind adenoassoziierte Viren (AAV) Gegenstand von Studien, da dieses nicht humanpathogene Virus in der Lage ist, das virale Genom gezielt in das Chromosom 19 zu integrieren [134].

### 3.2 Nicht-viraler Gentransfer

Der nicht-virale Gentransfer spielt bisher eine eher untergeordnete Rolle in der Gentherapie. Ca. 75 % der gegenwärtigen klinischen Versuche basieren auf Virus vermitteltem Gentransfer [130]. Um allerdings die Nachteile, wie fragliche biologische Sicherheit, Toxizität, limitierte DNA-Verpackungskapazität, Rekombinationsereignisse, sowie hohe Kosten des viralen Gentransfers zu umgehen, werden in letzter Zeit auch verstärkt nicht-virale Systeme untersucht. Das Prinzip beruht auf einer Komplexbildung zwischen einem positiv geladenen Polymer und negativ geladener DNA und anschließender Aufnahme in die Zelle durch Phagozytose, oder durch unspezifische Wechselwirkung mit der Zellmembran. Die verwendeten Substanzen können in fünf Gruppen unterteilt werden. (Diethylamino)ether (DEAE)-dextran [135] und Calcium-Phosphat [136] werden nur in Zellkulturexperimenten eingesetzt. Des Weiteren können Proteine (poly-L-Lysin; PLL) und Dendrimere für den *in vivo* Gentransfer verwendet werden. Durch Fusion von Liganden wie z.B. EGF an PLL kann ein zellspezifischer Gentransfer *in vivo* erreicht werden [137, 138]. Im Gegensatz zu PLL besitzt die Gruppe der Dendrimere eine definierte Struktur. Die weit verzweigten Polyamidoamin (PAMAM) Dendrimere sind in der Lage *in vivo* Oligonukleotide in Tumorgewebe einzubringen [139]. Der liposomale Gentransfer wird unter den nicht-viralen Gentransfersystemen in klinischen Versuchen am häufigsten getestet. Die Vorteile liegen in der geringen Toxizität der Substanzen und den geringen Herstellungskosten. Auf diese Weise konnte jüngst ebenfalls ein zellspezifisches *targeting* durch die Fusion von Transferrin an Liposomen erreicht werden [140].

Kritisch für einen erfolgreichen Einsatz von DNA als Therapeutikum ist jedoch die Transfektionseffizienz, die bei synthetischen Gentransfer-Systemen noch relativ gering ist [141]. Zusätzlich wird die Übertragung positiver Ergebnisse in Zellkulturexperimenten auf Tiermodelle dadurch erschwert, dass die Transfektionseffizienz *in vitro* und *in vivo* nicht notwendigerweise korreliert [142, 143].

### 3.3 Virusähnliche Partikel (VLP)

Ein Bindeglied zwischen den viralen und den nicht-viralen Systemen stellen die Virusähnlichen Partikel dar, da sie aus viralen Proteinen aufgebaut werden, allerdings keine viruseigene DNA beinhalten.

Virale Kapside, die aus Proteinuntereinheiten aufgebaut sind, lassen sich häufig *in vitro* aus den isolierten Proteinen zusammensetzen. Derartige Assemblierungsprotokolle bestehen z.B. für das Maus-Polyomavirus VP1 [144], die Rind-Papillomavirus Proteine L1/L2 [145, 146], das adenoassoziierte Virus (AAV) Rep- und Kapsid- Protein [146], die Rous Sarkoma Virus und HIV CA-NC Proteine, die aus dem SV40 stammenden Proteine VP1, VP2 und VP3 [147], das humane Papillomavirus Typ-16 L1 Protein [148], das HIV-1 Gag-Protein [149], das Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) [150, 151], sowie das Hepatitis B Core-Protein [108].

Eine Anwendungsmöglichkeit virusanaloger Partikel stellt der Gentransfer dar. Dazu wird die DNA *in vitro* in Kapside eingeschlossen und das Partikel in der Regel von endozytotischen Mechanismen in die Zelle aufgenommen.

Vorteile solcher Systeme sind eine separate Herstellung und Reinigung aller Komponenten, wodurch eine sehr hohe biologische Sicherheit gewährleistet ist. Darüber hinaus sind die VLP's sehr leicht handhabbar und kostengünstig herzustellen. Gleichzeitig werden jedoch auch virale Mechanismen, wie z.B. die Interaktion der viralen Kapside mit der Kernmembran und anschließender DNA-Freisetzung für einen effektiven Gentransfer in die Zellen ausgenutzt.

Durch die Kombination der VLP's mit weiteren Proteinen oder Proteindomänen ist es möglich völlig neuartige Partikel zu konstruieren, deren Eigenschaften vorbestimmt und kontrolliert werden können. Auf diese Art könnten die VLP's bezüglich der spezifischen Bindung an Zelloberflächen, dem endosomalen Austritt, der Translokation zum Nukleus und der stabilen Integration in das Zielzell-Genom optimiert werden.

Da auf der Oberfläche von VLP's hervorragend Antigene präsentiert werden können, ist neben der Gentherapie der Einsatz als Vakzine ein weiteres Anwendungsgebiet der VLP's [102, 152].

## C Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Etablierung eines neuartigen Systems für den Protein und Gentransfer. Dafür sollten Kapside auf Grundlage des HBV mit dem Translokationsmotiv (TLM) kombiniert und in verschiedenen Expressionssystemen hergestellt und charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, inwieweit diese Kapside in der Lage sind Zellmembranen zu durchqueren und man in diesen Kapsiden spezifisch und effizient DNA verpacken kann.

Weiterhin sollten TLM defiziente Viren hergestellt werden, die eine Untersuchung der Rolle des TLM für den viralen Lebenszyklus ermöglichen.

### 1 Etablierung von zellpermeablen Hepatitis B Nukleokapsiden

Die Entdeckung von Proteinen, welche die Fähigkeit besitzen biologische Membranen zu überwinden, ermöglicht die Entwicklung von neuartigen Werkzeugen zur Einschleusung von Proteinen und DNA in Zellen. Eine solche Möglichkeit sollte durch die Etablierung von neuartigen Gentransfer-Vektoren auf der Basis von Virusähnlichen Partikeln (VLP's) geschaffen werden.

Um Nukleokapside zu erhalten, welche die Fähigkeit der Zellpermeabilität aufweisen, sollten verschiedene Insertionsorte für das Translokationsmotiv innerhalb des HBV-Kapsides untersucht werden.

Des Weiteren sollte versucht werden, spezifisch Nukleinsäure in die Partikel zu verpacken. Ein Ansatz hierfür war die Verwendung von viruseigenen Verpackungsmechanismen im eukaryontischen Expressionssystem.

In einem zweiten Ansatz sollte untersucht werden, ob es möglich ist, Kapside *in vitro* aus dessen Monomeren bzw. Dimeren zusammensetzen und innerhalb dieses Prozesses DNA in die Kapside zu verpacken. Dazu sollten die Kapside im eubakteriellen System exprimiert und unter Verwendung eines Affinitäts-Tags gereinigt werden. Durch Denaturierung der Core-Partikel mit anschließender

Renaturierung in Gegenwart von DNA sollte versucht werden, Nukleinsäure enthaltene Kapside zu erhalten.

Abschließend sollten die Eigenschaften der Kapside im Hinblick auf den Gentransfer untersucht werden.

## **2 Untersuchung der Rolle des TLM im Lebenszyklus des HBV**

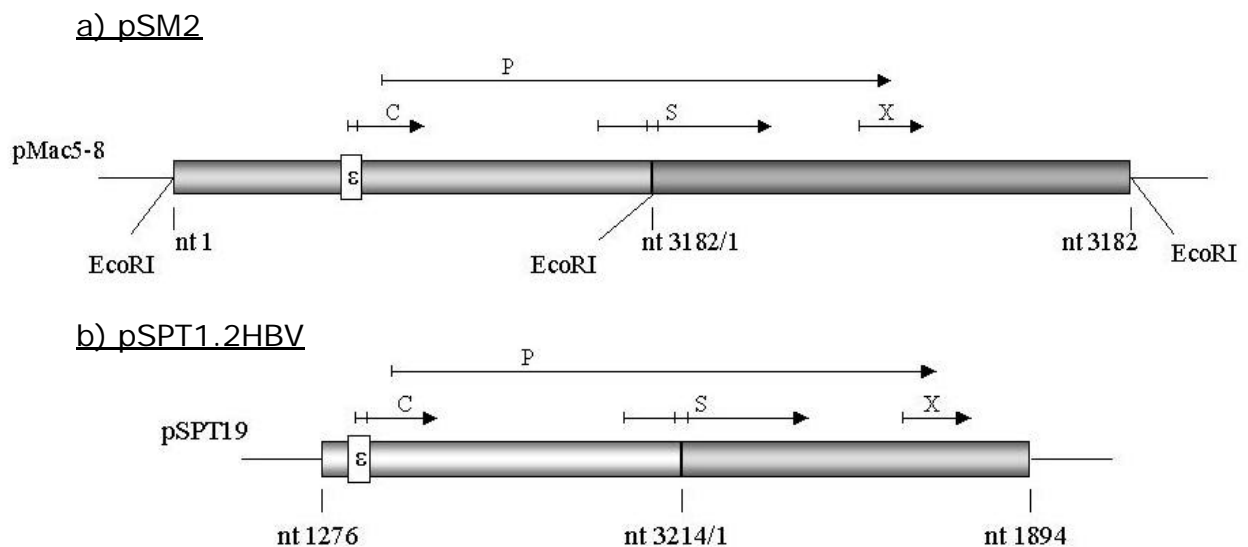
Die hohe Konservierung von amphiphatischen Strukturen in allen bekannten ortho-, sowie avi-Hepadnaviren, legt die Vermutung nahe, dass das Translokationsmotiv des HBV und analoge Bereiche in Oberflächenproteinen anderer Hepadnaviren für den Lebenszyklus der Viren essentiell ist.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen sollte ein HBV Genom konstruiert werden, in dem die  $\alpha$ -helikale und amphiphatische Struktur des TLM-Motives durch Mutagenese zerstört wird. Durch Transfektion der Genome in Hepatomzellen sollte die Relevanz des TLM für die Virusmorphogenese untersucht werden.

## D Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Genome von zwei verschiedenen humanen HBV-Subtypen verwendet:

Das Plasmid pSM2 codiert für den HBV-Subtyp ayw (3182 Basenpaare). Es leitet sich von dem Vektor pMac5-8 ab und besitzt ein zweifaches in Tandemformation vorliegendes HBV-Genom. Die beiden Genome wurden über die *EcoRI*-Schnittstelle aneinandergesetzt und in den Vektor inseriert. Dieses Plasmid diente als Grundlage für die Klonierung der verschiedenen Nukleokapsidvarianten mit den dazugehörigen Konstrukten wie der HBV-Polymerase und den Verpackungsplasmiden. Die Nomenklatur erfolgt nach Galibert et al. [15].



### Abbildung 8: Verwendete HBV-Genome

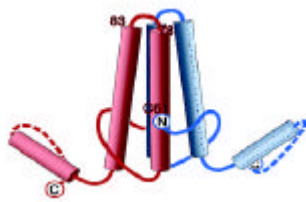
Das Plasmid a) pSM2 besitzt als Rückgrat den Vektor pMac5-8 und enthält ein zweifaches Genom des HBV-Subtypes ayw. Die Nukleotidnummerierung beginnt an der *EcoRI*-Schnittstelle. b) pSPT1.2xHBV basiert auf dem Vektor pSPT19 und besitzt ein 1,2faches Genom des HBV-Subtypes adr4. Die Nukleotidnummerierung beginnt an der *XhoI*-Schnittstelle. Die für die viralen Proteine kodierenden Leserahmen HBe/e-Antigen (C), Oberflächenantigene (S), HBx-Transaktivator (X) und Polymerase (P) sind als Pfeile gekennzeichnet.

Das Plasmid pSPT1.2xHBV [153] kodiert für ein 1,2faches HBV-Genom des Subtypes adr4. Die terminale Redundanz gewährleistet die Synthese übergenomlanger, prägenomischer 3,5 kB RNA und ermöglicht so die Virusreplikation.

Die Herstellung der rekombinanten Viren basierte auf diesem Plasmid.

## 1 Nukleokapside

Um die Zellpermeabilität vermittelnde 12 Aminosäuren umfassende TLM-Motiv auf der Oberfläche der Kapside zu exponieren, wurde dies zum einen N-terminal über einen Linker und zum anderen zwischen Aminosäure 80 und 81 innerhalb des Core-Proteins rekombinant inseriert. Die Region zwischen Aminosäure 78-83 wird als *spike tip* bezeichnet und bildet die äußerste Spitze auf dem Kapsid [104]. Der Aminoterminus befindet sich beim Wildtyp auf der Oberfläche des Kapsides in der sog. Furche zwischen den *spike tips* [154]. Um eine bessere Exposition des TLM auf der Oberfläche zu erreichen, wurde ein 14 Aminosäuren umfassender *Spacer* zwischen das TLM und dem Core-Protein integriert (in Abbildung 9 hellgelb hervorgehoben). Als *Spacer* wurde der PreC-Bereich verwendet, wobei ein in diesem Bereich vorhandenes Cystein (AS -7 in Bezug auf das Core-ATG), das eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung und Sekretierung des e-Antigens spielt [101], durch Tryptophan ersetzt wurde. Die eingesetzten Core-Konstrukte sind in Abbildung 9 dargestellt.



a) Wildtyp-Core-Proteindimer (WT)



b) TW-Core-Proteindimer



c) TLM-Core-Proteindimer

### Abbildung 9: Schematische Darstellung der Core-Proteindimere und ihrer Modifikationen

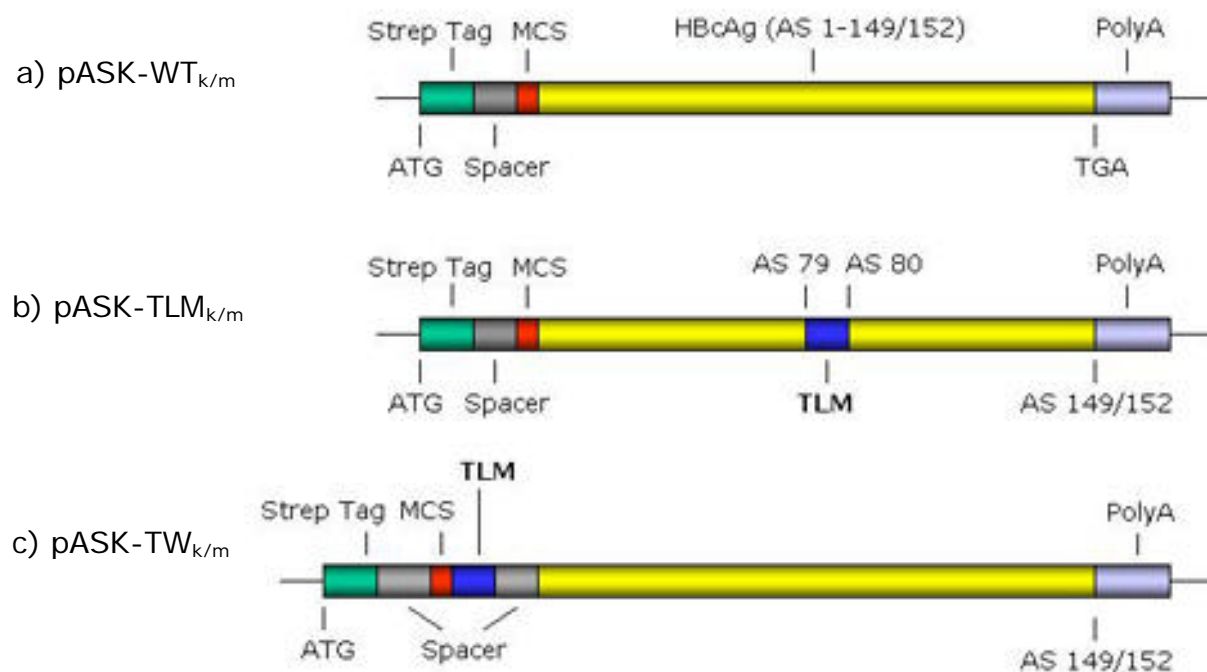
- a) Das Wildtyp WT-Core-Proteindimer. Die Core-Monomere (rot bzw. blau) lagern sich über zwei  $\alpha$ -helikale Bereiche zusammen und bilden den *spike tip*.  
 b) Das TW-Coreproteindimer, das N-terminal über einen 14 Aminosäuren umfassenden Linker (gelb) das TLM-Motiv enthält. c) In die Spitze, zwischen Aminosäure 80 und 81 eingebrachtes TLM-Motiv.



## 1.1 Expression der Kapside in *E. coli*

### 1.1.1 Klonierung der eubakteriellen Expressionsplasmide

Für die Herstellung der verschiedenen Core-Kapside in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pASK-IBA7 der Firma IBA verwendet, der die Reinigung der erhaltenen Proteine unter nativen Bedingungen über einen Affinitäts-Tag (*Strep-tag*) erlaubt [155]. Die Expression des Gens steht unter der Kontrolle des *tetA*-Promotors/Operators, der durch ein Tetracyclinderivat (**A**nhydrotetracyclin, AHT) aktiviert werden kann [156]. Zur Amplifikation des Plasmides im Selektionsmedium steht ein Ampizillin-Resistenzgen zur Verfügung.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten Core-Konstrukte für die Expression in *E. coli***

a) WT- b) TLM- und c) TW-Core stellen C-terminal verkürzte Formen des HBcAg dar. WT<sub>k</sub>, TLM<sub>k</sub> und TW<sub>k</sub> sind im Vergleich zum HBcAg um 35 Aminosäuren verkürzt. Die Konstrukte WT<sub>m</sub>, TLM<sub>m</sub> und TW<sub>m</sub> sind hingegen nur um 32 Aminosäuren verkürzt. Die beiden Spacer besitzen 18 bzw. 14 Aminosäuren. Der *Strep-tag* umfasst 8 Aminosäuren. c) Das TLM folgt im Konstrukt TW<sub>k/m</sub> unmittelbar nach der *multiple cloning site* (MCS).

Das Core-Protein des Hepatitis B-Virus ist aus 184 Aminosäuren (HBV Subtyp ayw) aufgebaut. Eine C-terminal gelegene, argininreiche 35 Aminosäuren umfassende Region ist für die Bindung viraler RNA, nicht aber für die strukturelle

Integrität der Kapside verantwortlich [157]. Da anfängliche Versuche das vollständige Core-Gen in *E. coli* zu exprimieren, zu keinem Erfolg führten, wurden C-terminal um 35 Aminosäuren verkürzte Gene in den Expressionsvektor pASK-IBA7 subkloniert (pASK-WT<sub>k</sub>, -TLM<sub>k</sub> und -TW<sub>k</sub>).

Um jedoch die DNA bindende Tendenz der positiv geladenen Arginine auszunutzen, wurden zusätzlich Konstrukte mit drei C-terminal vorhandenen Argininen konstruiert (siehe Abbildung 10). Da der C-Terminus in das Innere der Partikel gerichtet ist, sollte dies aufgrund einer verbesserten DNA-Core Interaktion die Verpackung von Nukleinsäuren in das Lumen der Kapside unterstützen. Die daraus abgeleiteten Konstrukte wurden pASK-WT<sub>m</sub>, TLM<sub>m</sub> und TW<sub>m</sub> genannt, da es sich bezug nehmend auf die um 35 Aminosäuren verkürzten Proteine und die im Virus-Genom vorhandene Core-Genlänge um eine mittlere Version handelt.

#### **pASK-WT<sub>k/m</sub>:**

Ausgehend von dem Plasmid pSM2 wurde das verkürzte HBV-Core-Gen (nt<sub>HBV</sub> 1903-2349/2358) amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass am 5´-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle und am 3´-Ende eine *HindIII*-Schnittstelle hinzugefügt wurden. Über die so erhaltenen Schnittstellen wurde das Amplifikat in den Vektor inseriert. Die beiden unterschiedlichen Varianten (k und m) wurden durch unterschiedliche Rückwärtsprimer generiert.

#### **pASK-TW<sub>k/m</sub>:**

Die Insertion der TW-Core-Konstrukte in den pASK-Vektor erfolgte ebenfalls über die Schnittstellen *BamHI* und *HindIII*. Die für das TLM kodierende Sequenz wurde zusammen mit der *BamHI*-Schnittstelle als Überhangoligonukleotidprimer in der PCR eingesetzt. Die HBe-spezifische Sequenz am 5´-Ende beginnt bei nt<sub>HBV</sub> 1861 wodurch ein 14 Aminosäuren langer Spacer zwischen das TLM und dem Core-Protein generiert wurde (Core-ATG - nt<sub>HBV</sub> 1903). Ein in diesem Bereich des HBV vorkommendes Cystein wurde durch Basenaustausch im Primer zu Tryptophan mutiert (C→G nt<sub>HBV</sub> 1884).

#### **pASK-TLM<sub>k/m</sub>:**

Die TLM-Core-Konstrukte wurden mit Hilfe einer zweistufigen PCR-Strategie hergestellt. Der Bereich nt<sub>HBV</sub> 1903-2139 wurde durch die entsprechenden Primer amplifiziert. Dabei wurde eine *BamHI* (5´-Ende) und eine *EcoRI*-Schnittstelle (3´-Ende) in das Amplifikat integriert. Das TLM wurde an den zweiten zu

amplifizierenden Bereich (nt<sub>HBV</sub>2140-2454) fusioniert, indem die für die TLM kodierende Domäne im Überhang des Vorwärtsprimers enthalten war. Durch die in beiden Amplifikaten vorkommenden *EcoRI*-Schnittstellen wurden die Fragmente aneinander ligiert und in einer zweiten PCR-Stufe als komplettes TLM-Core-Konstrukt mit dem Vorwärtsprimer des nt<sub>HBV</sub>1903-2139-Fragmentes und dem Rückwärtsprimer des nt<sub>HBV</sub>2140-2349/58-Fragmentes amplifiziert. Mit den vorhandenen Schnittstellen (5´-*BamHI* und 3´-*HindIII*) wurde das Fragment in den pASK-IBA7 Vektor inseriert.

#### **pVax-SHBs:**

Das kleine Oberflächenprotein SHBs aus HBV wurde mit Hilfe von Primern die *BglII*-Schnittstellen enthielten, amplifiziert. Da der Überhang bei beiden Schnittstellen komplementär ist konnte das Fragment in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pVax ligiert werden.

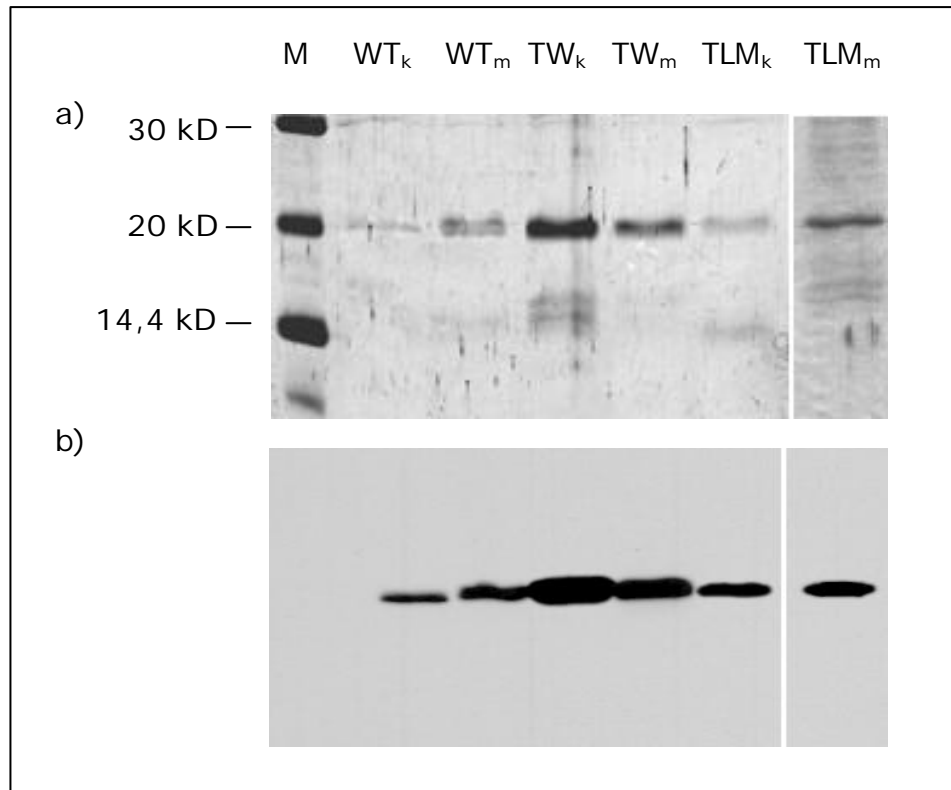
Die Orientierung wurde durch Restriktionsanalyse überprüft.

#### **1.1.2 Expressionsanalyse**

Um zu gewährleisten, dass die erzeugten Plasmid-Konstrukte funktionelle Proteine der entsprechenden Größe exprimieren, wurden die über *Strep Tactin* Säulen gereinigten Proteine zum einen durch Färbung eines SDS-Geles mit Coomassie und zum anderen mit Hilfe des Immunoblot analysiert.

Die einzelnen Konstrukte wurden in je 1,5 Liter LB-Medium induziert, die Zellen mittels Ultraschall (WT<sub>k/m</sub> und TW<sub>k/m</sub>) oder mittels „Gefrier-Tau-Zyklen“ und anschließender Lysozymbehandlung (TLM<sub>k/m</sub>) aufgeschlossen und affinitätschromatographisch gereinigt. Die Proben wurden gelelektrophoretisch unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend gefärbt, oder die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mittels eines kommerziell erhältlichen Antikörpers detektiert. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Coomassie-Färbung und des Western Blots für die verwendeten Konstrukte. Die Spuren zeigen Core-Monomere der erwarteten Größe von 20 kDa. Dass es sich hierbei um Core-Proteine handelt, konnte im Western Blot verifiziert werden.

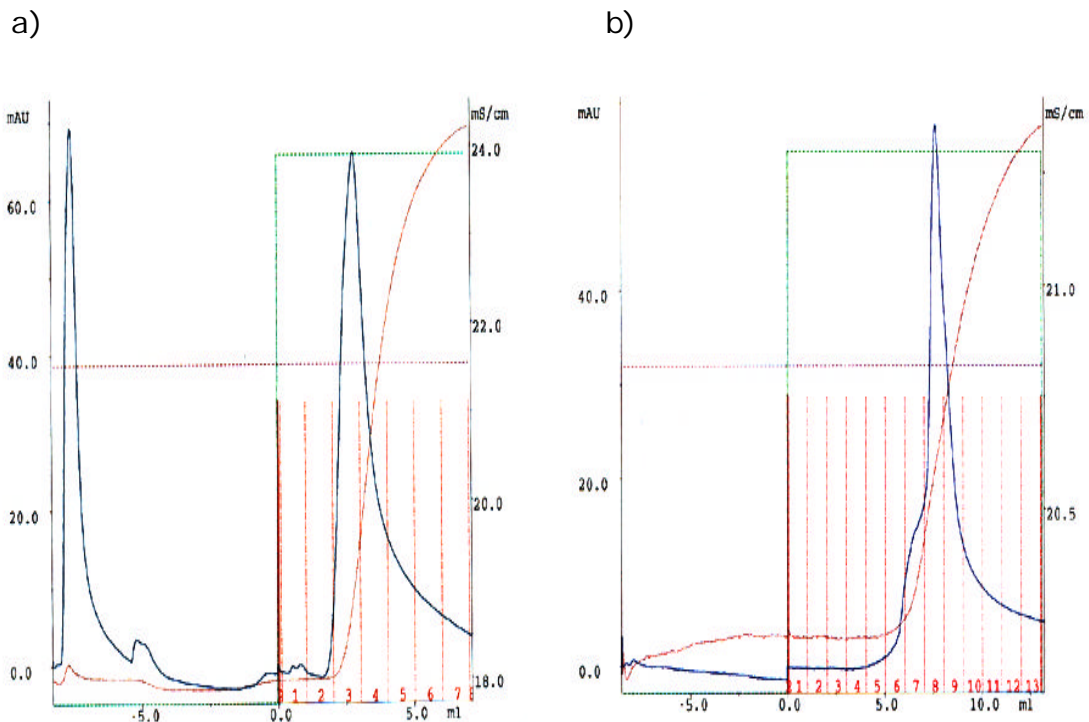
Mit diesen Konstrukten konnten aus 1,5 Litern Induktionskultur bis zu 3 mg Core-Protein in 90-95 %iger Reinheit erhalten werden.



**Abbildung 11: Coomassie Färbung und Western Blot.**

Die über Affinitätschromatographie gereinigten Proteine wurden gelelektrophoretisch über ein 15 %iges Gel getrennt, Coomassie gefärbt (a) oder einer Western Blot Analyse unterzogen (b). Primär-Ak: mouse-anti-HBcAg; mAB16989 CHEMICON. Sekundär-AK: POD-konjugierter goat anti-mouse Antikörper; AMERSHAM.

Die Affinitätschromatographie wurde hauptsächlich mit kommerziell erhältlichen Säulen der Firma IBA ausgeführt. Um die Vorteile eines FPLC-Systems (AMERSHAM, Äkta-Purifier) ausnutzen zu können, wurde das Säulenmaterial in eine für dieses System kompatible Säule gegeben und die Proteine chromatographisch gereinigt. Hierzu wurden die Proteine mit einem Fluß von 1 ml/min auf der Säule immobilisiert, gewaschen und mit Puffer E eluiert. Auf diese Weise konnten Elutionsprofile erhalten werden, wie sie in Abbildung 12 zu sehen sind.



**Abbildung 12: FPLC-Läufe der WT<sub>k</sub>- und TLM<sub>k</sub>-Core-Proteine**

Die Chromatogramme zeigen auf der x-Achse das Elutionsvolumen und auf der y-Achse die Absorption bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). A) WT<sub>k</sub>-Core. B) TLM<sub>k</sub>-Core.

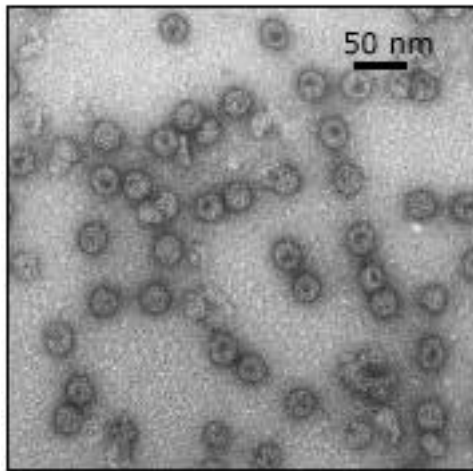
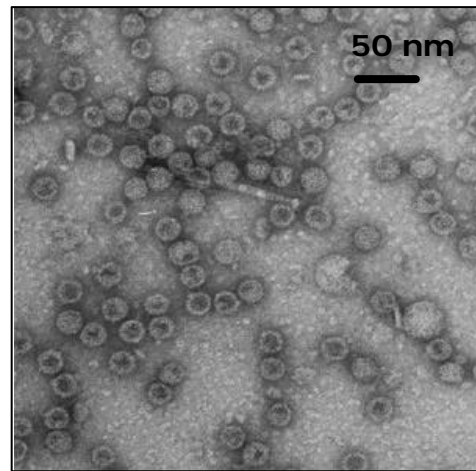
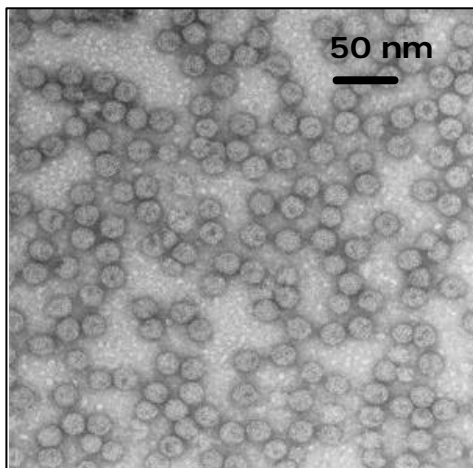
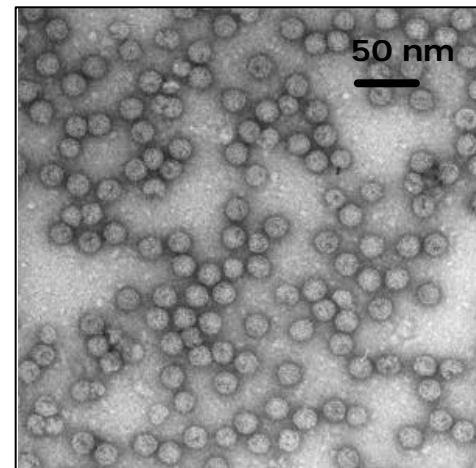
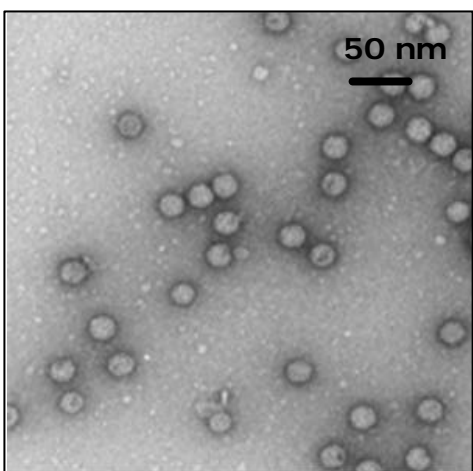
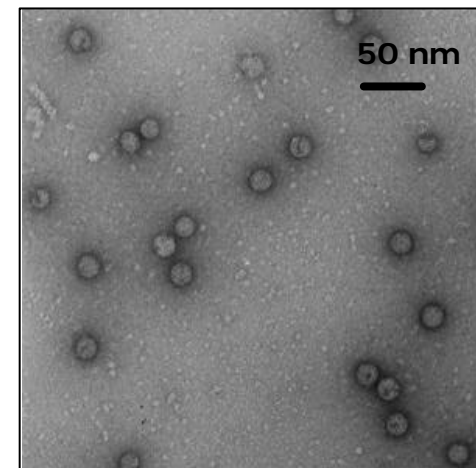
### 1.1.3 Die rekombinanten Core-Konstrukte assemblieren zu Kapsiden

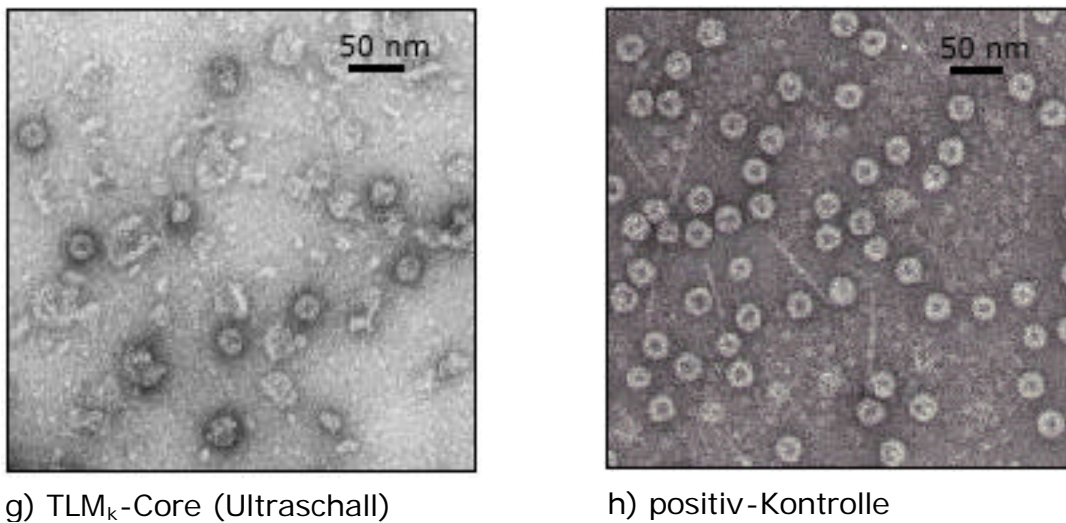
Um zu überprüfen, ob die auf verschiedene Weise modifizierten Core-Konstrukte zu kompletten Kapsiden assemblieren, wurden die Präparate elektronenmikroskopisch untersucht. Hierfür werden die im Elutionspuffer vorliegenden Kapsid-Präparate auf die in der TEM verwendeten Kupfergitter (*grid*) immobilisiert und im Elektronenmikroskop EM10A (ZEISS) untersucht.

Als Vergleich standen freundlicherweise Wildtyp-Kapside definierter Morphologie und Menge der Arbeitsgruppe von Dr. Pumpens (Riga) zur Verfügung. Deren korrekter Zusammenbau konnte durch Dichtegradientenzentrifugation sowie Elektronenmikroskopie gezeigt werden [104].

In Abbildung 13 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der 6 verschiedenen Konstrukte zu sehen. Die unterschiedliche Anzahl der Partikel ist auf unterschiedliche Konzentration der Kapsidpräparate, und mit der

unterschiedlichen Beschaffenheit der für die TEM verwendeten „Grids“ zu erklären.

a) wt<sub>k</sub>-Coreb) wt<sub>m</sub>-Corec) TW<sub>k</sub>-Cored) TW<sub>m</sub>-Coree) TLM<sub>k</sub>-Core, (Lysozym)f) TLM<sub>m</sub>-Core, (Lysozym)



**Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme von in *E. coli* exprimierten Core-Konstrukten**

Die Abbildungen a)-f) zeigen die sechs verschiedenen Core-Konstrukte. Die TLM-Core-Proteine nach Zellyse mittels Ultraschall g) bzw. Lysozym e) und f). h) die positiv-Kontrolle (AG Pumpens). Je 100  $\mu$ l der Proben wurden für die Uranylacetat-Färbung verwendet und im Transferelektronenmikroskop EM10A (ZEISS) untersucht.

Die Lyse der Bakterien (DH5 $\alpha$ ) erfolgte ursprünglich durch intensive Ultraschallbehandlung, um einen möglichst quantitativen Aufschluß zu erreichen. Erste elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten allerdings (siehe Abbildung 13g), dass die strukturelle Integrität der TLM-Varianten bei Ultraschallbehandlung nicht der Stabilität der WT- und TW-Varianten entsprach. Aus diesem Grund wurden Induktionskulturen der TLM-Core-Konstrukte durch das Anwenden von „Gefrier-Tau-Zyklen“ und anschließende Lysozymbehandlung aufgeschlossen.

Die auf diese Weise erhaltenen TLM-Core-Kapside besaßen die gleiche Morphologie wie die WT- und TW-Core-Kapside und konnten für weitere Untersuchungen verwendet werden.

#### **1.1.4 Rekombinante Kapside sind zellpermeabel**

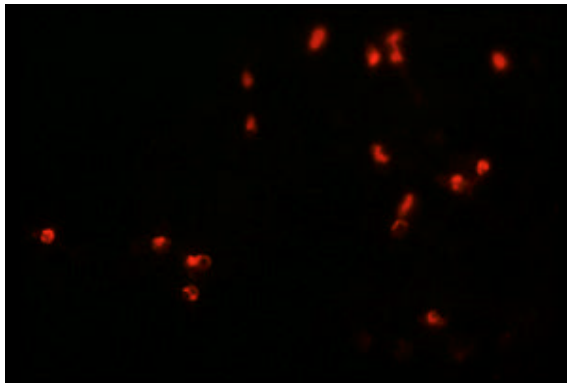
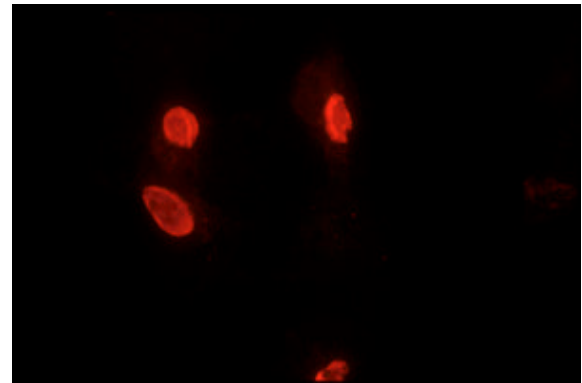
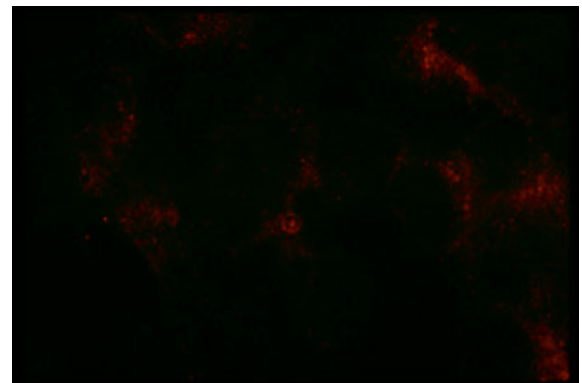
Um zu untersuchen, ob die mit dem TLM fusionierten Kapside die Fähigkeit besitzen, Zellmembranen zu überwinden, wurden Zellkulturexperimente durchgeführt.

Dazu wurden einerseits eine permanente Zelllinie (HepG2), sowie primäre aus Monozyten gewonnene dendritische Zellen mit den Kapsiden inkubiert. Die Fähigkeit der Kapside die Zellmembran zu durchdringen, wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht.

##### **1.1.4.1 Untersuchung der Zellpermeabilität von TLM-Core-Kapsiden an HepG2-Zellen**

Für die Analyse der "Membrangängigkeit" der TLM-Core-Kapside wurden HepG2-Zellen mit den verschiedenen Core-Kapsiden inkubiert. Dazu wurden die auf Objektträgern ausgelegten Zellen mit TLM<sub>k</sub>- als auch mit WT<sub>k</sub>-Core für 20, 40, 60 und 80 min bei 37°C in Zellkulturmedium inkubiert. Die in Puffer E vorliegenden Kapside wurden hierfür auf 0,1 µM eingestellt, und 1:1 mit RPMI-Medium (0,5 % FCS) versetzt, so dass sich eine Kapsid-Konzentration von 0,05 µM ergab. Die Lokalisation der Core-Proteine wurde anschließend durch Immunfluoreszenz-mikroskopie bestimmt.



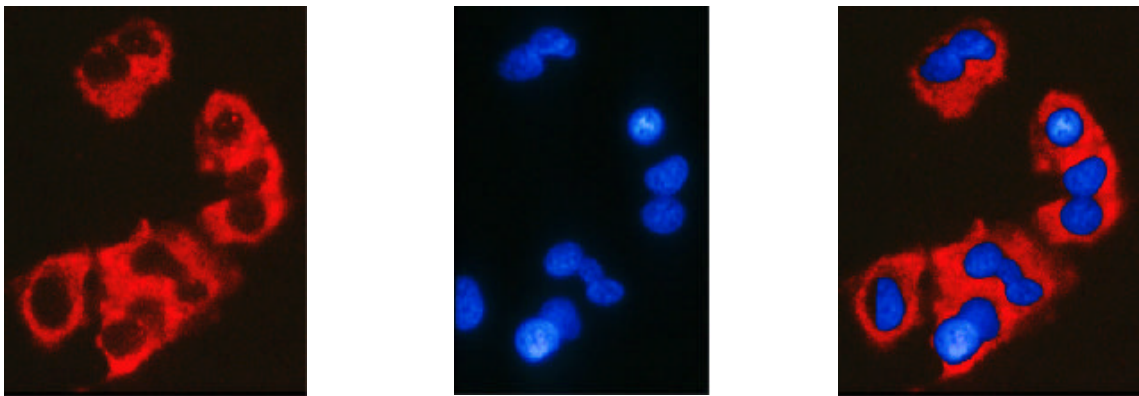
a) TLM<sub>k</sub>-Core (400x)b) TLM<sub>k</sub>-Core (1000x)c) WT<sub>k</sub>Core (400x)d) WT<sub>k</sub>-Core (1000x)

**Abbildung 14: Immunfluoreszenzaufnahmen von HepG2-Zellen nach der Inkubation mit TLM<sub>k</sub>- und WT<sub>k</sub>-Core**

Vergrößerungen von 400x bis 1000x. a) und b) Zellen, die mit TLM-Core und c) bzw. d) Zellen die mit WT<sub>k</sub>-Core für 40 min bei 37°C inkubiert wurden. Erster Antikörper: Polyklonales rabbit anti-HBcAg Serum (DAKO). Zweiter Antikörper: Cy3-gekoppelter anti-rabbit-IgG Antikörper (JACKSON IMMUNORESEARCH).

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten nach 40 min eine deutliche Internalisierung der Kapside im Fall des TLM-Core-Konstruktes (Abbildung 14a und b). Die WT-Core-Konstrukte wiesen nur einen schwach gefärbten Hintergrund auf (Abbildung 14c und d), der durch eine Kreuzreaktion der Antikörper zustande kam.

Die Lokalisation der Core-Partikel konnte anhand einer Kernfärbung mit DAPI verdeutlicht werden. Die Doppelfluoreszenzaufnahmen zeigten die kernnahe Lokalisation der Core-Proteine. Nach 60 und 80 min änderte sich das Bild nicht. Die Zellen, die mit TLM-Core-Konstrukten inkubiert wurden, zeigten eine kernnahe Verteilung der Proteine. Allerdings konnte nach 20 minütiger Inkubation auch im Fall der TLM-Core-Konstrukte noch keine zytoplasmatische oder kernnahe Verteilung der Antigene beobachtet werden.



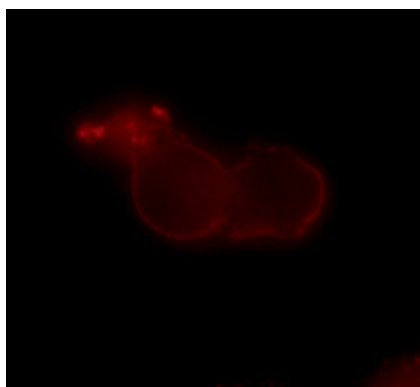
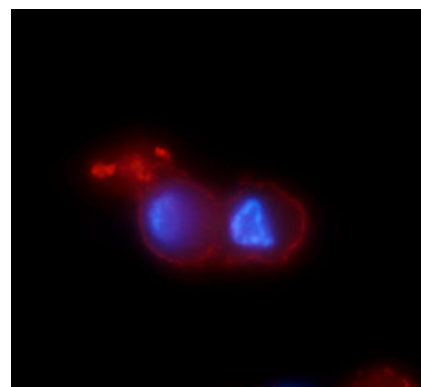
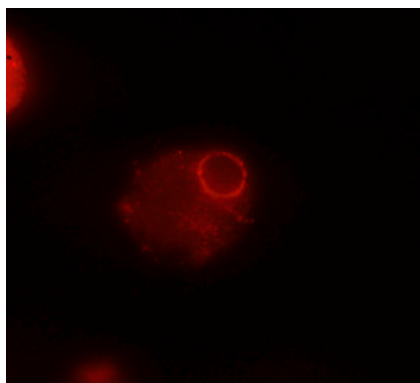
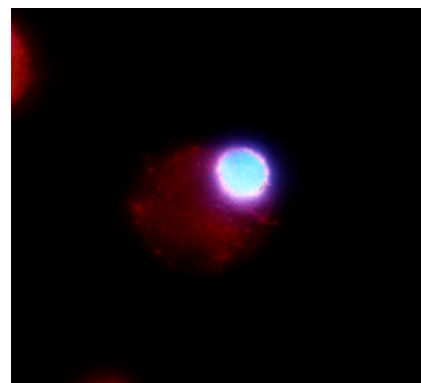
a) Färbung des TLM<sub>k</sub>-Cores   b) DAPI-Kernfärbung   c) Doppelfluoreszenz a)+c)

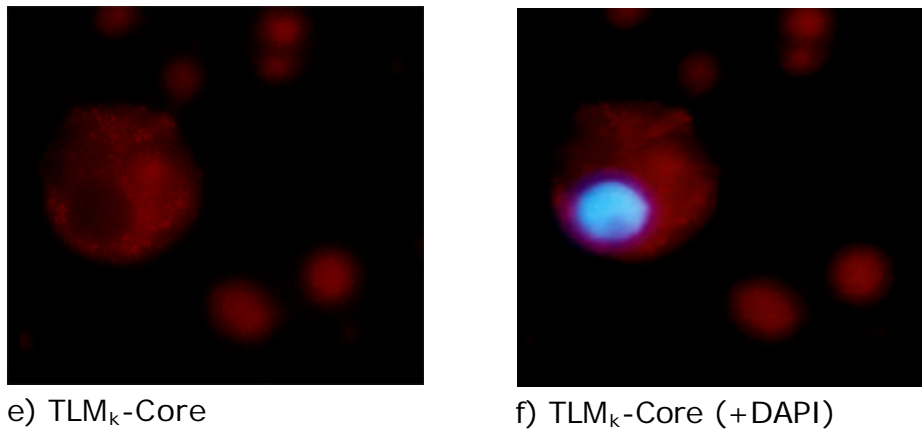
**Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von TLM<sub>k</sub>-Core-Kapsiden inkubierten HepG2-Zellen und Kernfärbung durch DAPI**

1000fache Vergrößerung der mit TLM<sub>k</sub>-Core inkubierten HepG2-Zellen nach 40 min Inkubationszeit. a) Immunfärbung des TLM-Cores (polyklonales anti-HBc Serum, DAKO und Cy3-gekoppelter anti-rabbit-IgG Antikörper (JACKSON IMMUNORESEARCH). Die Färbung der DNA und damit indirekt die Färbung des Kerns mittels DAPI (b). c) Überlagerung von (a) und (b)

#### 1.1.4.2 Untersuchung der Zellpermeabilität von TLM-Core-Kapsiden an dendritischen Zellen

Um die Zellpermeabilität der TLM-Core-Kapside an dendritischen Zellen zu testen wurden PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) aus humanem *Buffy Coat* über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, bei 37°C kultiviert und mit Hilfe eines Selektionsmediums, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 enthielt, zu dendritischen Zellen differenziert.

a) WT<sub>k</sub>-Coreb) WT<sub>k</sub>-Core (+DAPI)c) TW<sub>k</sub>-Cored) TW<sub>k</sub>-Core (+DAPI)



**Abbildung 16: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von dendritischen Zellen, die mit den WT<sub>k</sub>-, TW<sub>k</sub>- und TLM<sub>k</sub>-Core inkubiert wurden**

1000fache Vergrößerung von dendritischen Zellen nach 4 stündiger Inkubation bei 4°C mit den jeweiligen Core-Konstrukten und anschließender Immunfärbung (erster Antikörper: polyklonales rabbit anti-HBc Serum, DAKO), zweiter Antikörper: Cy3-konjugierter anti-rabbit Antikörper, JACKSON IMMUNORESEARCH). a) WT<sub>k</sub>-Core und b) WT<sub>k</sub>-Core mit Kernfärbung (DAPI). c) TW<sub>k</sub>-Core, d) TW<sub>k</sub>-Core +DAPI und e) TLM<sub>k</sub>-Core und f) TLM<sub>k</sub>-Core +DAPI.

Durch die Inkubation der dendritischen Zellen mit den verschiedenen Core-Proteinen konnte die Zellpermeabilität der TLM-Core gezeigt werden. TW<sub>k</sub>-Core weist hierbei eine starke Anreicherung an der Kernmembran auf, die im Fall von TLM<sub>k</sub>-Core in dieser Form nicht beobachtet werden konnte. Bei dieser Core-Variante ist eine eher zytoplasmatische Verteilung der Proteine zu erkennen. Die Inkubation mit WT<sub>k</sub>-Core-Proteinen ergab eine leichte Färbung der Plasmamembran, was auf unspezifische Antikörperfärbung zurückzuführen ist.

### 1.1.5 Deassemblierung und Assemblierung von Kapsiden

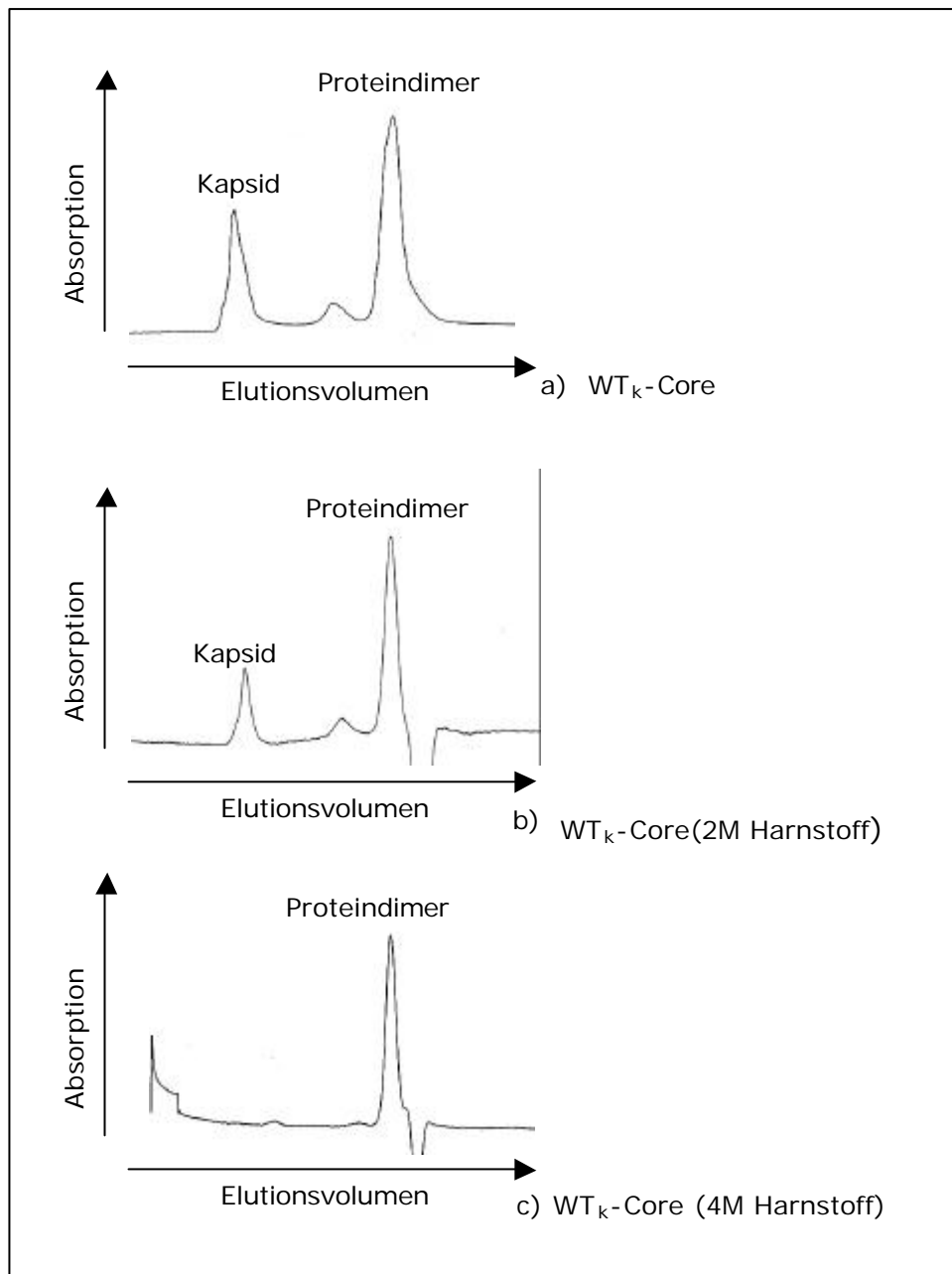
Die Proteine des Hepatitis B Core-Kapsides besitzen die Eigenschaft des Selbstzusammenbaus beim Überschreiten einer kritischen Konzentration der Protein-Monomere *in vitro* [108]. Diese Grenze wurde in vorhergehenden Untersuchungen auf 0,8  $\mu\text{M}$  der dissoziierten Proteine bestimmt. Die Assemblierung der Proteine ist dabei nicht von zellulären Faktoren wie Chaperonen u.a. abhängig, sondern basiert auf der hohen Tendenz der Monomere, sich zu Dimeren zusammen zu lagern und davon ausgehend komplette Kapside zu bilden.

Die affinitätschromatographische Reinigung der verschiedenen Core-Proteine ergab eine Konzentration zwischen 10-30  $\mu\text{M}$  bezogen auf das Core-Protein-Monomer, wodurch die kritische Grenze für die Assemblierung der Proteine um mindestens eine Zehnerpotenz überschritten wurde.

In einem ersten Schritt wurden die unter nativen Bedingungen gereinigten und als Kapsid/Dimer-Gemisch (siehe Abbildung 17) vorliegenden Proteine mit ansteigenden Konzentrationen von Harnstoff in einer Tris-gepufferten Lösung denaturiert und somit die Kapside in die Core-Proteindimere getrennt. Das Ausmaß der Deassemblierung konnte zum einen mittels Gelfiltrationschromatographie über Superdex200-Säulen (AMERSHAM) und zum anderen mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen analysiert werden.

#### 1.1.5.1 Untersuchung des Deassemblierungs-/Reassemblierungs-Prozesses durch Gelfiltrationschromatographie

Um die Proteine möglichst schonend und reversibel zu denaturieren, wurde die Deassemblierung bei Inkubation mit 2 und 4 M Harnstoff in Puffer W untersucht. 200  $\mu\text{l}$  der in Puffer E vorliegenden Kapsidpräparate wurden hierfür entweder mit 100  $\mu\text{l}$  oder mit 400  $\mu\text{l}$  eines 6 M Harnstoff-haltigen Puffers versetzt und 4 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  der Lösungen gelchromatographisch analysiert.



**Abbildung 17: Gelchromatographische Analyse des Deassemblierungs-Prozesses**

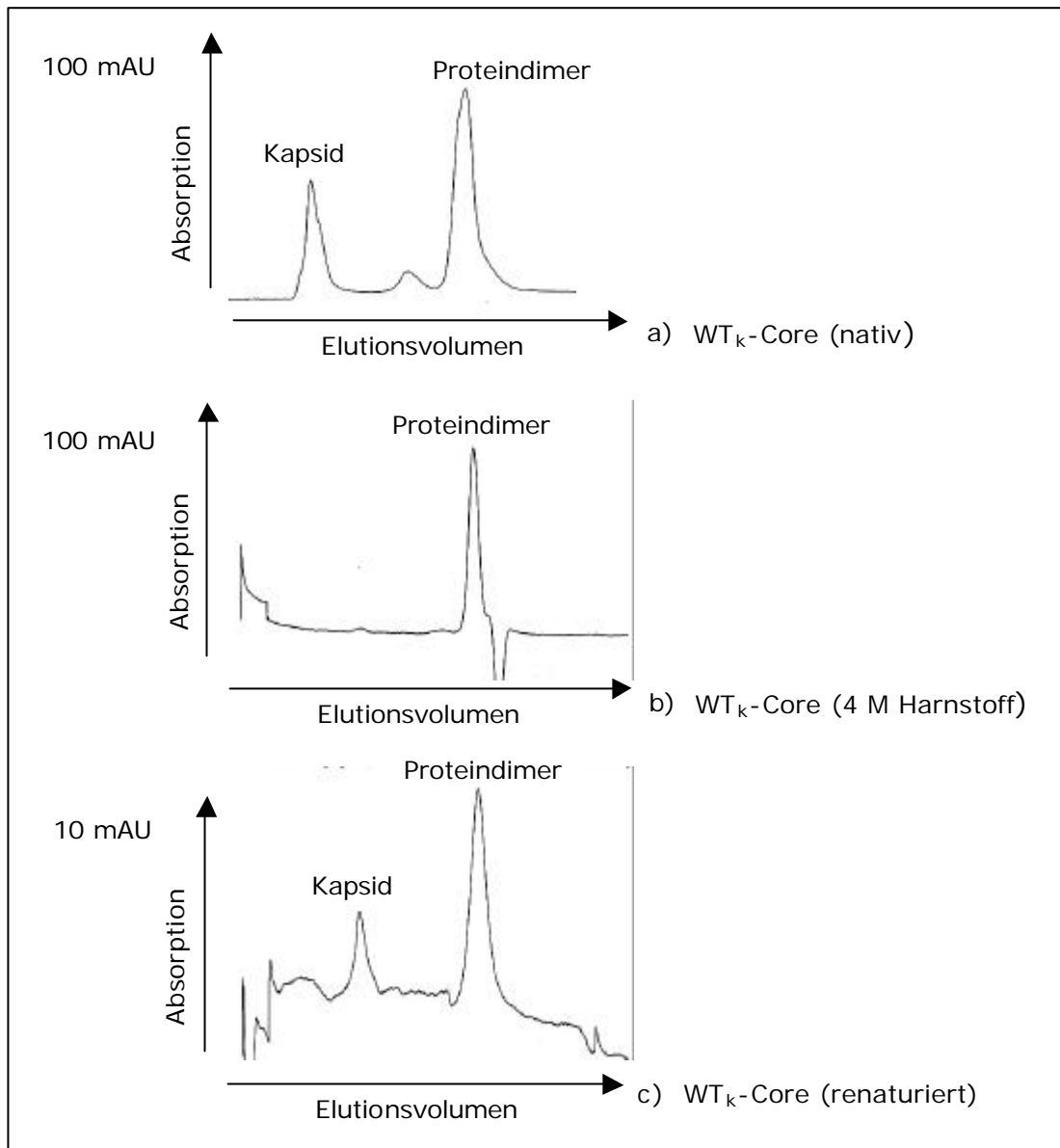
Abbildung a) zeigt das Chromatogramm der nativen WT<sub>k</sub>-Core-Probe. b) und c) zeigen die Chromatogramme nach der Denaturierung der Probe mit 2 M Harnstoff (b) und 4 M Harnstoff (c).

Nach der Vermessung von Proteinstandards, ließ sich anhand der Retentionszeiten ableiten, dass es sich bei den denaturierten Bestandteilen um das Core-Proteindimer mit der Größe von ca. 40 kDa handelt.

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass sich nach Inkubation der Probe mit 2 M Harnstoff das Verhältnis von Kapsid-Peak zu Dimer-Peak zu Gunsten des Dimer-Peaks verändert, was auf die partielle Deassemblierung der Kapside unter diesen

Bedingungen zurückzuführen ist. In Gegenwart von 4 M Harnstoff ist der Kapsid-Peak nur noch andeutungsweise zu sehen. Die Kapside zerfielen nahezu vollständig in ihre Dimere (exemplarisch anhand von WT<sub>k</sub>-Core-Partikeln gezeigt).

Die auf diese Weise deassemblierten Kapside wurden anschließend für 16 h bei 4°C durch Dialyse gegen Reassemblierungspuffer renaturiert und wiederum einer gelchromatographischen Analyse (Superdex200) unterzogen.



**Abbildung 18: Gelchromatographische Analyse des Reassemblierungs-Prozesses**

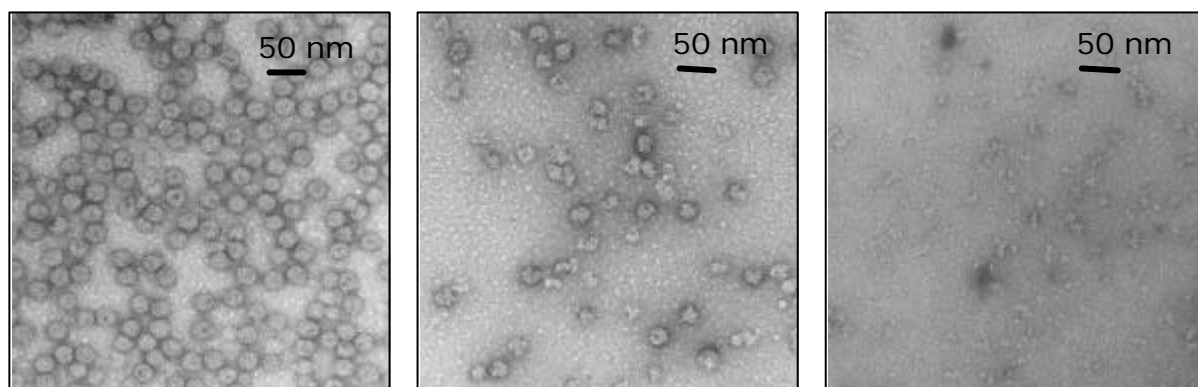
Abbildung a) zeigt das Chromatogramm der nativen WT<sub>k</sub>-Core-Probe. b) nach der Denaturierung der Probe mit 4 M Harnstoff. c) Chromatogramm der gegen Reassemblierungspuffer dialysierten (16h) Probe.

Die in Abbildung 18 dargestellten Chromatogramme zeigen, dass die Kapside der nativen Probe durch Gegenwart von 4 M Harnstoff denaturiert und in Dimere getrennt wurden. Durch die Dialyse der Probe gegen Reassemblierungspuffer lagerten sich die Proteine wieder zu größeren (>600 kDa) Aggregaten zusammen. Das Verhältnis zwischen Kapsid und Dimer nähert sich dem Verhältnis in der nativen Probe nahezu an. Aus den Chromatogrammen läßt sich allerdings nicht erkennen, ob es sich hierbei um rekonstituierte Kapside handelt oder ob es zu einer mehr oder weniger willkürlichen Anordnung der Proteine gekommen ist.

#### 1.1.5.2 Untersuchung des Deassemblierungs/Reassemblierungs-Prozesses durch Elektronenmikroskopie

Um den Prozess der De- und Renaturierung der Core-Kapside auch im Hinblick auf die Morphologie der Partikel analysieren zu können, wurden diese elektronenmikroskopisch untersucht.

Der Verlauf der Denaturierung konnte beispielhaft anhand des TW<sub>k</sub>-Core-Konstruktes gezeigt werden. Für die Untersuchungen wurden 100 µl der Probe wie unter 1.1.5.1 beschrieben mit 2 und 4 M Harnstoff versetzt und der Verlauf der Deassemblierung mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.



a) TW<sub>k</sub>-Core (nativ)      b) TW<sub>k</sub>-Core (2 M Urea)      c) TW<sub>k</sub>-Core (4 M Urea)

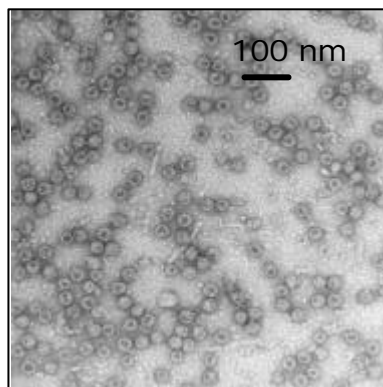
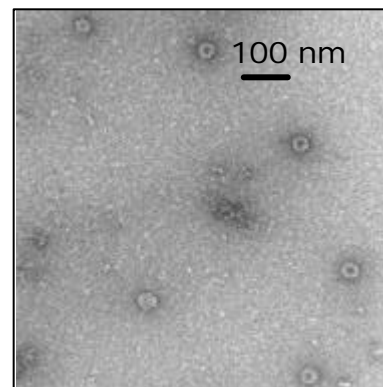
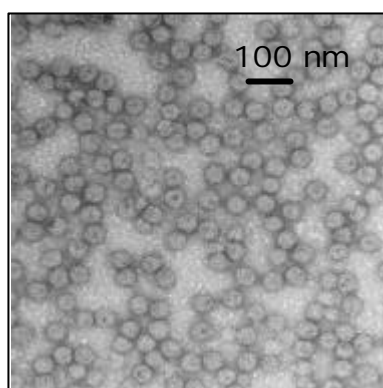
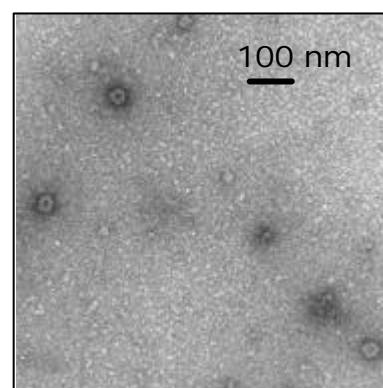
#### Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Deassemblierungs-prozesses

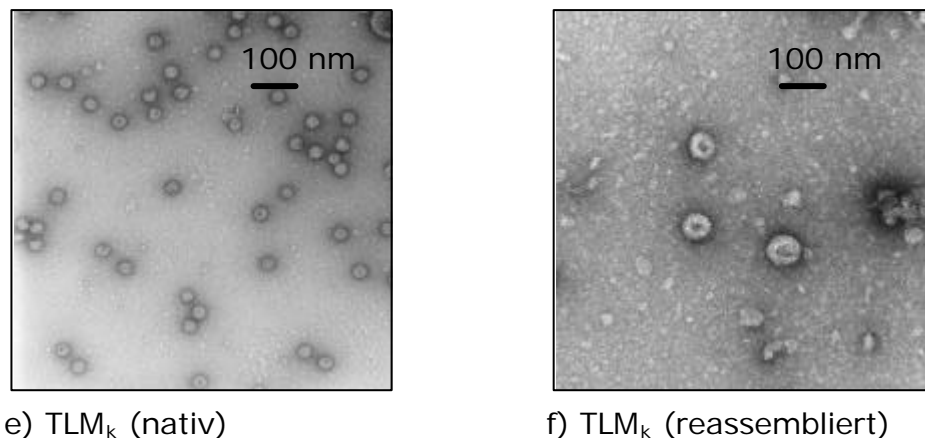
Unter a) sind die unbehandelten TW-Core-Kapside zu sehen. TW<sub>k</sub>-Core-Partikel nach Behandlung mit b) 2 M Urea (Harnstoff) und c) 4 M Urea (Harnstoff).



Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, konnten die Kapside mit Hilfe von 4 M Harnstoff vollständig deassembliert werden. Durch Inkubation mit 2 M Harnstoff wurden die Core-Partikel, übereinstimmend mit den gelchromatographischen Untersuchungen, partiell denaturiert. Die unter diesen Bedingungen vorliegenden partikulären Strukturen wiesen nur noch vereinzelt morphologisch korrekte Core-Partikel auf.

Die Tendenz der denaturierten Core-Proteine sich im Verlauf der Dialyse gegen Reassemblierungspuffer zu größeren Strukturen zusammenzulagern, konnte unter 1.1.5.1 mittels der Gelelektrophorese gezeigt werden. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte nun gezeigt werden, dass es sich hierbei um korrekt assemblierte Kapside handelt.

a) WT<sub>k</sub> (nativ)b) WT<sub>k</sub> (reassembliert)c) TW<sub>k</sub> (nativ)d) TW<sub>k</sub> (reassembliert)



**Abbildung 20: Vergleich der Kapsid-Morphologie mittels Elektronenmikroskopie**

Unter a) (WT<sub>k</sub>), c) (TW<sub>k</sub>) und e) (TLM<sub>k</sub>) sind die nativen Zustände der Kapsid-Varianten gezeigt. Die Abbildungen b) (WT<sub>k</sub>), d) (TW<sub>k</sub>) und f) (TLM<sub>k</sub>) zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen der reassemblierten Core-Partikel.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass im Fall der WT<sub>k</sub>- und TW<sub>k</sub>-Varianten durch die Renaturierung gegen Reassemblierungspuffer Kapside erhalten werden konnten, die in ihrem Aussehen und ihrer Größe mit den nativen Proben übereinstimmen. Im Fall von TLM<sub>k</sub>-Core konnten auch partikuläre Strukturen erhalten werden. Diese besitzen jedoch einen Durchmesser von ca. 80 nm und sind verglichen mit der nativen Probe um ca. 50 nm größer.

Die Ausbeute an reassemblierten Kapsiden ist in allen drei Fällen mit ca. 10 % sehr gering.

### 1.1.6 Verpackung von DNA in *E. coli* exprimierten Kapsiden

Unter 1.1.5 konnte die Fähigkeit der Reassemblierung der Core-Proteine zu kompletten Kapsiden gezeigt werden. Die TLM-Core-Konstrukte wiesen hierbei zwar unterschiedliche Strukturen auf, jedoch setzen sich auch diese Proteine zu partikulären Strukturen zusammen.

Es sollte nun untersucht werden, ob beim Vorgang der Reassemblierung durch Gegenwart von DNA diese zum einen statistisch (k-Konstrukte) oder vermittelt

durch positiv geladene C-terminal gelegene Argininreste (m-Konstrukte) in die Partikel eingebracht werden kann.

Dazu wurden wie unter 1.1.5 beschrieben die aus *E. coli* gewonnenen und mittels *Strep-tag* gereinigten Kapside mit 4 M Harnstoff denaturiert und in Gegenwart von DNA (5faches molares Verhältnis) gegen Reassemblierungspuffer renaturiert. Als zu verpackendes Plasmid stand der Vektor pVaxSHBs zur Verfügung. Dieses Plasmid hat mit einer Größe von 3,8 kB, den Vorteil einer dem HBV-Genom vergleichbaren Nukleotidanzahl. Die Größe des HBV Prägenoms beträgt 3,5 kB. Die Dimension des Plasmides sollte also keinen limitierenden Faktor bei der Verpackung darstellen.

Zur Quantifizierung der verpackten DNA wurde ein semiquantitatives Messverfahren (TaqMan, APPLIED BIOSYSTEMS) verwendet.

Die nicht verpackte DNA wurde durch Zugabe von DNase abgebaut, wobei die in den Kapsiden vorliegende DNA vor dem DNase-Verdau geschützt war. Durch Zugabe von EDTA und Erhitzen der Probe auf 95°C wurde die DNase inaktiviert und die Kapsid DNA freigesetzt.

**Tabelle 1: Kopienzahl der in die Kapside verpackten DNA**

Konstrukt	Ct-Zahl	Kopienzahl/ $\mu$ l
WT <sub>k</sub> -Core	19,58	$2,33 \times 10^7$
TW <sub>k</sub> -Core	21,99	$3,67 \times 10^6$
TLM <sub>k</sub> -Core	23,55	$1,06 \times 10^6$
WT <sub>m</sub> -Core	20,12	$1,61 \times 10^7$
TW <sub>m</sub> -Core	21,33	$1,83 \times 10^6$
TLM <sub>m</sub> Core	24,07	$4,62 \times 10^5$

Mit Hilfe der semiquantitativen PCR konnte die Integration von DNA in die Core-Kapside nachgewiesen und quantifiziert werden.

Im Zuge der DNA Amplifikation kommt es zu einer exponentiell steigenden Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffes. Der Ct-Wert gibt an, bei welcher

Zyklenzahl (*Cycle*) die Fluoreszenzintensität einen Schwellenwert (*threshold*) überschreitet und ist somit ein Maß für die Menge an eingesetzter, zu quantifizierender DNA. Die Mengen der verpackten DNA korrelierte mit der Menge an eingesetztem Protein (vgl. Tabelle 2). Für die Berechnung der Kapsidanzahl siehe G3.2.2.

**Tabelle 2: Korellation der Kopienzahl mit der Kapsidanzahl**

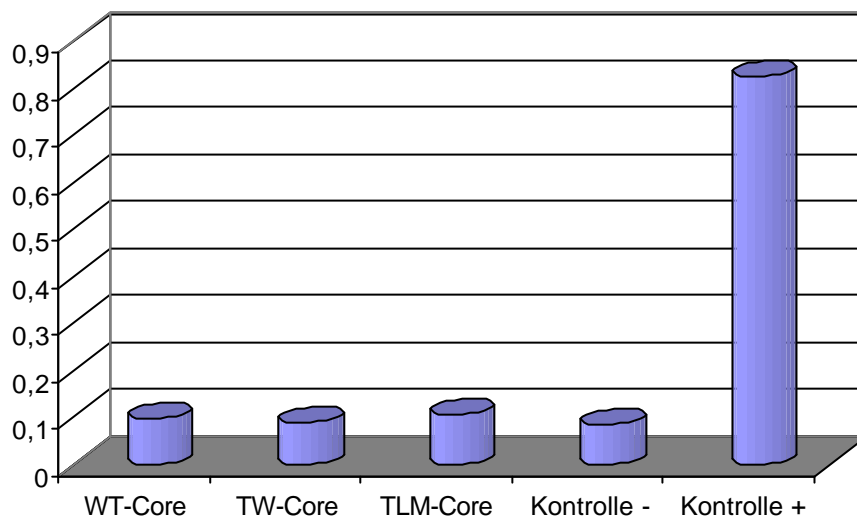
Konstrukt	Kopienzahl (DNA) / $\mu$ l	Kapsidanzahl/ $\mu$ l	Verhältnis
WT <sub>k</sub> -Core	$2,33 \times 10^7$	$1,48 \times 10^7$	1,6
TW <sub>k</sub> -Core	$3,67 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	1
TLM <sub>k</sub> -Core	$1,06 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	1
WT <sub>m</sub> -Core	$1,61 \times 10^7$	$7,99 \times 10^6$	2
TW <sub>m</sub> -Core	$1,83 \times 10^6$	$1,39 \times 10^6$	1,4
TLM <sub>m</sub> -Core	$4,62 \times 10^5$	$4,23 \times 10^5$	1

Für die Berechnung des Verhältnisses der verpackten DNA-Menge zu der eingesetzten Menge an Kapsiden wurde davon ausgegangen, dass die Ausbeute an reassemblierten Kapsiden ca. 10 % gegenüber der eingesetzten Kapsidzahl betrug (ermittelt durch Gelfiltrationsläufe). Auf diese Weise konnte ein Verhältnis von gemessenen DNA Kopien zu Kapsidanzahl von ca. 1-2 ermittelt werden. Aufgrund von Messungenauigkeiten des TaqMan Verfahrens wurde allerdings davon ausgegangen, dass pro Kapsid nur ein Vektormolekül verpackt werden konnte. Zwischen den k- und den m-Konstrukten wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

### 1.1.7 Inkubation von HepG2 Zellen mit Nukleokapsiden

Um zu untersuchen, ob mit Hilfe der Nukleokapside DNA in eukaryontische Zellen eingebracht und dort zur Expression gebracht werden kann, wurden die unter 1.1.6 beschriebenen DNA enthaltenden Kapside in der Zellkultur getestet.

Als Reporter wurde das unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehende SHBs-Gen des Hepatitis B-Virus verwendet, da das Genprodukt leicht durch ELISA nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 21: Messung des HBsAg-Levels des Zellkulturüberstandes nach der Inkubation mit den Nukleokapsid-Varianten**

Ca.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 12-Loch Platten mit 2 ml eines 1:1-Gemisches aus Zellkulturmedium (ohne FCS) und Nukleokapsidpräparation für 16 h Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand gewechselt und weiter zwei Tage bei 37°C inkubiert, bevor der Zellkulturüberstand mittels ELISA (Encygnost® HBsAg 5.0, DADE-BEHRING) auf Sekretion von SHBs untersucht wurde

Nach Inkubation von HepG2-Zellen mit DNA enthaltenden Kapsiden konnte keine SHBs-Sekretion festgestellt werden. Auch in Immunfluoreszenz-untersuchungen konnte keine SHBs Genexpression beobachtet werden.

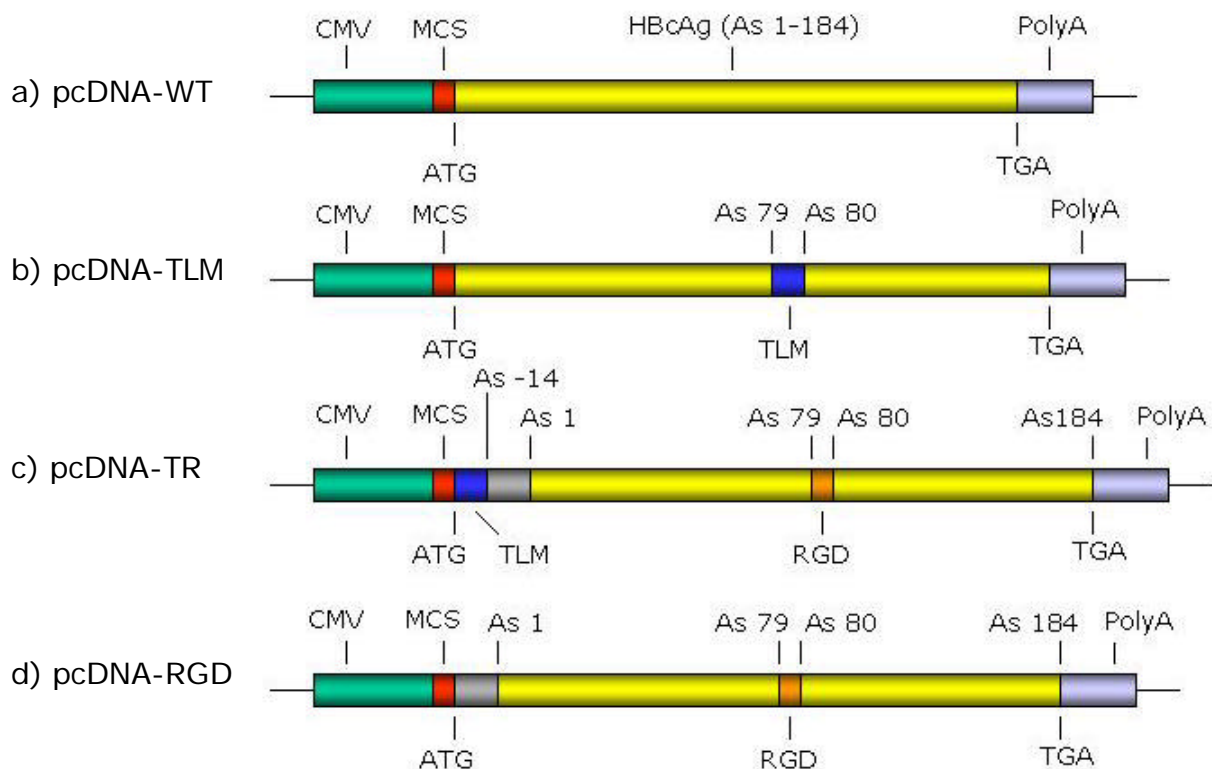
## 1.2 Expression der Kapside in eukaryontischen Zellen

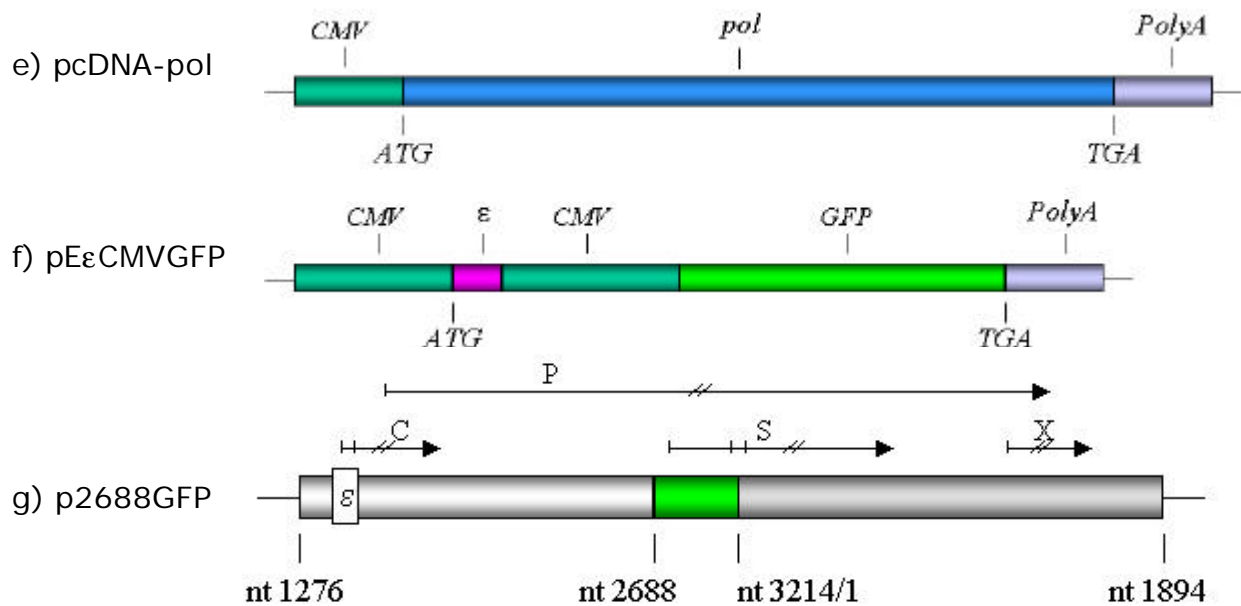
### 1.2.1 Klonierung der eukaryontischen Expressionskonstrukte

Das Hepatitis B-Virus integriert im Zuge des viralen Reifungsprozesses das sog. Prägenom mit einer Größe von 3,5 kB in das virale Kapsid. Die Integration der prägenomischen RNA wird durch die virale Polymerase (HBV-PoI) vermittelt, die einerseits mit dem Core-Protein interagiert und andererseits an eine definierte RNA-Sekundärstruktur ( $\epsilon$ ) des Prägenoms bindet.

Um die natürlichen, vom Hepatitis B-Virus genutzten Mechanismen der Nukleinsäure-Integration zu nutzen, wurden die Core-Konstrukte zusammen mit der viralen Polymerase und einem Verpackungskonstrukt (Reportergen) in eukaryontische Expressions-Plasmide kloniert.

Nach der „Triple“-Transfektion von 293- und HepG2-Zellen sollten Nukleokapside entstehen, die vermittelt durch die virale Polymerase das RNA-Transkript des Reportergens verpacken. Um das RNA-Transkript spezifisch in die Core-Partikel zu integrieren, besitzt das Verpackungskonstrukt am 5´-Ende das oben beschriebene  $\epsilon$ -Verpackungssignal gefolgt von einem CMV-Promotor und einer für das GFP-Gen kodierenden Sequenz.





**Abbildung 22: Schematische Darstellung der verwendeten eukaryontischen Core-, Helfer- und Verpackungskonstrukte**

Die Abbildungen a)–e) zeigen die vier verschiedenen Core-Konstrukte unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. a) WT-Core, b) TLM-Core, c) TR-Core und d) RGD-Core. Das Helferplasmid pcDNA-pol ist in Abbildung e) gezeigt. Die Verpackungskonstrukte pE $\epsilon$ CMVGFP und p2688GFP sind in Abbildung f) und g) dargestellt.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, wurden vier verschiedene Core-Konstrukte hergestellt. Zum einen wurde das WT-Core-Gen in einen eukaryontischen Expressionsvektor (pcDNA3.1(-)) kloniert. Um das TLM auf dem *spike tip* zu exponieren, wurde hierfür das Plasmid pcDNA-TLM konstruiert.

Bei dem Konstrukt pcDNA-TR handelt es sich um ein Expressionsplasmid, bei dem das TLM über einen 14 Aminosäuren großen Linker an den N-Terminus des Core-Proteins fusioniert wurde. Dieses Konstrukt besitzt zusätzlich im *spike tip* das RGD-Motiv, was durch die Interaktion dieses Motives mit Integrinen die Anreicherung der Core-Partikel auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen vermitteln sollte. Als Kontrolle diente hierfür das Plasmid pcDNA-RGD, bei dem die für das TLM kodierende Sequenz nicht vorhanden ist.

Als Helferkonstrukt wurde das für die virale Polymerase kodierende Plasmid pcDNA-pol verwendet.

Das Verpackungskonstrukt pE $\epsilon$ CMVGFP setzt sich zusammen aus dem CMV-Promotor des pEGFP-Vektors gefolgt von dem  $\epsilon$ -Verpackungssignal, einem

weiteren CMV-Promotor und der für das GFP kodierende Gen. Im Zuge der RNA Verpackung sollte die RNA revers transkribiert und durch den 3´ vom  $\epsilon$ -Signal gelegenen CMV-Promotor das GFP-Gen nach der Transfektion mit den TLM-Core-Konstrukten exprimiert werden.

Das Verpackungsplasmid p2688GFP ist vom HBV Plasmid pSPT1.2xHBV abgeleitet und unterscheidet sich vom diesem durch STOP-Mutationen in allen viralen Leserahmen, wodurch die Synthese der viralen Proteine ausgeschlossen werden kann [158]. Der Bereich zwischen nt<sub>HBV</sub>2688 und nt<sub>HBV</sub>1 (Subtyp adr4) ist durch das GFP-Gen ersetzt und steht unter der Kontrolle des endogenen hepatozytenspezifischen S1<sub>P</sub>-Promotors.

#### **pcDNA-WT:**

Ausgehend von dem Plasmid pSM2 wurde das HBcAg-Gen (nt<sub>HBV</sub> 1903-2454) amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass 5´eine *BamHI*-Schnittstelle und 3´eine *HindIII*-Schnittstelle hinzugefügt wurden. Über die so erhaltenen Schnittstellen wurde das Amplifikat in den pcDNA3.1(-)-Vektor inseriert.

#### **pcDNA-TLM:**

Die TLM-Core-Konstrukte wurden mit Hilfe einer zweistufigen PCR-Strategie hergestellt. Der Bereich nt<sub>HBV</sub>1903-2139 wurde durch die entsprechenden Primer amplifiziert. Dabei wurde eine *BamHI* (5´) und eine *EcoRI*-Schnittstelle (3´) in das Amplifikat integriert. Das TLM wurde mit Hilfe eines Überhangnukleotidprimers an den zweiten zu amplifizierenden Bereich nt<sub>HBV</sub>2140-2454 fusioniert. Durch die in beiden Amplifikaten vorkommenden *EcoRI*-Schnittstellen wurden die Fragmente aneinander ligiert und in einer zweiten PCR-Stufe als komplettes TLM-Core-Konstrukt mit dem Vorwärtsprimer des nt<sub>HBV</sub>1903-2139-Fragmentes und dem Rückwärtsprimer des nt<sub>HBV</sub>2140-2454-Fragmentes amplifiziert. Mit den vorhandenen Schnittstellen (5´-*BamHI* und 3´-*HindIII*) wurde das Fragment in den pcDNA3.1(-)-Vektor inseriert.

#### **pcDNA-TR:**

Die Insertion des TR-Core-Konstrukt in den pcDNA3.1(-)-Vektor erfolgte wie beim pcDNA-TLM beschrieben mit Hilfe einer zweistufigen PCR. In der ersten Stufe wurden die Fragmente nt<sub>HBV</sub>1861-2139 und nt<sub>HBV</sub>2140-2454 amplifiziert. Eine *BamHI*-Schnittstelle mit dem für das TLM kodierenden Bereich wurde als (5´) Überhangnukleotidprimer in die PCR eingesetzt. Die Konsensussequenz am



5´-Ende beginnt bei nt<sub>HBV</sub> 1861, wodurch ein 14 Aminosäuren langer Spacer zwischen dem TLM und dem Core-Protein eingefügt wurde. Ein in diesem Bereich des HBV vorkommendes Cystein wurde durch Basenaustausch im Primer zu Tryptophan mutiert (C→G nt<sub>HBV</sub> 1884). Durch den Rückwärtsprimer nt<sub>HBV</sub> 2139 wurde am 3´-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle generiert. Der Bereich nt<sub>HBV</sub> 2140-2454 wurde mit Hilfe eines Überhangnukleotidprimers amplifiziert, der eine für das Tripeptid RGD kodierende Sequenz sowie eine *EcoRI*-Schnittstelle beinhaltet. Durch den Rückwärtsprimer wurde eine *HindIII*-Schnittstelle eingefügt.

Die beiden Fragmente wurden mit den vorhandenen *EcoRI*-Schnittstellen ligiert und durch eine zweite PCR-Stufe mit dem Vorwärtsprimer des nt<sub>HBV</sub> 1861-2139-Fragmentes und dem Rückwärtsprimer des nt<sub>HBV</sub> 2140-2454-Fragmentes amplifiziert und über die vorhandenen *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den pcDNA3.1(-)-Vektor inseriert.

#### **pcDNA-pol:**

Das HBV-pol Gen wurde durch PCR amplifiziert und hierbei eine *NotI*- (5´) und eine *HindIII*-Schnittstelle (3´) eingefügt. Das Amplifikat wurde mit diesen Enzymen geschnitten und in den ebenfalls mit diesen Enzymen restringierten pcDNA3.1(-) Vektor inseriert.

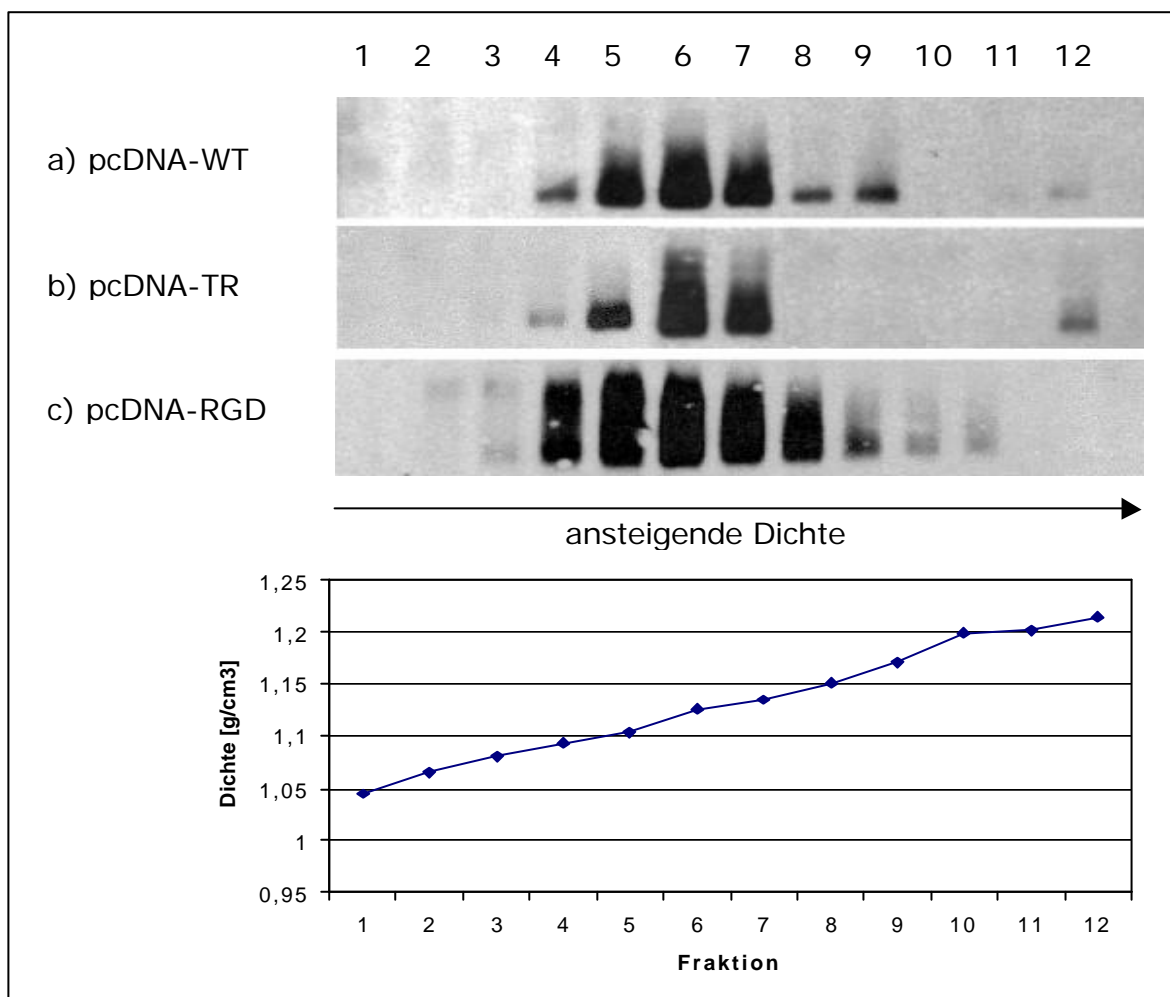
#### **pEε CMVGFP:**

Die Amplifikation des ε-Verpackungssignales (nt<sub>HBV</sub> 1842-1915) erfolgte mit Hilfe von Überhangnukleotidprimern, die 5´ eine *EcoRI*- und 3´ eine *Sall*-Schnittstelle enthielten. Parallel dazu wurde der CMV-Promotor aus pcDNA3.1(-) mittels PCR vervielfältigt und dabei am 5´-Ende eine *Sall*- und am 3´-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle in das Amplifikat eingebracht. Das ε- und das CMV-Fragment wurden über die *Sall*-Schnittstelle ligiert und durch eine zweite PCR mit den Primern *f-epsilonEcoRI* und *b-CMV BamHI* amplifiziert. Das auf diese Weise hergestellte Fusionsgen wurde nun über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in den pEGFP-N1-Vektor inseriert.

Alle Plasmide wurden durch Sequenzanalyse überprüft.

### 1.2.2 Expressionsanalyse

Um zu gewährleisten, dass die erzeugten Plasmidkonstrukte für funktionelle Proteine kodieren, wurden 293-Zellen mittels der Calciumphosphat-Methode mit den Plasmiden transfiziert, für vier Tage inkubiert und das Zelllysate einer Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die so erhaltenen Fraktionen wurden nach der nativen Agarose-Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mittels Immunoblot untersucht.



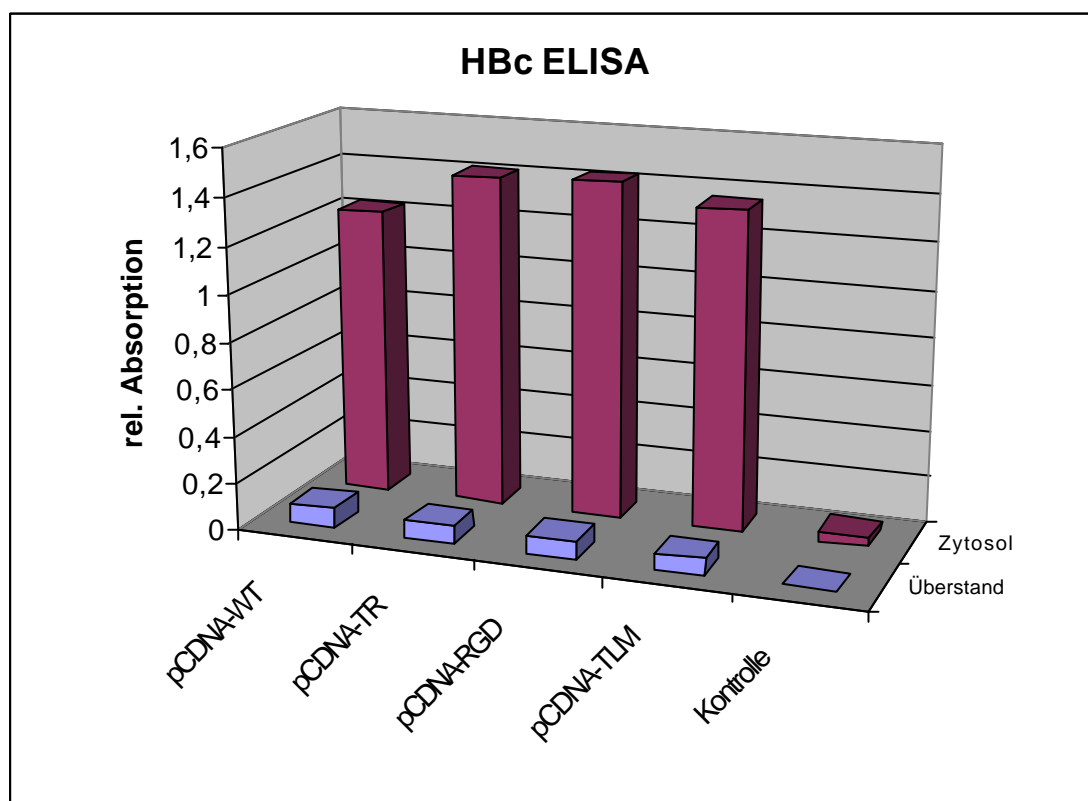
**Abbildung 23: Western Blot der Core-Konstrukte nach Dichtegradientenzentrifugation**

293 Zellen wurden mit den Core-Expressionskonstrukten a) pcDNA-WT, b) pcDNA-TR und c) pcDNA-RGD transfiziert, vier Tage inkubiert und das Zelllysate einer Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen (200.000g, 10°C, 3h, SW41-Rotor). Anschließend wurde der Gradient in 500 µl Fraktionen aufgeteilt, agarosegelelektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Core-spezifischen Banden mittels Western Blot detektiert (DAKO, polyklonales rabbit anti-HBc Serum). Fraktion 1 entspricht einer Dichte von 1,07 g/cm<sup>3</sup>, Fraktion 12 entspricht einer Dichte von 1,20 g/cm<sup>3</sup>.

Mit Hilfe der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Konstrukte in 293 Zellen exprimiert werden. Aufgrund der Verteilung der Proteinsignale im Gradienten ließ sich auf eine korrekte Assemblierung der Partikel schließen. Die höchste Konzentration an Core-Partikeln konnte um Fraktion 6 entsprechend einer Dichte von  $1,12 \text{ g/cm}^3$  detektiert werden.

### 1.2.3 Kapside im Zellkulturüberstand

Da das TLM die Fähigkeit aufweist, biologische Membranen zu durchqueren wurde mittels ELISA untersucht, ob die mit dem TLM fusionierten Core-Kapside verstärkt im Überstand zu finden sind.

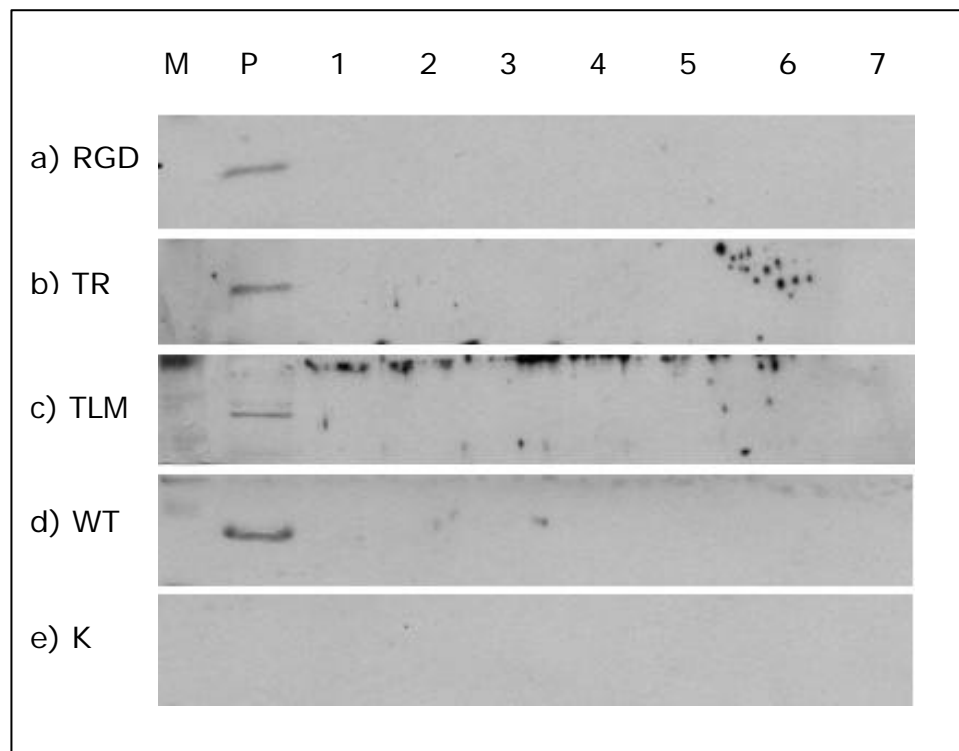


**Abbildung 24: Messung der Core-Proteinmenge per ELISA**

Transfizierte 293 Zellen wurden vier Tage inkubiert. Die Core-Proteinmenge im Zytosol und im Zellkulturüberstand wurde anschließend mittels HBeAg-ELISA (DADE-BEHRING, Kat.No.: OQDM13), der auch sensitiv für HBcAg ist, bestimmt. Blaue Balken spiegeln die Messungen des Überstandes, rote Balken die Messungen der Zytosolpräparation wieder.

In Abbildung 24 ist zu sehen, dass die Core-Proteine nur zu einem geringen Teil im Überstand zu finden waren. Die Gegenwart des TLM führte nicht zu einer verstärkten Anreicherung der Core-Partikel im Zellmedium.

Dass es sich dabei um HBc-Kapside handelt, konnte durch Pelletieren der im Überstand befindlichen Proteine durch ein 30 %iges Sucrose-Kissen gezeigt werden (siehe Abbildung 25), da nur korrekt assemblierte Kapside die entsprechende Dichte aufweisen, um durch das Sucrose-Kissen zu sedimentieren.



**Abbildung 25: Pelletierte Core-Partikel aus Zellkulturüberständen**

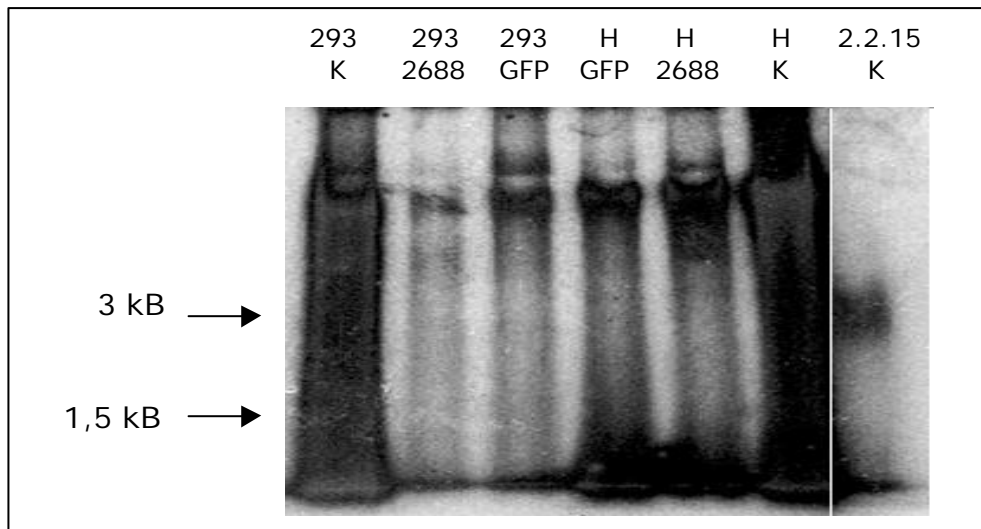
293 Zellen wurden mit den unter a)-d) angegebenen pcDNA-Core-Konstrukten bzw. mit dem Leervektor (e) transfiziert und 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Zellkulturüberstand in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und durch ein 30 %iges Sucrose-Kissen zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf verbleibende 3,5 ml verworfen, diese in 500 µl Fraktionen von oben abgenommen, gelelektrophoretisch getrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen (Primär AK: DAKO, polyklonales rabbit anti-HBc Serum); Sekundär AK: POD-konjugierter goat anti-rabbit Antikörper; AMERSHAM). M kennzeichnet die Marker-Bande, P kennzeichnet das Pellet und mit 1-7 sind die Fraktionen (beginnend vom Boden des Zentrifugenröhrchens) wiedergegeben.

In Abbildung 25 ist ein deutliches Core-Signal im Pellet der Sucrose-Kissen-Zentrifugation zu erkennen. Die Fraktionen, einschließlich der Schicht oberhalb des Kissens (Fraktion 7), zeigen keine für Core-Protein-spezifischen Banden.

#### 1.2.4 EPR nach „Triple“-Transfektion von Eukaryonten

Um Nukleinsäure mit Hilfe des eukaryontischen Zellsystems in die Core-Kapside zu verpacken, wurden 293- oder HepG2-Zellen mit den entsprechenden Expressionskonstrukten transfiziert. Für die Verpackung des p2688GFP-Transkriptes wurden HepG2-Zellen transfiziert, da diese in der Lage sind, den für die Transkription des Prägenoms verantwortlichen hepatozytenspezifischen Core-Promotor zu aktivieren [159]. Im Fall von Verpackungsexperimenten mit dem Konstrukt pE $\epsilon$ CMVGFP wurden 293-Zellen verwendet, da diese, im Vergleich zu HepG2-Zellen, mit erheblich höherer Effizienz transfiziert werden konnten.

Die Verpackung der viralen Nukleinsäure wurde mit Hilfe der endogenen Polymerase Reaktion (EPR) untersucht. Die Zellen wurden hierfür mit dem jeweiligen Core-Konstrukt, dem für die Polymerase kodierenden Plasmid, sowie einem Verpackungskonstrukt transfiziert. Core-Partikel wurden aus dem Zelllysat durch Immunpräzipitation angereichert und mittels EPR überprüft.



**Abbildung 26: EPR von Core-Partikeln nach der „Triple“-Transfektion**

Es wurden pro Ansatz ca.  $2 \times 10^7$  HepG2- (H) sowie 293-Zellen (293), transfiziert (pcDNA-WT-Core, das entsprechende Verpackungskonstrukt p2688GFP (2688) sowie pEεCMVGFP (GFP), sowie pcDNA-pol bzw. in Abwesenheit von pcDNA-pol (K)), für zwei Tage inkubiert und das Zelllysate einer Immunpräzipitation mit polyklonalem HBc-spezifischen Antiserum (DAKO) unterzogen. Als positiv-Kontrolle (K) diente das Zelllysate von HepG2.2.15 Zellen. Die Markierung der HBV-DNA erfolgte durch die endogene Polymerase Reaktion in Gegenwart von  $\alpha$ - $^{32}$ P-CTP.

Im Fall der Verwendung des Verpackungskonstruktes p2688GFP wurde eine Bande, entsprechend der Größe der Kontroll-DNA bei ca. 3 kB erwartet. Im Fall des Konstruktes pEεCMVGFP wird ein ca. 1,2 kB großes RNA-Transkript erwartet, dass nach der reversen Transkription eine Bande in dieser Größe zeigen sollte. Mit Hilfe der endogenen Polymerase Reaktion konnte keine Integration der verschiedenen Transkripte in die Core-Partikel nachgewiesen werden. Die charakteristische Bande, die bei der Positiv-Kontrolle zu sehen ist, konnte im Fall der „Triple“-Transfektionsexperimente nicht beobachtet werden.

## 2 TLM-defiziente Hepatitis B-Viren

Aus der PreS2-Region des großen (LHBs) und mittleren (MHBs) Oberflächenproteins des Hepatitis B-Virus zwischen Aminosäure 41-52 leitet sich das Translokationsmotiv ab. Es besitzt die Fähigkeit, biologische Membranen zu überwinden und kann Proteinen, die mit dem TLM fusioniert wurden, Zellpermeabilität vermitteln [121]. Da dieses Motiv ein Strukturelement aus dem HBV-Oberflächenprotein darstellt, lag die Vermutung nahe, dass das TLM eine Rolle im Lebenszyklus des Virus spielt.

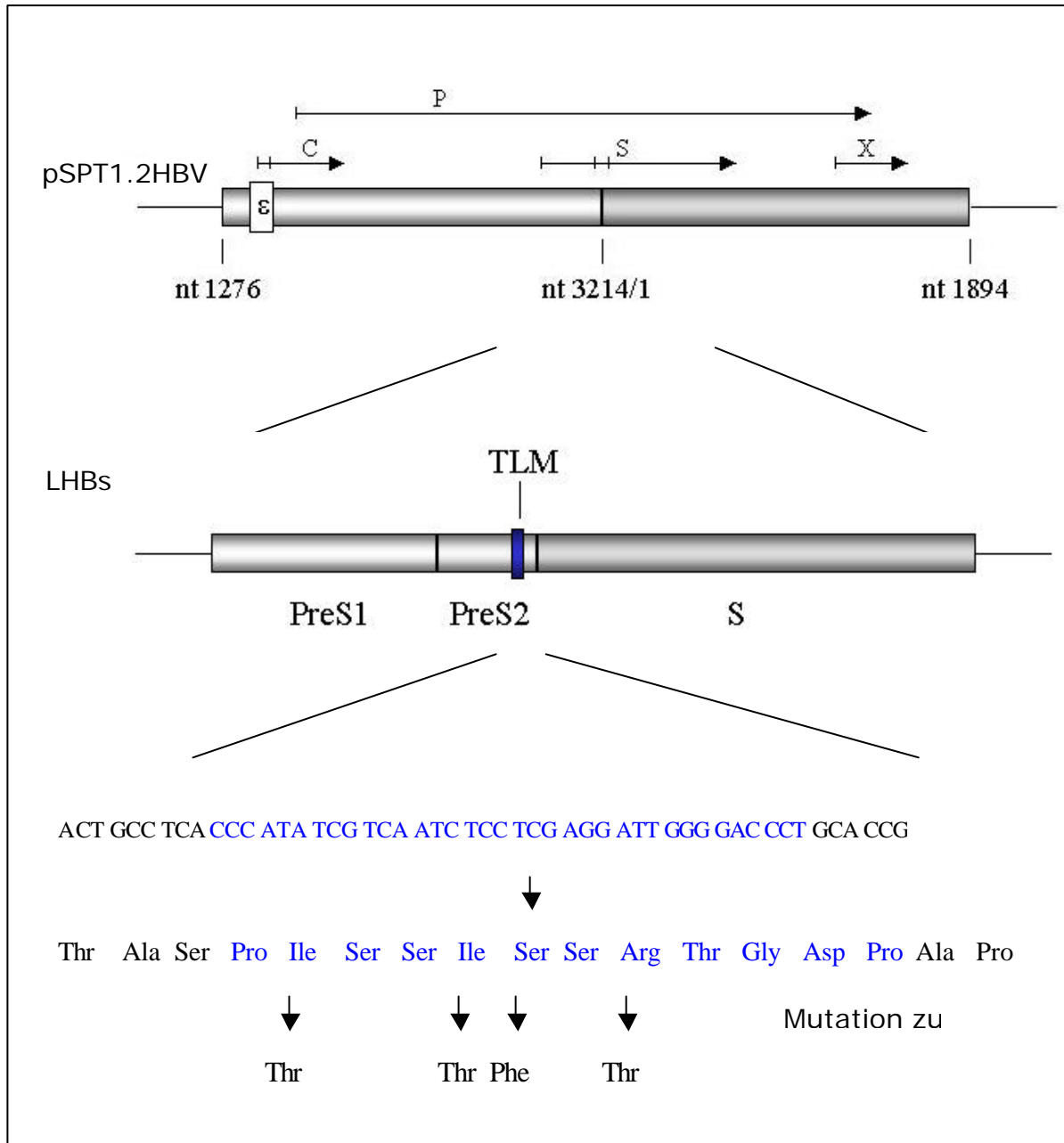
Aufgrund dieser Überlegungen wurde ein Virusgenom erzeugt, in dem das TLM durch gezielte Punktmutationen seine Membrangängigkeit verliert.

Durch die Mutationen wurde die Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren verändert, welche die Ausbildung des amphiphatischen Charakters des Motives bedingt.

### 2.1 Mutagenese des HBV-Genoms

Grundlage für die Konstruktion eines TLM-defizienten HBV-DNA-Genoms war das Plasmid pSPT1.2xHBV [153] mit dem 1,2fachen Genom des Hepatitis B-Virus (Subtyp adr4) im Vektor pSPT19. Im diesem Plasmid sind alle vier viralen Leserahmen genau einmal enthalten und stehen, um der *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen, unter autologer Kontrolle. Die Transfektion einer Leberzelllinie führt zur HBs- und HBe-Sekretion, sowie zur Ausschleusung von potentiell infektiösen Viruspartikeln [153].

Der Bereich in dem sich das TLM befindet, kodiert in einem zweiten darunter liegenden Leserahmen für die virale Polymerase. Aus diesem Grund war darauf zu achten, dass der Leserahmen der viralen Polymerase durch die Mutationen nicht gravierend verändert wurde.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der Punktmutationen**

Innerhalb des TLM (blau markiert) wurden vier Aminosäuren durch Punktmutationen ausgetauscht.

Als Grundlage der Mutationen diente eine bereits in früheren Untersuchungen charakterisierte Mutante des TLM, das PreS2-3S-Konstrukt [79]. Das Motiv PLSSIFSRIGDP (HBV-Subtyp ayw) wurde hierbei zu PSSSSSSRIGDP mutiert. Aufgrund der Rücksichtnahme auf den Polymerase-Leseraster konnten die



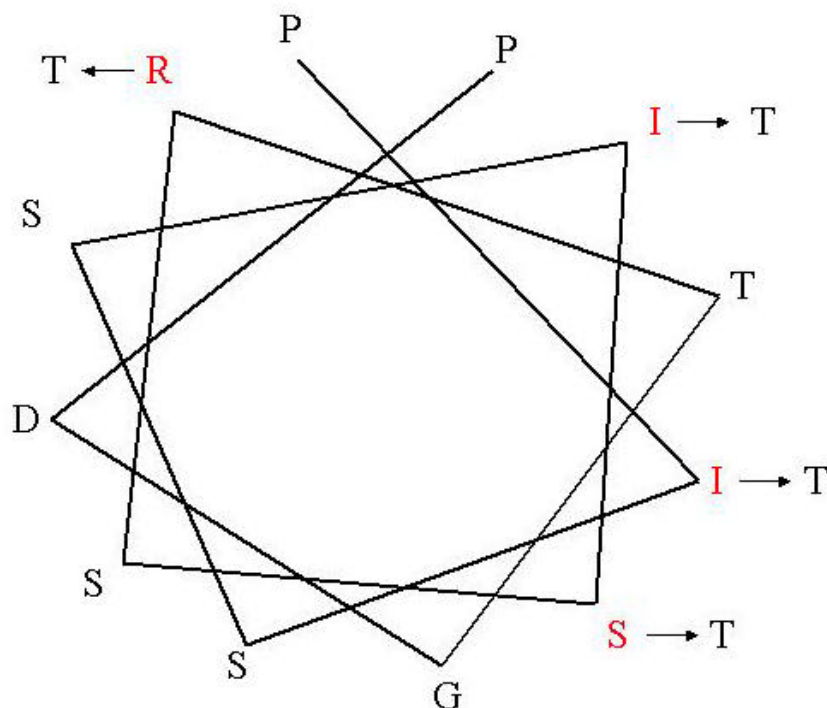
Mutationen der bereits charakterisierten PreS2-3S Mutante nicht in der gleichen Form in das HBV-Genom eingebracht werden.

Die beiden Isoleucine an Aminosäure-Position 42 und 45 wurden durch das mit dem Serin strukturell verwandte Threonin ausgetauscht. Das hydrophile Serin-46 wurde durch Phenylalanin und das basische Arginin durch Threonin ersetzt.

Drei der vier eingebrachten Mutationen sind im Polymerase-Leserahmen still, d.h. sie haben keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz der Polymerase.

Die Mutation nt<sub>HBV</sub> 5 G→C bedingt einen Austausch von Glutamat zu Aspartat an Polymerase-Position 337 innerhalb der RT-Domäne [37]. Sie hat keinen Einfluss auf die Aktivität der Polymerase (siehe Abbildung 36).

In Abbildung 28 ist die Positionierung der Aminosäuren des TLM in der  $\alpha$ -helikalen Struktur zu sehen. Die Lokalisation der hydrophilen Aminosäuren auf der einen und der hydrophoben Aminosäuren auf der anderen Seite der Helix spiegelt den amphiphatischen Charakter des Motives wider.

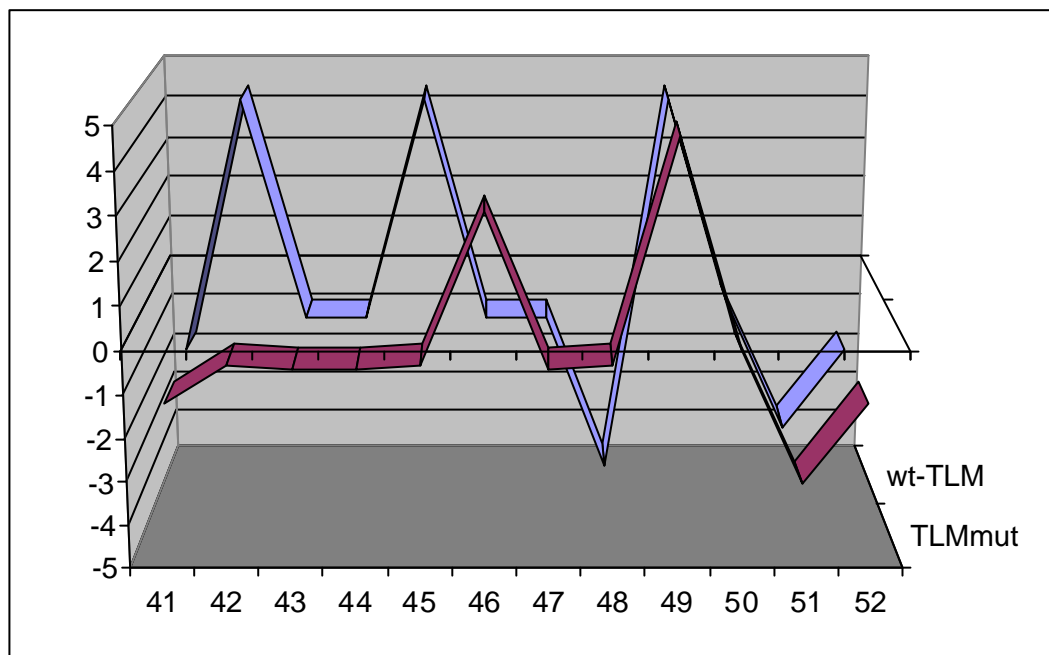


**Abbildung 28: Darstellung der amphiphilen  $\alpha$ -Helix des TLM (adr4)**

Das TLM Motiv des Subtypes adr4 ist unter der Annahme einer  $\alpha$ -helikalen Struktur, gezeigt. Die rot gekennzeichneten Aminosäuren wurden mutiert.

### 2.1.1 Analyse der Hydrophathieabfolge

Wie sich dieser Basenaustausch auf die Abfolge der hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren auswirkt, ist im Hydrophathieprofil nach Kyte und Doolittle [160] (Abbildung 29) des Wildtyp-TLM und der mutierten Variante zu sehen.



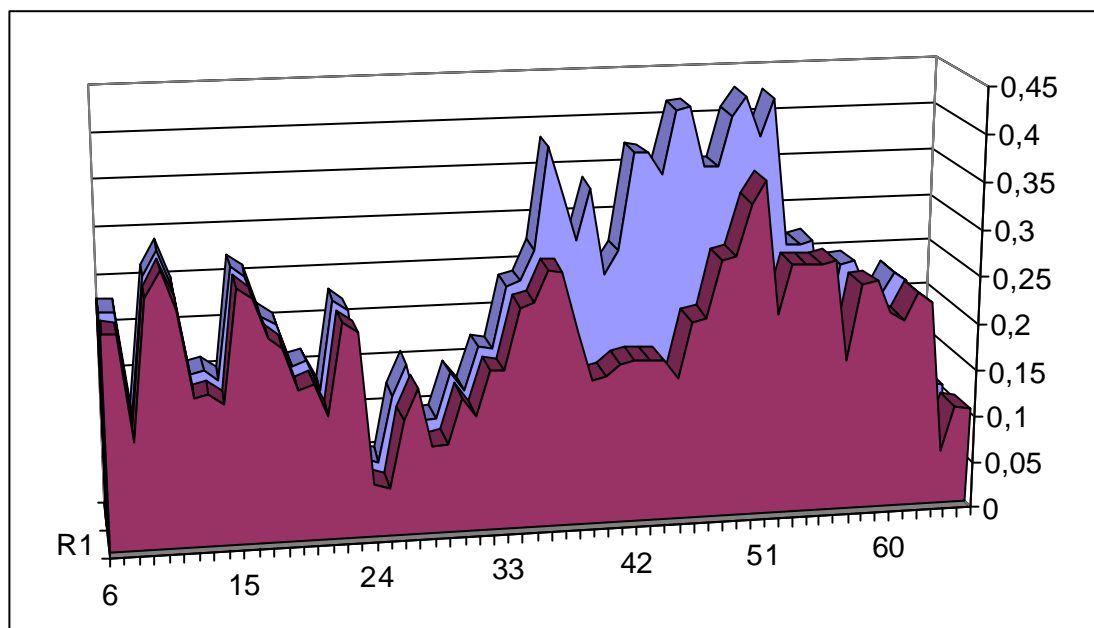
**Abbildung 29: Vergleich der Hydrophathieabfolge des TLM und der Mutante TLM<sub>mut</sub>**

Die wt-TLM Abfolge ist im blauen Verlauf zu sehen. In rot ist der Hydrophathieverlauf nach der Mutation des TLM an vier Positionen (TLM<sub>mut</sub>) gezeigt. Die Aminosäureposition entsprechend der PreS2-Domäne ist in der x-Achse gezeigt. An der z-Achse sind die Hydrophathie-Werte angegeben (nach Kyte und Doolittle [160]).

In der Abbildung ist zu sehen, dass die für die Zellpermeabilität verantwortliche Amphiphilie des TLM mit seiner Abfolge von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren durch die eingebrachten Mutationen grundlegend verändert wurde. Die Isoleucine an den Positionen 42 und 45 wurden durch Threonin ersetzt, wodurch die hydrophoben „Spitzen“ im Hydrophathie-Profil deletiert wurden. Der Austausch des Arginin an Position 48 gegen Threonin bewirkte andererseits die Deletion der hydrophilen „Spitze“. An Position 46 ist durch den Austausch von Serin gegen Phenylalanin der *shift* zum Hydrophoben zu beobachten, was eine weitere Veränderung des TLM-Hydrophathieabfolge bewirkte.

### 2.1.2 Strukturelle Berechnung der Oberflächenantigene

Um zu untersuchen, ob die eingeführten Mutationen in der Lage sind über die Veränderung der amphiphatischen Abfolge hinaus auch die  $\alpha$ -helikale Struktur dieses Motives zu verändern, wurde die Aminosäuresequenz hinsichtlich ihrer Tendenz zum Ausbilden von amphiphatischen Helices untersucht. Die Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm *MacVector* (ACCELRY'S INC.)



**Abbildung 30: Tendenzen zur Bildung von  $\alpha$ -helikalen Bereichen innerhalb der PreS2-Region im wt und im mutierten Oberflächenantigen.**

Die x-Achse zeigt die Aminosäureposition der PreS2-Region. Die y-Achse spiegelt die Tendenz zur Bildung einer  $\alpha$ -Helix wieder. Das wt-Protein ist blau und das mutierte Oberflächenantigen rot dargestellt.

Durch die Berechnungen konnte im Fall des wt-Proteins eine hohe Tendenz zur Bildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen zwischen den Aminosäuren 37-53 ermittelt werden (Abbildung 30, blau). Dies stimmt mit der Lokalisierung des TLM zwischen Aminosäure 41-52 überein. Im Fall des mutierten Oberflächenantigens (Abbildung 30, rot) ist diese Tendenz stark minimiert.

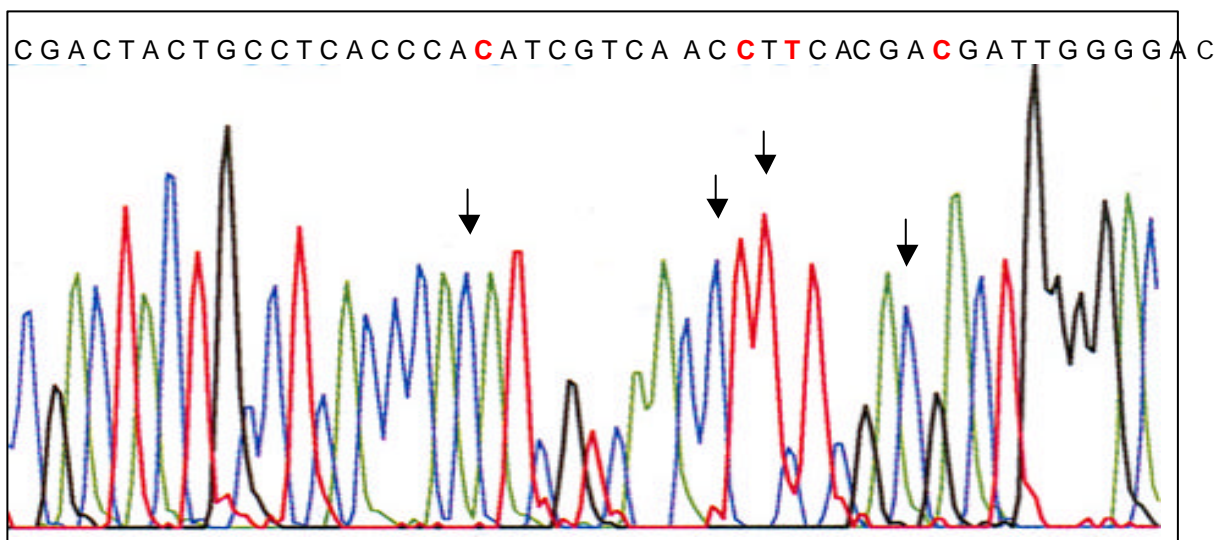
### 2.1.3 Subklonierung des mutierten Genoms pSPT1.2xHBV-TLM<sub>mut</sub>

Wie oben erwähnt, stand für diese Untersuchungen das Plasmid pSPT1.2xHBV zur Verfügung. Auf dieser Grundlage wurden die Punktmutationen mittels „ortsgerichteter Mutagenese“ eingebracht.

Da die Mutagenese-Reaktion mit dem Plasmid pSPT1.2xHBV zu keinem Ergebnis führte, wurde das Plasmid mit *Xba*I restringiert, das erhaltene ca.2 kB lange Fragment, in dem sich die zu mutierende Region befindet, in den pUC19 Vektor inseriert und mit dem so erhaltenen Plasmid die Mutagenese durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde transformiert und die DNA mittels Minipräparationen aus den Kolonien isoliert. Da durch die Mutagenese eine im wt-HBV-Genom vorhandene *Xho*I-Schnittstelle mutiert wurde, konnte die durch die Mutagenese-Reaktion gewonnene DNA durch eine Restriktionsanalyse mit *Xho*I von der eingesetzten *Template*-DNA unterschieden werden.

Die auf diese Weise selektionierten Klone wurden wiederum mit *Xba*I geschnitten und das erhaltene, mutierte HBV Fragment in den *Xba*I restringierten pSPT1.2xHBV-Vektor inseriert.

Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierungen überprüft.



**Abbildung 31: Elektropherogramm des TLM<sub>mut</sub> kodierenden Bereiches**

Die aus dem Chromatogramm abgeleitete Sequenz ist oben angegeben. Die Basen Cytosin (blau), Guanosin (schwarz), Adenosin (grün) und Thymin (rot) sind durch vier verschiedene Farben dargestellt. Die Mutationen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In Abbildung 31 ist das Elektropherogramm für den TLM<sub>mut</sub> kodierenden Bereich eines Klonen dargestellt. Um sicher zu stellen, dass es durch die PCR-Reaktion zu keinen weiteren Mutationen kam, wurde das gesamte HBV-Genom sequenziert. Verglichen mit dem für die Mutagenese verwendeten Genom konnten keine weiteren Mutationen festgestellt werden.

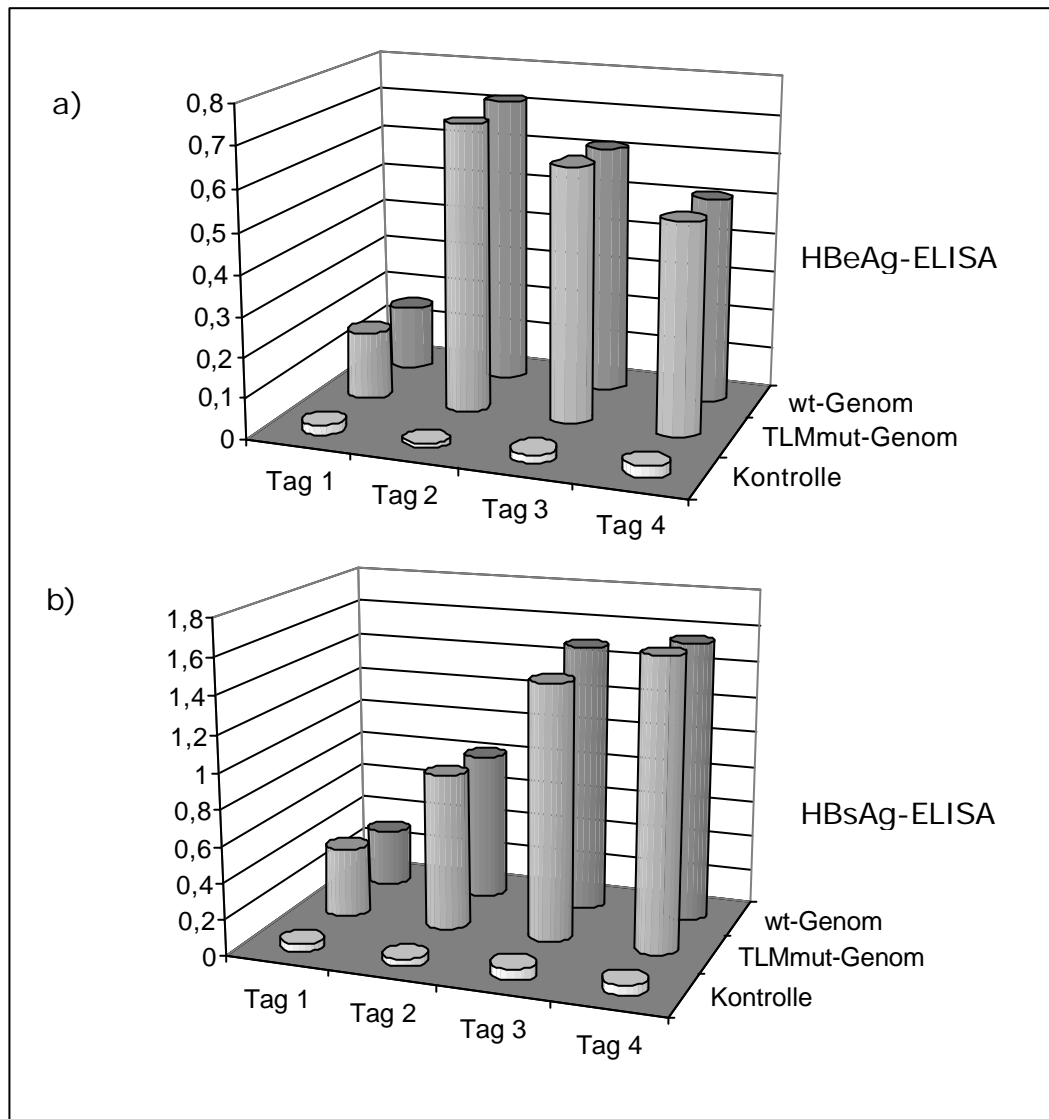
Ausgehend vom wt- und dem mutierten HBV Genom wurden LHBs Expressionsplasmide hergestellt.

**pcDNA-LHBs (wt) und pcDNA-LHBs(TLM<sub>mut</sub>):**

Ausgehend von dem Plasmid pSPT1.2HBV, sowie pSPT1.2HBV-TLM<sub>mut</sub> wurde das LHBs-Gen (nt<sub>HBV</sub>2753-708) amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass am 5´-Ende eine *Bgl*III-Schnittstelle und am 3´-Ende eine *Hind*III-Schnittstelle hinzugefügt wurden. Über die so erhaltenen Schnittstellen wurden die Amplifikate in den Vektor pcDNA3.1(-) insertiert.

### 2.1.4 Expressionsanalyse des mutierten HBV Genoms

Um zu überprüfen, ob das im TLM mutierte HBV-Genom (pSPT1.2xHBV-TLM<sub>mut</sub>) ein dem wt-Genom vergleichbares Expressionsmuster aufweist, wurden die Plasmide in Zellkulturexperimenten hinsichtlich der Expression der viralen Proteine, sowie der Generierung und Sekretierung von gereiften Viruspartikeln untersucht.

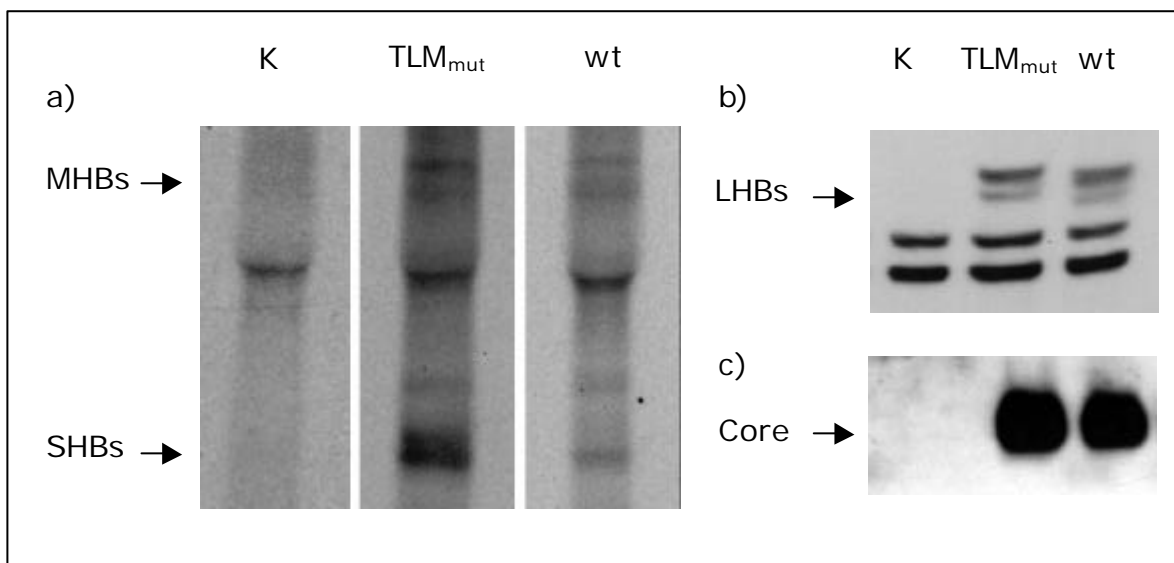


**Abbildung 32: Quantifizierung der sekretierten Proteine mittels ELISA**

HepG2-Zellen wurden einerseits mit dem wt- und andererseits mit dem TLM mutierten HBV-Genom transient transfiziert. Im Abstand von 24 h nach der Transfektion wurde der Überstand durch ELISA-Messungen (DADEBEHRING, Enzygnost® HBe monoclonal, und Enzygnost® HBsAg 5.0) hinsichtlich des HBe- (a) und HBs-Niveaus (b) untersucht.

Die Messungen des Überstandes hinsichtlich des HBe- und HBsAg-Levels zeigte für die beiden Genome keinen signifikanten Unterschied. Auch im zeitlichen Verlauf konnte kein divergierendes Verhalten der verschiedenen Genome beobachtet werden. Der HBeAg-Level stieg schnell an, besaß bereits am zweiten Tag ein Maximum und fiel anschließend leicht ab. Der HBsAg-Level stieg kontinuierlich und erreichte am vierten Tag ein Maximum.

Die Menge von intrazellulär vorhandenen HBV-Proteinen wurde zum einen durch Western Blot Analyse und zum anderen durch Autoradiographie bestimmt.



### Abbildung 33: Expressionsanalyse des wt- und des TLM<sub>mut</sub>-HBV-Genoms

HepG2 Zellen wurden mit dem wt-HBV-Genom (wt), dem TLM<sub>mut</sub>-HBV-Genom (TLM<sub>mut</sub>) oder mit einem Leervektor (K) transfiziert, drei Tage inkubiert und a) eine Mikrosomenpräparation durchgeführt. Das Zelllysate wurde mittels SDS-Page getrennt und durch Western Blot (b) (Primär-Ak: Gemisch aus den monoklonalen Ak Q19-10 und MA19/7, Sekundär-Ak: POD-konjugierter anti-mouse Ak; AMERSHAM), sowie durch native Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot (c) analysiert (Primär-Ak: rabbit anti-HBcAg Serum, DAKO, Sekundär-Ak: POD-konjugierter anti-rabbit Ak; AMERSHAM).

In Abbildung 33 ist zu erkennen, dass die Menge an LHBs sowie an Core-Proteinen zwischen den einzelnen Konstrukten intrazellulär nicht variiert. Da für MHBS und SHBs keine im Immunoblot zu verwendenden Antikörper zur Verfügung standen, wurde zur Quantifizierung das Autoradiogramm der Mikrosomenpräparation herangezogen (Abbildung 33 a). In diesem Fall konnten stärkere Banden für SHBs und MHBS im Fall der Transfektion mit dem TLM<sub>mut</sub>-Konstrukt beobachtet werden. Allerdings war in dieser Spur (Abbildung 33a;

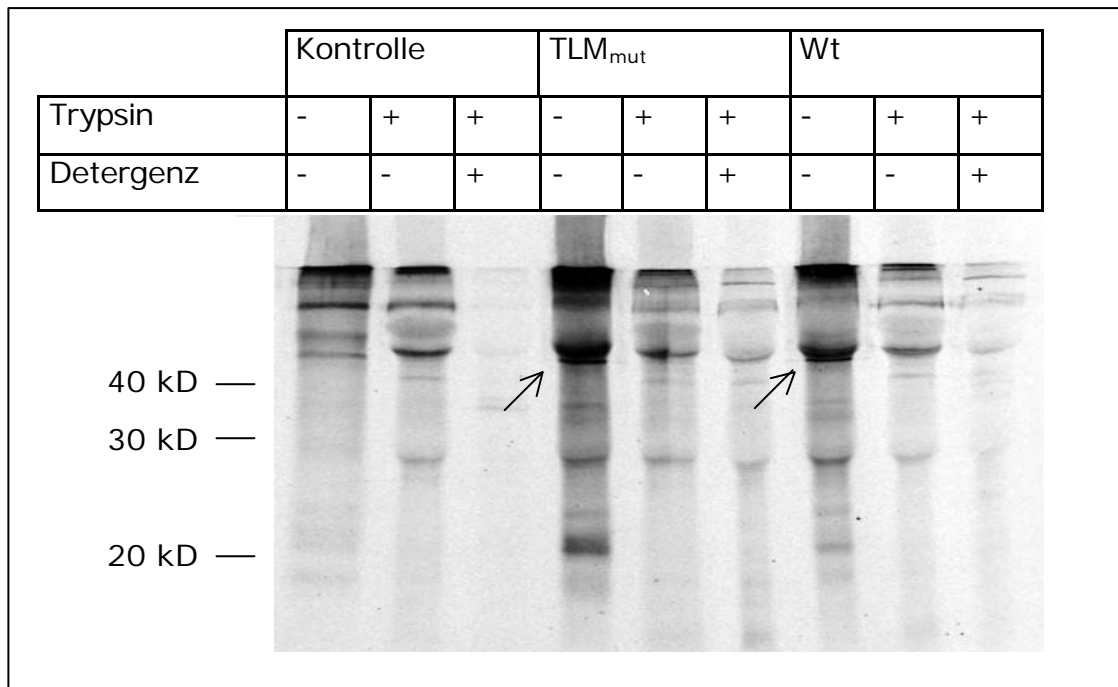
TLM<sub>mut</sub>) eine höhere Proteinbeladung zu beobachten, so dass auch hier von einer ausgeglichenen Antigenexpression ausgegangen werden kann. Die Doppelbande im Fall des LHBS, aber auch des MHBS kommt durch Glykosylierung der Proteine zu stande (Abbildung 33 a und b).

### **2.1.5 Mikrosomenpräparation aus transfizierten HepG2-Zellen**

Das LHBS-Protein wird im Zuge seiner Synthese kotranslational in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) integriert [72]. Die Transmembrandomänen (TM) 2, 3 und 4 werden hierbei im Gegensatz zu der TM 1 korrekt transloziert. Die TM 1 verbleibt zusammen mit der PreS-Region auf der zytosolischen Seite des ER. Ein Teil der LHBS N-Termini (etwa 50 %) werden anschließend posttranslational in das Lumen des ER transloziert und auf der Oberfläche des sekretierten Virus exponiert [82-84].

Um zu untersuchen, ob das TLM in Bezug auf die posttranslationale Translokation der PreS-Region eine Rolle spielt, wurden HepG2-Zellen mit den LHBS Expressionskonstrukten pcDNA-LHBS(wt) sowie pcDNA-LHBS(TLM<sub>mut</sub>) transfiziert, die Proteine metabolisch markiert und die Mikrosomen präpariert. Diese wurden anschließend einem tryptischen Verdau in Abwesenheit oder in Gegenwart eines Detergenzes unterzogen.





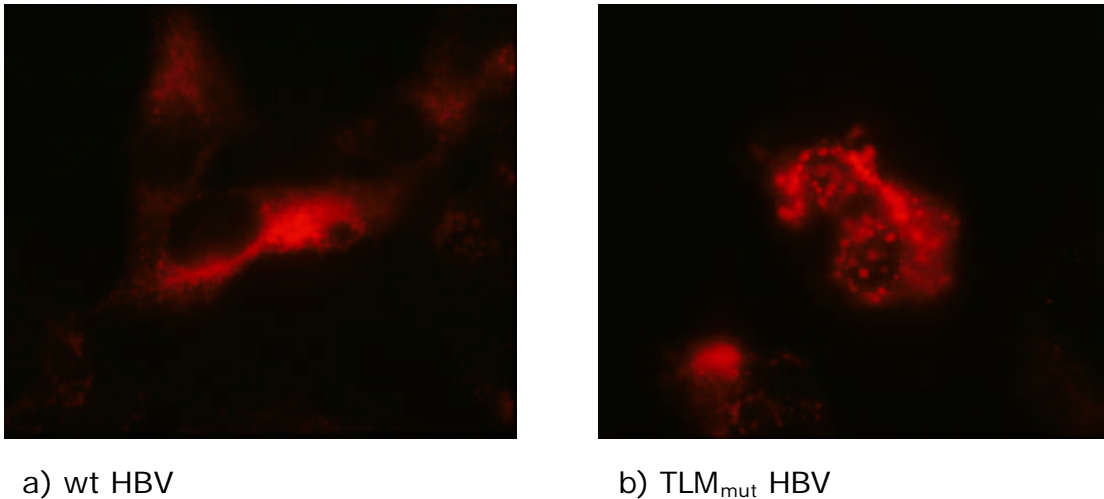
**Abbildung 34: Mikrosomenpräparation von HBV-Genom transfizierten HepG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden mit pcDNA-LHBs(wt), und pcDNA-LHBs(TLM<sub>mut</sub>) oder mit einem Leervektor (K) transfiziert, die Proteine mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert und eine Mikrosomenpräparation durchgeführt. Wie im Methodenteil beschrieben wurde ein Teil der Präparation in Abwesenheit oder in Gegenwart von NP-40 tryptisch verdaut, die Proteine über SDS-Page getrennt, das Gel getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen. Das große Oberflächenantigen LHBs ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In Abbildung 34 ist das Autoradiogramm nach der Mikrosomenpräparation gezeigt. Das große Oberflächenprotein ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Man konnte erkennen, dass im Fall des mutierten HBV-Genoms sowie im Fall des wt-Genoms das LHBs durch den Tryptischen Verdau abgebaut wurde. Dies geschah sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit eines Detergenzes. In beiden Fällen konnte nach Trypsinbehandlung ohne Detergenz eine Bande von der Größe des LHBs beobachtet werden.

### 2.1.6 Immunfluoreszenzmikroskopie von transfizierten HepG2-Zellen

Um zu untersuchen, ob sich die zelluläre Verteilung der Oberflächenantigene durch die eingebrachten Mutationen verändert, wurden transient mit dem mutierten und dem wt-HBV-Genom transfizierte HepG2-Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht.



#### Abbildung 35: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der LHBs Verteilung

HepG2 Zellen wurden mit dem wt-HBV-Genom (wt) und dem TLM<sub>mut</sub> HBV-Genom (TLM<sub>mut</sub>) transient transfiziert, für 24 h inkubiert und einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen (Primär-Ak: monoklonaler anti-PreS1 Ak, Epitop: AS 19-23; Sekundär-Ak: Cy3-konjugierter anti-mouse Ak, JACKSON IMMUNORESEARCH).

Die in Abbildung 35 gezeigten Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten eine unterschiedliche Verteilung der LHBs Proteine innerhalb der transient transfizierten Zelle. Während die Zellen, die mit dem wt HBV-Genom transfiziert wurden, eine homogene Färbung des Endoplasmatischen Retikulums aufwiesen, zeigte die Immunfluoreszenz der mit dem mutierten HBV-Genom transfizierten Zelle eine stark granuläre Verteilung des LHBs.

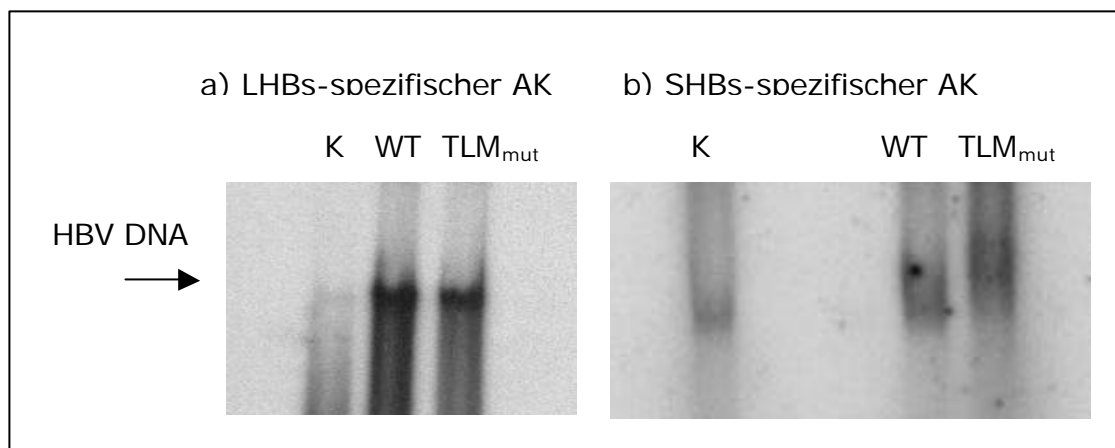
### 2.1.7 Nachweis von reifen Viruspartikeln mittels EPR

Ob diese Verteilung einen Einfluss auf die Sekretierung von gereiften Viruspartikeln hat, wurde indirekt mit Hilfe der Endogenen Polymerase Reaktion (EPR) untersucht.

Nach der transienten Transfektion von Hepatomzellen (HepG2) in der Zellkultur kommt es zur Sekretion von viralen Proteinen. Neben dem *early*-Antigen (HBeAg) werden komplette Viren, sowie subvirale Partikel (SVP) (Filamente und Sphären), die sich aus den Oberflächenantigenen zusammensetzen, im Überstand angereichert. Aufgrund der identischen Oberflächenstruktur der subviralen Partikel und der reifen Virionen und der geringen Zahl an sekretierten Viren in der Zellkultur, können diese nicht auf Proteinebene detektiert werden.

Mit Hilfe des EPRs ist es möglich, die in den HBV-Virionen verpackte partiell doppelsträngige DNA radioaktiv zu markieren und autoradiographisch zu analysieren.

Die im Überstand befindlichen Virionen wurden konzentriert und anschließend einer Immunpräzipitation mit SHBs- sowie LHBs-spezifischen Antikörpern unterzogen. Dabei wurden reife Virionen sowie subvirale Partikel präzipitiert. Der (+)-Strang der in den Kapsiden befindlichen partiell doppelsträngigen DNA-Moleküle wurde anschließend durch das Bereitstellen von Nukleotiden (dATP, dGTP, dTTP,  $^{32}\text{P}$ -dCTP) durch die endogen in den Virionen befindliche Polymerase verlängert, wobei die virale DNA markiert wurde.



**Abbildung 36: Endogene Polymerase Reaktion mit im Überstand befindlichen Viren**

Es wurden pro Ansatz ca.  $2 \times 10^7$  HepG2 Zellen mit den Konstrukten pSPT1.2xHBV (WT) und pSPT1.2xHBV-TLM<sub>mut</sub> (TLM<sub>mut</sub>) transfiziert, für vier Tage inkubiert, der Überstand mittels Konzentratoren eingengt, und a) einer Immunpräzipitation mit dem monoklonalen, LHBs-spezifischen Ak MA18/7 und b) einer IP mit einem polyklonalen, SHBs-spezifischen Antiserum (anti-HBs, DAKO) präzipitiert. Als Kontrolle (K), diente Überstand von HepG2.2.15 Zellen. Die Markierung der HBV-DNA erfolgte durch die endogene Polymerase Reaktion in Gegenwart von  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -CTP. Die DNA wurde anschließend isoliert, gelelektrophoretisch getrennt und autoradiographisch analysiert.

Durch die endogene Polymerase Reaktion konnte gezeigt werden, dass sowohl Zellen, die mit dem WT-Genom, als auch Zellen die mit dem mutierten Genom transfiziert wurden, Virionen in gleichem Maße sekretierten. Wäre im Fall des TLM-defizienten Genomes die Translokation des LHBs gehemmt, sollte die PreS1/PreS2-Region nicht auf der Oberfläche des Virus exponiert werden. Da, wie in Abbildung 36 a) zu sehen ist, Virionen auch mit PreS1-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden können, ist nicht von einer vollständigen Hemmung der posttranslationalen Translokation durch die eingebrachten Mutationen auszugehen.

## E Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte des *Translokationsmotives* (TLM) aus dem Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus untersucht.

Zum einen sollte die Rolle des TLM im viralen Lebenszyklus untersucht werden. Die Tatsache, dass sich ein zellpermeables Strukturelement im Oberflächenprotein des Virus befindet und analoge Motive mit der Abfolge von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren in allen Hepadnaviren strukturell konserviert sind, legte die Vermutung nahe, dass dieses Motiv essentiell für den Replikationszyklus ist.

In einem zweiten Ansatz wurde versucht, durch die Fusion des TLM-Peptides mit dem Hepatitis B Kapsid zellpermeable Kapside zu erhalten, um damit ein neues Werkzeug für den Gentransfer zu generieren.

### 1 Generierung von HBcAg-basierenden Nukleokapsiden

Der therapeutische Gentransfer ist einer der großen Herausforderungen in der medizinischen Forschung. Ein bedeutender Teil der Untersuchungen für den viralen Gentransfer zielt daher auf die Etablierung eines effizienten Vektorsystems.

Das Vektorsystem der Wahl sollte mehrere Eigenschaften aufweisen. So sollte der Vektor um einen möglichst hohen therapeutischen Effekt zu erzielen, sehr effizient die Zielzellen erreichen. Das System sollte in Bezug auf die sogenannte Vektorsicherheit höchsten Ansprüchen genügen. Des weiteren wäre es von Vorteil, wenn die Vektoren in großen Mengen produziert werden können und möglichst kostengünstig sind.

Bisher wird zwischen viralen und nicht-viralen Vektorsystemen unterschieden (siehe Einleitung). Virusähnliche Partikel (*virus like particles*, VLPs) bilden diesbezüglich ein Bindeglied, da sie aus viralen Proteinen aufgebaut werden, jedoch keine virale Nukleinsäure beinhalten.

Gegenüber dem viralen Gentransfer bietet dieser Ansatz entscheidende Vorteile. So ist das Risiko der Erzeugung von replikationskompetenten Viren durch die Abwesenheit von viraler RNA/DNA ausgeschlossen. Des weiteren ist

anzunehmen, dass die Kosten für die Herstellung der virusanalogen Partikel in prokaryontischen Kulturen deutlich unter den Kosten der Virusproduktion in Zellkulturen rangiert. Und schließlich ist die Modulation der Eigenschaften der Partikel durch Kombination mit zusätzlichen Komponenten bei einem *in vitro* Systems leichter handhabbar, als bei einem Verfahren, dass auf der Expression in Zellkulturen beruht.

Ein entscheidender Nachteil der bisher verwendeten nicht-viralen Gentransfersysteme, liegt in der geringen Transfektionseffizienz dieser Systeme gegenüber evolutiv optimierten Viren, auf deren Basis der virale Gentransfer erfolgt. Gründe hierfür sind eine oft unzureichende Aufnahme der DNA über die Plasmamembran, sowie die lysosomale Degradation der DNA nach endozytotischer Aufnahme der Vektoren [161].

Die Entdeckung von zellpermeablen Peptiden, die rezeptor- und endozytoseunabhängig biologische Membranen durchqueren können, ermöglicht nun die Herstellung von Partikeln mit neuartigen Eigenschaften. Um die Vorteile des zellpermeablen Fusionsproteins mit denen von virusanalogen Systemen zu verbinden, wurde in dieser Arbeit das Translokationsmotiv mit dem Kapsid des Hepatitis B-Virus fusioniert. Das hierdurch geschaffene Werkzeug bildet die Grundlage eines neuen Gentransfersystems.

Die effiziente Verpackung der gewünschten Nukleinsäureinformation in rekombinante Viruspartikel ist Voraussetzung für den erfolgreichen virusanalogen Gentransfer. In dieser Arbeit wurde versucht verschiedene Verfahren der Nukleinsäureintegration zu nutzen. Neben der DNA Integration in prokaryontisch hergestellten Kapsiden *in vitro*, sollte untersucht werden, inwieweit in Zellkultursystemen, unter Zuhilfenahme viruseigener Verpackungsmechanismen, Nukleinsäure beladene zellpermeable Kapside entstehen.

### **1.1 Expression und Reinigung von Hepatitis B Kapsiden in *E. coli***

Die Expression und Isolierung nativer Core-Partikel aus *E. coli* ist in der Literatur als ein relativ aufwendiges dreistufiges Verfahren beschrieben [87]. In der ersten Stufe werden die Kapside durch fraktionierende Fällung mit Ammoniumsulfat präzipitiert. In einer zweiten Reinigungsstufe erfolgt die Dialyse der Kapside gegen TBS, um sie anschließend in der letzten Stufe mittels

Dichtegradientenzentrifugation (Sucrosegradient oder CsCl-Gradient) in 80 %-90 %iger Reinheit zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die Reinigung der in *E. coli* gebildeten Kapside durch Kombination mit einem *Tag* zu vereinfachen, um so eine affinitätschromatographische Reinigung zu ermöglichen. Da aus der Literatur bekannt war, dass der N-Terminus im Gegensatz zum C-terminalen Bereich des Core-Proteins auf der Oberfläche des Kapsides lokalisiert ist [106], wurde der N-Terminus als Fusionsort für den *Tag* gewählt. Der Vorteil gegenüber der in der Literatur beschriebenen denaturierenden Reinigung der Kapside mit Hilfe eines C-terminalen *6-His-Tags* [162] sollte darin liegen, die auf diese Weise erhaltenen Kapside für strukturelle Untersuchungen unter nativen Bedingungen isolieren zu können, ohne die Partikel unter erheblichem Ausbeuteverlust *in vitro* zu reassemblieren. Allerdings stellte sich heraus, dass mit einem N-terminalen *6-His-Tag* keine zufriedenstellende Ausbeute an Kapsiden erhalten werden konnte.

Weder im Lysat der induzierten Bakterien, noch nach denaturierender affinitätschromatographischer Reinigung konnte das Core-Protein nachgewiesen werden. Mögliche Gründe hierfür ist eine unzureichende Effizienz der Translationsinitiation, oder eine geringe Stabilität des Transkriptes und der damit verbundenen raschen Degradation der RNA.

Daher wurde ein alternatives Expressions- und Reinigungssystem verwendet. Dazu sollte ein *Tag* gewählt werden, der die Reinigung der Kapside ebenfalls unter nativen Bedingungen erlaubt. Um die Fähigkeit der Core-Proteine zum spontanen Zusammenbau zu kompletten Kapsiden nicht zu beeinflussen, sollte ein möglichst kleiner *Tag* gewählt werden, so dass der oft im Zuge der nativen Reinigung verwendete Glutathion-S-Transferase-Tag (Molekulargewicht: 26 kD) nicht verwendet wurde. Eine weitere Möglichkeit lag in der Nutzung des so genannten *Strep-tags* [163]. Die Reinigung der Proteine erfolgt in diesem System durch die Interaktion eines 8 Aminosäuren umfassenden Tags mit auf Säulenmaterial immobilisiertem Streptavidin und anschließender Elution der Proteine mit Desthiobiotin. Mit Hilfe dieses Systems konnten innerhalb von einem *Tag* bis zu drei mg Kapsidprotein pro Liter Induktionskultur in 90-95 %iger Reinheit unter nativen Bedingungen erhalten werden.

### 1.1.1 Morphologie der TLM-Fusionsvarianten

Für eine möglichst exponierte Position des TLM boten sich die *spike tips* und die im Kapsid auf der Oberfläche exponierten N-Termini an [106, 107, 154]. Allerdings kann durch Integration von Fremdepitopen und damit einhergehender Sequenzänderung die Morphologie und die Stabilität der Kapside entscheidend verändert werden [164].

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen wurden die in *E. coli* produzierten und gereinigten mit dem TLM fusionierten Proteine durch Elektronenmikroskopie auf deren Fähigkeit hinsichtlich der Kapsidbildung untersucht. Die Aufnahmen zeigten, dass die N-terminal mit dem Core-Protein fusionierte TLM-Variante (TW-Core) keine morphologischen Unterschiede aufwies, wohingegen die TLM-Core-Varianten, bei dem das Peptid in den sog. *spike tip* integriert wurde, nach der Lyse der Zellen durch Ultraschall nur in Bruchstücken erhalten werden konnte. Erst durch schonenden Lysozym-Aufschluss der Induktionskulturen, zeigten die isolierten TLM-Core-Kapside eine dem WT-Core entsprechende Größe und Morphologie. Diese eingeschränkte strukturelle Integrität war nicht zu erwarten, da in dieser Position schon erheblich größere Proteine, wie das *green fluorescent protein*, oder ein 120 Aminosäuren umfassender Teil des Puumala Hantavirus Nukleokapsides ohne Verlust der Fähigkeit zur Kapsidbildung inseriert werden konnten [165, 166]. Möglicherweise ist jedoch gerade die  $\alpha$ -helikale Formation des TLM mit der Tendenz zur Dimerisierung in den *spike tips* für die eingeschränkte Stabilität der Kapside verantwortlich.

Im Zuge von Reassemblierungsversuchen aus denaturierten Proteinen zeigten die TLM-Core-Varianten im Gegensatz zum WT- und TW-Core-Protein ebenfalls abweichende Eigenschaften. Sie lagerten sich zwar zu partikulären Strukturen zusammen, besaßen allerdings, verglichen mit WT- und TW-Kapsiden, einen nahezu doppelten Durchmesser. Die Fähigkeit der N-terminalen TLM-Core-Fusionsproteine im Hinblick auf die Kapsidbildung unterschied sich hingegen nicht von der des Wildtyp Core-Proteins. In dieser Hinsicht wäre die Generierung von Mosaik-Kapsiden, in denen TW-Core-Proteine zusammen mit TLM-Core-Proteinen das Kapsid bilden, denkbar. Auf diese Weise wäre es möglich morphologisch korrekte Kapside auch nach der Reassemblierung zu erhalten, in denen das TLM in einem Teil der *spike tips* exponiert wird.



In den gereinigten Proben konnten bei allen Varianten zwei unterschiedliche Core-Formen nachgewiesen werden. Zum einen die kompletten Kapside und zum anderen Core-Protein Dimere. Wie durch Größenausschluss-Chromatographie gezeigt werden konnte, betrug das Verhältnis von Kapsiden zu Dimeren 0,8:1. Wurden die Kapside fraktioniert und einer weiteren gelchromatographischen Analyse unterzogen, konnte der Zerfall der Kapside und somit die Generierung des Dimer-Peaks nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung wird durch andere Arbeitsgruppen bestätigt, wonach sich die kompletten Kapside nicht im dynamischen Gleichgewicht mit der dimeren Form befinden [107]. Das Vorhandensein von Core-Protein Dimeren lässt sich wohl darauf zurückführen, dass die verbleibende Konzentration an Kapsiduntereinheiten (Konzentration der Dimere  $<0,8 \mu\text{M}$  [108]) zur Bildung von kompletten Partikeln nicht ausreicht.

### 1.1.2 DNA Verpackung

Das Hepatitis B-Virus integriert im Zuge des Viruszusammenbaus die sog. prägenomische RNA mit einer Größe von 3,5 kB. Es ist anzunehmen, dass die Kapazität der Core-Kapside in Bezug auf die DNA Integration in dieser Größenordnung liegt.

Um das Potential der TLM-Kapside im Hinblick auf den Gentransfer evaluieren zu können, wurde die Fähigkeit der Kapside im Hinblick auf die Integration eines Reportergens untersucht. Das Produkt des Reportergens sollte dabei leicht detektierbar sein, das Plasmid im Bereich der Größe von 3,5 kB liegen und quantifiziert werden können.

Diese Bedingungen wurden mit der Klonierung des SHBs-Gens in den Vektor pVax erfüllt. Das resultierende Plasmid besitzt eine Größe von 3,6 kB. Durch das unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehende SHBs-Transgen ist das Genprodukt mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA detektierbar und die Menge der verpackten Plasmide durch TaqMan-Analyse quantifizierbar.

Zunächst wurde untersucht, unter welchen Bedingungen die Kapside in ihre Monomere bzw. Dimere zerfallen. Dabei wurde festgestellt, dass erst nach der Dialyse gegen 4 M Harnstoff eine vollständige Zersetzung der Kapside eintrat.

Die Reassemblierung erfolgte durch Dialyse der Proben gegen TBS in Gegenwart von zweiwertigen Ionen, da dies den Assemblierungsprozess fördert [108].

Im Fall der WT- und TW-Varianten betrug die Ausbeute an kompletten Kapsiden nach Deassemblierung und Reassemblierung ca. 10 %. Vermutlich wird der Assemblierungsprozess in *E. coli* durch zelluläre Faktoren co- bzw. posttranslational unterstützt. Da diese Faktoren bei der *in vitro* Reassemblierung nicht vorhanden sind, könnte dies der Grund für die erheblichen Ausbeuteverluste sein. Durch die Zugabe von Zelllysate könnte die Reassemblierungseffizienz erhöht werden. Die Gegenwart von zellulären Proteinen würde allerdings der Verpackung von DNA entgegenstehen.

Um die Effizienz des Assemblierungsprozesses zu erhöhen, wäre auch die Zugabe von Chaperonen wie dem TCP-1 denkbar, da für dieses Protein eine unterstützende Funktion beim Kapsidzusammenbau nachgewiesen werden konnte [167]. Prinzipiell ist jedoch eine Hinzunahme von weiteren Faktoren im Hinblick als Einsatz für den *in vivo* Gentransfer zu vermeiden.

Durch Messungen der DNA-Kopienzahl mit Hilfe der TaqMan-PCR konnte gezeigt werden, dass ca. 1 Plasmid pro Kapsid verpackt wird.

Im Fall der TLM-Core-Variante konnte, verglichen mit WT- und TW-Core-Kapsiden, nur etwa ein Zehntel der DNA-Menge verpackt werden. Dies spiegelt zum einen die verringerte Effizienz dieser Variante im Hinblick auf die Fähigkeit des Selbst-Zusammenbaus wider. Zum anderen zeigt es, dass durch die Gegenwart der Proteine allein, die DNase-Aktivität nicht inhibiert wird, sondern der Schutz vor DNase-Abbau durch die Integration der DNA in intakte Kapside vermittelt wird.

In der Arbeit wurden zwei unterschiedliche Modifikationen der Core-Proteine für die Expression in *E. coli* verwendet. Zum einen wurden C-terminal um 33 Aminosäuren verkürzten Core-Proteine verwendet ( $WT_k$ ,  $TW_k$  und  $TLM_k$ ), denen der argininreiche DNA und RNA-bindende Teil fehlt. Um jedoch die DNA bindende Tendenz der positiv geladenen Aminosäuren auszunutzen, wurden zusätzlich Konstrukte mit drei C-terminal vorhandenen Argininen hergestellt ( $WT_M$ ,  $TW_M$  und  $TLM_M$ ). Gegenüber dem 184 Aminosäuren umfassenden Wildtyp Core-Protein weist dieses kürzere Konstrukt weiterhin Expressionsvorteile in *E. coli* auf. Diese zeigten allerdings in DNA Verpackungsversuchen keine verstärkte Integration der Nukleinsäure in die Kapside. Möglicherweise lag das daran, dass auch im Fall der verwendeten kurzen Konstrukte die DNA Beladung sehr effizient

ist und, begründet durch die Größe des Kapsidlumens, auch durch die Interaktion mit argininreichen Motiven nicht erhöht werden kann.

Die C-terminale Region ist also nicht für die Integration der DNA in vitro essentiell. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen bei denen die Funktion des argininreichen Teils des Kapsides im Kontext des zum HBV homologen Entenvirus DHBV untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, dass Viren, bei denen der C-Terminus deletiert wurde, weiterhin in der Lage sind prägenomische RNA zu verpacken [168].

### **1.1.3 Inkubation von eukaryontischen Zellen mit TLM-Core-Kapsiden**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mit dem TLM fusionierten Hepatitis B Core-Kapside in der Lage sind, biologische Membranen zu durchqueren. Dies wurde für die immortalisierte Zelllinie HepG2, sowie für primäre, dendritische Zellen gezeigt.

Dendritische Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Initiation der Immunantwort. Sie können effizient Antigene aufnehmen, diese prozessieren und auf ihrer Oberfläche präsentieren. So werden zum Beispiel lösliche Antigene wie Proteine durch Pinozytose und partikuläre Strukturen durch Phagozytose aufgenommen, zu kurzen Peptiden prozessiert und auf Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) an der Zelloberfläche präsentiert, um dort eine zelluläre Immunantwort zu induzieren.

In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen, ob dendritische Zellen durch zellpermeable Nukleokapside penetriert werden können. Auf diese Weise wäre es einerseits möglich, durch verpackte und in die Zelle eingebrachte Nukleinsäure die Expression des Transgens in DCs zu erreichen. Nach der Prozessierung wäre dann die Induktion einer CD8<sup>+</sup>-Immunantwort gegen dieses Protein möglich. Des weiteren könnte durch die aufgenommenen Core-Proteine eine zusätzliche Immunantwort stimuliert werden. Jüngste Untersuchungen zeigen, dass im Fall einer Inkubation von dendritischen Zellen mit TAT-Fusionsproteinen, Peptide sowohl MHC-I- als auch MHC-II-abhängig präsentiert werden [169]. Die Präsentation auf MHC-I-Molekülen kann durch die TAT-vermittelte, endozytoseunabhängige Transduktion der Zelle mit dem Antigen erklärt werden. Durch die Inkubation der dendritischen Zellen mit dem Protein (TAT-Ovalbumin) bei 37°C, können weiterhin endozytotische Prozesse stattfinden, wodurch die Peptid-Präsentation auf MHC-II-Molekülen zu erklären ist.

Da die Aktivierung von  $CD4^+$  Zellen wiederum zu einer Stimulierung und Aktivierung der  $CD8^+$ -abhängigen, sowie der humoralen Immunantwort führt [170], könnte auf diese Weise das Immunsystem sehr effizient aktiviert werden.

Um nachzuweisen, dass die zellpermeablen Partikel aufgrund des TLMs energie und rezeptorunabhängig in die Zelle gelangen, wurde die Inkubation der dendritischen Zellen mit den verschiedenen Core-Konstrukten bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Durch Immunfluoreszenzanalyse konnte nachgewiesen werden, dass es im Fall der Inkubation mit WT-Core-Kapsiden zur Interaktion mit der Plasmamembran kommt, was wohl auf unspezifische Wechselwirkung zurückzuführen ist. Die beiden TLM-Fusionsvarianten zeigten überraschenderweise unterschiedliches Verhalten. Während Kapside, die das TLM über die Integration in den *spike tip* exponieren (TLM-Core), eine zytoplasmatische Verteilung aufwiesen, lokalisierten die TW-Core-Kapside (TLM ist N-terminal an das Core-Monomer fusioniert) bevorzugt an der Kernmembran. Ein Grund hierfür ist möglicherweise eine durch die Integration des TLM in den *spike tip* gestörte Interaktion der TLM-Kapside mit Proteinen der Kernmembran, wie z.B. dem Kernporenkomplex, für den *in vitro* eine Interaktion mit Hepatitis B Kapsiden gezeigt werden konnte [113]. Bei der Verwendung der Kapside als Nukleinsäure-Carrier, könnte die Eigenschaft der Bindung an den Zellkern und anschließendem Einschleusen der Nukleinsäure in den Kern von entscheidender Bedeutung sein. So könnten auf diese Weise sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen transfiziert werden. Durch die Fähigkeit an der Kernmembran zu binden, weisen die TW-Core-Kapside Vorteile gegenüber der TLM-Core-Variante auf.

Leider ist es in dieser Arbeit nicht gelungen, mit Hilfe der rekombinanten Kapside einen Gentransfer zu erreichen. Dies kann daran liegen, dass die Anzahl der hergestellten Kapside mit integrierter DNA nicht ausreicht, um in Zellkulturexperimenten mit Hilfe von ELISA, Immunfluoreszenzanalysen oder im Western Blot den Gentransfer nachweisen zu können. Mit ca.  $10^9$ - $10^{10}$  in den Kapsiden integrierten DNA Kopien pro Milliliter, kann in diesen Ansätzen nur ein Bruchteil der DNA-Menge eingesetzt werden, die normalerweise für klassische Transfektionsexperimente verwendet werden (ca.  $10^{12}$  Kopien). Aus diesem Grund ist es nötig der Effizienz des Kapsidzusammenbaus durch die Wahl eines

optimierten Reassemblierungspuffers zu erhöhen, sowie die Kapside in einem erheblich höheren Maßstab herzustellen.

## 1.2 Expression und Reinigung von Hepatitis B Kapsiden in Eukaryonten

Um die natürlichen Replikationsmechanismen der Hepadnaviren in Bezug auf die Nukleinsäureverpackung auszunutzen, sollte versucht werden Nukleokapside in immortalisierten Zelllinien zu exprimieren. Hierfür wurden die drei erforderlichen Komponenten (Core-, Pol- sowie Verpackungskonstrukt) in eukaryontische Expressionsplasmide integriert.

Durch „Triple“-Transfektion sollten nun alle drei Konstrukte in der Zelle transkribiert und im Fall der Core- und Pol Expressionskonstrukte auch translatiert werden. Die Expression, sowie die Assemblierung der Core-Proteine zu Kapsiden, konnte durch Sucrosegradientenzentrifugation mit anschließendem Immunoblot gezeigt werden. Die N-terminale Fusion des Core-Proteins mit dem TLM, sowie die Insertion des TLM in den *spike tip* hatten unter den gewählten milden Lysebedingungen keinen Einfluss auf die Fähigkeit zur Kapsidbildung. Die Expression der Polymerase konnte ebenfalls durch Western Blot-Experimente bestätigt werden. Für das Verpackungskonstrukt p2688GFP konnte in vorangegangenen Arbeiten die Translation, sowie der Einbau in Kapside im viralen Kontext nachgewiesen werden [171]. Nach der Transfektion mit dem Verpackungskonstrukt pEεCMVGFP konnte die Expression des Reportergens durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

### 1.2.1 Kapside im Überstand transfizierter Zellen

Core-Partikel konnten sowohl in den Zellen, als auch im Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Da die Partikel durch die Kombination mit dem TLM die Fähigkeit besitzen, die Plasmamembran der Zelle zu durchqueren, wurde vermutet, dass die TLM-Core-Kapside in größerer Menge als die Wildtyp-Kapside im Überstand angereichert werden. ELISA-Untersuchungen zeigten allerdings vergleichbare Antigenlevel der verschiedenen Core-Konstrukte im Überstand. Möglicherweise werden die WT-Core, sowie die

TLM-Core-Kapside durch zytosolische Bindungspartner in der Zelle zurückgehalten, so dass es zu keiner verstärkten Anreicherung der mit dem TLM modifizierten Core-Proteine kommt.

Die Gegenwart von Kapsiden im Überstand kann durch nekrotische Zellen erklärt werden, da es hierbei zu einer Freisetzung von zellulären Proteinen in den Überstand kommt. Eine andere Erklärung wäre die für das entenhomologe Kapsid gefundene Fähigkeit der Kapside, im Zuge der RNA-Transkription, also der Partikel-Reifung, an Membranstrukturen zu binden [172]. Möglicherweise gelangt auf diese Weise auch ein Teil der Kapside über die Membran in den Überstand.

### 1.2.2 Endogene Polymerase Reaktion

Mit Hilfe der endogenen Polymerase Reaktion (EPR) wurde versucht, die Verpackung und die reverse Transkription der RNA-Transkripte nachzuweisen. In mehreren Versuchen konnte dies nicht gezeigt werden. Im Fall des Konstruktes pE $\epsilon$ CMVGFP konnte die reverse Transkription nicht erwartet werden, da außer dem  $\epsilon$ -Signal wohl noch weitere genomische Faktoren bei der reversen Transkription eine Rolle spielen [5]. Andererseits konnte die Verpackung eines ähnlich artifiziellen Konstruktes in der Literatur beschrieben werden [173].

Im Fall des Konstruktes p2688GFP konnte die Verpackung und die reverse Transkription durch die EPR nicht nachgewiesen werden. Auch durch die Isolierung der Core-assoziierten RNA mit anschließender RT-PCR konnte keine kapsidassoziierte Nukleinsäure detektiert werden.

Ein möglicher Grund hierfür ist die Schwierigkeit, die drei Konstrukte in einem adäquaten Verhältnis zueinander in der Zelle zur Expression zu bringen. Möglicherweise wird die Verpackung durch die Überexpression der viralen Polymerase inhibiert. So könnten vorhandene RNA Transkripte mit Polymerase-Molekülen interagieren, die nicht an das Core-Protein binden, während Core-Protein assoziierte Polymerasemoleküle keine freien RNA-Transkripte zur Verfügung haben. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, wäre die Expression der Polymerase unter der Kontrolle eines schwächeren oder eines kontrollierbaren Promotors. Jüngste TaqMan-Analysen deuten allerdings darauf hin, dass auch in diesem System RNA verpackt und revers transkribiert wurde.

### 1.2.3 Ausblick

Die Verwendung von zellpermeablen Nukleokapsiden ist ein vielversprechender Ansatz auf dem Weg ein effizientes, sicheres und kostengünstiges Gentransfersystem zu etablieren. In dieser Arbeit ist es gelungen, mit Hilfe der auf *E. coli* basierenden Herstellung der Kapside mit anschließender DNA Verpackung die Grundlage für dieses System zu schaffen.

In Bezug auf die Entwicklung neuartiger Vakzine ist das Kapsid des Hepatitis B-Virus seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung [102]. Hierbei stand bisher die Entwicklung einer Vakzine für die Stimulation der humoralen Immunantwort im Vordergrund, da das Einbringen von Epitopen in den *spike tip* eine gute Präsentation der Peptide und damit eine effiziente Aktivierung von B-Zellen bewirkt.

Ein weiteres denkbare Anwendungsgebiet der zellpermeablen Core-Partikel ist der *ex vivo* Protein- und DNA-Transfer in dendritische Zellen. Die Tatsache, dass diese sehr potent antigenpräsentierenden und damit immunstimulatorisch wirkenden Zellen, ohne weitreichende chirurgische Eingriffe, aus autologen Blutpräparaten des zu therapierenden Patienten gewonnen werden können, lässt diesen Ansatz sehr vielversprechend erscheinen. Durch „Pulsen“ der Zellen mit z.B. Oberflächenmarkern von Krebsgewebe zum einen auf DNA-Ebene (in den Partikeln verpackt) und zum anderen auf Proteinebene (an die Kapside fusioniert), könnten in einem Ansatz sowohl MHC-I als auch MHC-II abhängige immunstimulatorische Effekte erzielt werden. Die Entwicklung von Tumorkvakzinen scheint somit durch diesen Ansatz möglich. Dies zeigen auch präklinische Studien an Tieren, bei denen durch das Pulsen von DCs mit Tumormarkern und ihre Applikation eine potente antigenspezifische Tumormunität erzielt werden konnte [174].

Eine weitere Möglichkeit für den Einsatz der Kapside stellt der *in situ* und *in vivo* Gentransfer dar. Durch Applikation der DNA beladenen Kapside in das Tumorgewebe sollte es möglich sein, therapeutische Gene in das Gewebe einzubringen. Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass im Fall des Proteintransfers mit Hilfe des TLM, bei denen das Protein in die Blutbahn von

Mäusen injiziert wurde, mehrere dem Endothel angrenzende Zellschichten gefärbt werden konnten [121]. Ein gleichartiger Effekt der TLM-Core-Partikel in bezug auf das so genannte *spreading*, würde die Effizienz des Gentransfers erheblich steigern. Des weiteren ist durch die Fusion des in den Kapsiden vorliegenden Transgens mit einer für ein zellpermeables Peptid kodierenden Sequenz die Erzeugung des so genannten *bystander* Effektes möglich. Durch die Membrangängigkeit des Genproduktes kommt es zu einer Ausbreitung der therapeutisch wirksamen Proteine von der produzierenden Zelle in das Nachbargewebe und damit zu einem erhöhten therapeutischen Effekt [175].

Durch die Fusion von Liganden an das Kapsid ist auch eine gewebespezifische Anwendung denkbar. Prinzipell kann diese Anwendung auf zwei Arten basieren. Liganden können zum einen N-terminal an das Wildtyp Kapsid gekoppelt werden. Allerdings ist hierbei notwendig, dass der Rezeptor im Zuge der Ligandenbindung internalisiert wird und dabei das Kapsid über den endosomalen *Pathway* in die Zelle schleust. Dies würde allerdings durch den damit einhergehenden lysosomalen Abbau der DNA zu einer geringeren Transfektionseffizienz führen. Zum anderen könnte durch Kombination eines Liganden mit dem zellpermeablen TLM-Core-Kapsid dieses Problem umgangen werden. Allerdings müsste hierfür ein in den *spike tip* des Kapsides eingebrachtes zellpermeables Peptid durch den N-terminal fusionierten Liganden maskiert werden, da es sonst aufgrund der Zellpermeabilität zum unspezifischen Gentransfer kommen würde. Im Zuge der Ligandenbindung sollte nun die Maskierung aufgehoben werden und das Kapsid, vermittelt durch das zellpermeable Peptid, in die Zellmembran eindringen. Durch das Gleichgewicht von rezeptorgebundenen und vom Rezeptor dissoziierten, „freien“ Kapsiden sollten die Kapside in der Lage sein endozytoseunabhängig in die Zelle einzudringen.

Um Kapside mit verschiedenen Liganden versehen zu können, wurden bereits verschiedene Methoden publiziert. So ist es gelungen durch die Fusion mit dem Protein Z, einer antikörperbindenden Domäne des Protein A aus *Staphylococcus aureus*, spezifisch Antikörper an VLP's zu binden [176]. Ein anderer Ansatz nutzt die Bindung einer glutamatreichen Region auf dem vom VP-1 Protein abgeleiteten Kapsid, mit einer argininreichen Region von rekombinant hergestellten Antikörperfragmenten. Dadurch können die ebenfalls in den



Interaktionspartnern vorhandenen Cysteine durch Oxidation miteinander kovalent verknüpft werden [177].

Ein weiterer Aspekt ist der Einsatz der zellpermeablen Partikel für die Untersuchung der frühen Schritte der HBV-Infektion. Bislang existiert kein zufriedenstellendes Zellkultursystem, um die ersten Schritte des Virus nach der Internalisierung und dem Abstreifen der Oberflächenproteine zu untersuchen. Der Einsatz der Kapside mit darin verpackter HBV-DNA, stellt in dieser Hinsicht eine gute Möglichkeit dar, die Mechanismen, die zum Andocken der Partikel an die Kernmembran und der anschließenden Freisetzung der DNA aus dem Kapsid in den Kern führen sowie den Beginn der Nukleinsäurereplikation zu untersuchen.

## **2 Generierung von HBV-Viren, die innerhalb des TLM mutiert sind**

### **2.1 Mutagenese**

Um die Funktion des TLM für den viralen Lebenszyklus zu untersuchen, wurde ein HBV Genom erzeugt, in dem die 12 Aminosäuren umfassende Sequenz mutiert ist.

Das TLM stellt ein amphipathisches  $\alpha$ -helikales Aminosäuremotiv dar, das bei allen Hepadnaviridae hoch konserviert ist [129]. In Strukturberechnungen wurden auch für diese Bereiche  $\alpha$ -helikale Strukturen postuliert [129]. Dieses hohe Maß an struktureller Konservierung, legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein für den Lebenszyklus der Hepadnaviren essentielles Strukturmotiv handeln könnte. Um dies zu untersuchen, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese im HBV-Genom innerhalb des TLM vier Aminosäuren ausgetauscht, die eine charakteristische Änderung des Hydropathieprofils zur Folge hatten. Die Mutante ist strukturell mit einer bereits existierenden Mutante, dem PreS2-3S, verwandt, bei der drei hydrophobe Aminosäuren durch drei hydrophile Serine ausgetauscht wurden. Für dieses Peptid konnte durch CD-Spektroskopie eine  $\beta$ -Faltblattstruktur beschrieben werden [79].

## 2.2 Expressionsmuster der mutierten Viren

Um die Bedeutung des TLMs für den viralen Lebenszyklus charakterisieren zu können, wurde ein HBV-Expressionskonstrukt, in dem das TLM mutiert wurde, hergestellt. Mittels dieses Konstruktes konnte die Relevanz des TLMs für die virale Morphogenese charakterisiert werden. Nach Transfektion von HepG2-Zellen wurde durch Western Blot-Analyse, ELISA-Messungen und *in vivo* Labelling-Experimenten die Expression der viralen Oberflächenproteine, sowie des Core-Antigens untersucht. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Expressionsmuster des Wildtyp- und dem des mutierten HBV-Genoms. Da die Mutationen in keiner der beschriebenen Promotor-Regionen eingebracht wurden, war zumindest kein *cis*-Effekt zu erwarten. Die Expression der viralen Polymerase wurde indirekt durch die endogene Polymerase Reaktion untersucht. Dadurch konnte die korrekte Translation des Polymerase-Leserahmens und deren Funktionalität gezeigt werden. Mit Hilfe dieser Methode war es außerdem möglich, die Virusmenge zu quantifizieren. Dabei zeigte sich, dass die Viren im gleichen Verhältnis gebildet wurden.

In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich allerdings eine unterschiedliche Verteilung des LHBs in der transient transfizierten Zelle. Die eingebrachten Mutationen fördern die Tendenz der Oberflächenproteine zur Zusammenlagerung, was sich allerdings nicht auf die Virussekretion auswirkte. Durch die Präparation des ER konnte gezeigt werden, dass der LHBs-Level der mit dem TLM<sub>mut</sub>-Konstrukt transfizierten Zellen mit dem Level, der mit dem Wildtyp-Genom transfizierten Zellen, vergleichbar ist. Die granuläre Verteilung des LHBs ist demzufolge nicht auf eine erhöhte Expression des LHBs zurückzuführen.

## 2.3 Topologie der mutierten LHBs-Proteine

Ein weiterer Gesichtspunkt war die Untersuchung des Einflusses der TLM-Mutationen auf die duale Topologie des großen Oberflächenproteins. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, aus welchem Grund bei einem Teil der LHBs-Proteine die Transmembranregion 1 nicht genutzt wird und somit der N-Terminus

zytoplasmatisch lokalisiert ist [27, 83, 84]. Während der kotranslationalen Translokation des LHBs in die Membran des ER verbleibt der N-Terminus auf der zytosolischen Seite und wird durch einen bisher nicht geklärten Mechanismus posttranslational transloziert. Möglich wäre hierbei ein Einfluss des TLM, da diese Peptidsequenz die Eigenschaft besitzt biologische Membranen zu durchqueren. Durch die eingebrachten Mutationen in das HBV-Genom konnte der Einfluss auf die Lokalisation des LHBs durch zwei Ansätze untersucht werden. Zum einen wurden Mikrosomen aus Hepatom-Zellen isoliert, die mit den LHBs-Expressionskonstrukten transfiziert wurden. Durch einen anschließenden tryptischen Verdau, bei dem nur zytosolisch orientierte Domänen proteolytisch gespalten werden, konnte kein Unterschied zwischen den beiden transfizierten Konstrukten festgestellt werden. Da in diesem Versuch allerdings auch der Verdau des Wildtyp-LHBs entgegen der Theorie nahezu vollständig war, wurde ein weiterer Test zur Untersuchung dieses Sachverhaltes herangezogen.

Im Zuge der Virusknospung werden LHBs Moleküle, deren PreS1/PreS2-Regionen in das Lumen des ER gerichtet sind auf der Oberfläche des Virus exponiert. Zytosolisch orientierte PreS1/PreS2-Regionen hingegen, sind für die Interaktion mit dem Kapsid verantwortlich und deshalb im Virusinneren lokalisiert. Wäre die posttranslationale Translokation der im TLM mutierten Proteine gehemmt, sollte dieser Bereich durch die Retention der PreS1/PreS2-Region auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran lokalisiert sein und somit in das Innere des sekretierten Virus weisen.

Durch die endogene Polymerase Reaktion ist es möglich Viren im Zellkulturüberstand nachzuweisen. Ein Schritt hierbei ist die Immunpräzipitation mit Oberflächenantigen-spezifischen Antikörpern. Durch die Verwendung von PreS1 bindenden Antikörpern ist es nun möglich die Lokalisation der PreS1-Domäne im sekretierten Virus zu detektieren, da im Fall der gehemmten Translokation keine Viren durch PreS1-spezifische Antikörper präzipitiert werden könnten.

Da TLM defiziente Virionen auch mit PreS1-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden konnten, ist nicht von einer vollständigen Hemmung der posttranslationalen Translokation durch die eingebrachten Mutationen auszugehen.

## 2.4 Infektionsmechanismus

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die PreS2-Region innerhalb des LHBs nicht für die Infektiosität der Viren erforderlich ist [178]. In diesen Untersuchungen wurden Viren hergestellt, die über 5 Aminosäuren umfassende Deletionen im PreS2-Bereich des LHBs-Proteins beinhalten. Allerdings besitzen diese Viren eine intakte PreS2-Region, was dazu führen kann, dass Deletionen im PreS2-Bereich des LHBs-Proteins durch die Gegenwart der PreS2-Region im MHBs kompensiert werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Viren sind im LHBs- und im MHBs-Leserahmen mutiert, so dass eine Kompensation von mutierten LHBs-Proteinen durch intakte MHBs-Proteine ausgeschlossen ist.

Die Entdeckung der Carboxypeptidase D als potentiellen Rezeptor des Enten Hepatitis B-Virus [32], sowie die Beobachtung, dass Viren nach mildem proteolytischen Verdau mit V8-Protease in der Lage sind, normalerweise nicht-permissive Hepatomzelllinien zu infizieren [179, 180], führt zu der Annahme, dass der proteolytische Verdau der Oberflächenproteine essentiell für die Infektiosität der Hepadnaviren ist. Darauf folgende Experimente mit Deletionsmutanten der Carboxypeptidase D zeigen wiederum, dass in diesem System die proteolytische Domäne für die Etablierung der Infektion nicht notwendig ist [181]. Da die Carboxypeptidase D allerdings ubiquitär exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass weitere leberspezifische Faktoren mit möglicher proteolytischer Aktivität eine Rolle spielen.

Interessanterweise bedingt der proteolytische Verdau der Hepatitis B-Viren einen Verlust an zellspezifischer Bindung [179].

Diese Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass es in einem ersten Schritt zur Bindung des Virus an leberspezifische Oberflächenmoleküle kommt. Daraufhin werden durch den Rezeptor, oder einen Kofaktor die Oberflächenproteine partiell verdaut, so dass in einem zweiten Schritt eine zellunspezifische fusiogene Sequenz exponiert wird und dadurch der Kontakt mit der Zellmembran hergestellt wird. Da der N-Terminus über einen Myristylrest in der Virusmembran verankert ist, ist eine Rolle des Translokationsmotives in diesem Zusammenhang möglich, obwohl sich die Spaltstelle der V8-Protease C-terminal des TLM befindet. Des weiteren könnten durch den partiellen

proteolytischen Verdau an der Zellmembran unverdaute Moleküle exponiert werden, die dann die Fusion mit der Zellmembran herstellen.

## 2.5 Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Morphogenese des Virus besitzen. Es bleibt zu untersuchen inwieweit sich die Mutationen innerhalb des TLM auf die Infektiösität der Viren auswirkt.

Allerdings steht zur Zeit kein befriedigendes System für in Zellkultur hergestellte Viren zur Verfügung. Die Entdeckung, dass aus Tupaia's (*Tupaia belangeri*) isolierte Hepatozyten durch HBV-Serum in der Zellkultur infiziert werden können, stellt eine neue Möglichkeit dar auch in Zellkultur generierte Viren auf deren Infektiösität zu testen. Des Weiteren konnte durch die Transplantation von humanem Lebergewebe in Mäusen ein System zur *in vivo*-Infektiösität von Hepatitis B-Viren geschaffen werden [182]. Allerdings wurden hier die Infektionsversuche wiederum mit HBV-haltigem Serum durchgeführt. Es bleibt zu untersuchen, ob in Zellkultur hergestellte Viren ähnliche Ergebnisse bezüglich der Infektiösität zeigen.

Da im Fall des Enten Hepatitis B-Virus ein Zellkultursystem zur Untersuchung der Infektiösität besteht, werden innerhalb unserer Arbeitsgruppe Enten-Hepatitis-B-Viren (DHBV) hergestellt, die in den TLM-homologen Bereichen mutiert sind. Das Virus besitzt in der PreS-Region allerdings zwei Bereiche, die eine dem TLM entsprechende Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren aufweist [129]. Durch die Verwendung von Computersimulationen konnte für diese Bereiche ebenfalls eine starke Tendenz zur Bildung einer  $\alpha$ -helikalen Anordnung festgestellt werden. Es werden in diesem Zusammenhang vier verschiedene Viren untersucht. Zum einen zwei Viruspräparationen in denen jeweils nur ein TLM-homologes Motiv mutiert wurde, eine Präparation bei der beide Motive mutiert sind und als Kontrolle das Wildtyp Entenvirus.

## F Material

### 1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Promega, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
Butanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Caesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Desthiobiotin	
(5-Methyl-2-oxo-4-imidazolinecaproic acid)	ICN, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Didesoxynukleotide	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Fluka, Deisenhofen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
ECL-Western Blot Detektionssystem)	Amersham
EDTA (Ethyldiaminotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Haën
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Filterpapier 3MM	Whatman
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
HABA	
(2-[4'-Hydroxyphenylazo]benzoic acid)	ICN, USA
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Hybond-P	APBiotech, Schweden
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Nonidet-P-40	Sigma, Deisenhofen
Protein G-Sepharose	Roche, Mannheim
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka, Deisenhofen
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylaminomethan)	Sigma, Deisenhofen
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen
t-RNA	Roche, Mannheim
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer)	Beckman, USA
Zentrifugalkonzentratoren	Pall Filtron, USA

Die Chemikalien, Salze und Lösungsmittel wurden in der Qualität „reinst“ oder „analytic grade“ bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE (Milli Q).

## 2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen Typ II	Roche, Mannheim
DNase	Roche, Mannheim
Trypsin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Advantage 2 Polymerase	Clontech, Heidelberg
<i>Pfu Turbo</i> -Polymerase	Stratagene, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment	Roche, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim

### 3 Antikörper

Primäre Antikörper:

rabbit anti HBc-Ag Serum	Dako, USA
mouse anti HBc-Ag mAk (mAb 16989)	Chemicon, USA
goat anti HBs-Ag Serum	Dako, USA
PreS1 spezifischer Antikörper MA18/7	Gerlich, Gießen

Sekundäre Antikörper:

goat anti-mouse Ig Peroxidase-konjugiert	Amersham Pharmacia Biotech
rabbit anti-goat Ig Peroxidase-konjugiert	Jackson Immuno-Research
Cy <sup>Tm</sup> 3-konjugierter goat anti-mouse Ig	Jackson Immuno-Research
Cy <sup>Tm</sup> 3-konjugierter donkey anti-rabbit Ig	Jackson Immuno-Research

### 4 Materialien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco´s Modified Eagles Medium)	Sigma, Deisenhofen
RPMI-1640	Sigma, Deisenhofen
DMEM ohne Methionin	Sigma, Deisenhofen
FCS (fötales Kälberserum)	PAA
Natrium-Pyruvat-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Penizillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Zytokine: IL-4, GM-CSF	Sigma, Deisenhofen
Lipofectamin	Invitrogen, USA

### 5 Längenstandards

LMW-Marker	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Rainbow Marker RPN 755/756	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Multimarker	Novex
DNA Längenstandard X	Roche, Boehringer, Mannheim



## 6 Radiochemikalien

[ $\alpha$ -32P] dCTP	Amersham Pharmacia
[35-S]-Methionin	Biotech, Schweden

## 7 Verwendete Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
HBs ELISA DADE BEHRING	Enzygnost® HBsAg 5.0, Marburg
HBe ELISA DADE BEHRING	Enzygnost® HBe monoclonal
ECL 1 & 2 Substrat	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Statagene, USA
AmpliTaq® FS BigDyeTerminator	Applied Biosystems, USA

## 8 Plasmide

### HBV-Plasmide

pSPT1.2xHBV	HBV Subtyp adr4	L. Weiß 1995
pSM2	HBV Subtyp ayw	MPI, Martinsried
p2688GFP		L. Weiß 1995

### kommerziell erhältliche Plasmide

pcDNA3.1(-)	Invitrogen, USA
pASK-IBA7	IBA, Gießen
pQe8	Qiagen, Hilden
pEGFP-N1	Clontech, USA

## 9 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und TIB-Molbiol (Berlin) hergestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

### PCR-Primer:

Bezeichnung	Länge [BP]	SEQUENZ
f-1903-BamHI	30	AAAG <u>GATCC</u> ATGGACTACGACCCTTATAAAGAA
f-TLM-1861-BamHI	75	TTT <u>GATCC</u> ATGCCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGATT GGGGACGGTACTTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTT
f-RGD-2140-EcoRI	39	TTT <u>GAATTC</u> CGAGGCGACGCGTCTAGAGACCTAGTAGTC
f-TLM-2140-EcoRI	66	TTT <u>GAATTC</u> CCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGGG GACCCTGCGTCTAGAGACCTAGTAGTC
b-2349-HindIII	30	TTT <u>AAGCTTTT</u> AACAACAGTAGTTTCCGG
b-2358-HindIII	30	CCCA <u>AAGCTT</u> TTATCGTCGTCTAACAACAGT
b-2454-HindIII	27	TTT <u>AAGCTT</u> CTAACATTGAGGTTCCCG
b-2139-EcoRI	36	AAAGA <u>AATTC</u> TGGATCTTCCAAATTAACACCCACCCA
f-SHBs-BglII	33	GGG <u>AGATCT</u> ATGGAGAACATCACATCAGGATTC
b-SHBs-BglII	33	CCC <u>AGATCT</u> TTAAATGTATACCCAAAGACAAAA
f-epsilon-EcoRI	32	CCC <u>GAATTC</u> ATGTCATCTCTTGTTTCATGTCTTA
b-epsilon-Sall	29	AAAGT <u>CGACG</u> GCGATGTCCATGCCCCAAA
f-pol-NotI	32	CCCG <u>CGGCCG</u> CATGCCCTATCCTATCAACAC
b-pol-HindIII	31	CCCA <u>AAGCTT</u> TACGGTGGTCTCCATGCGACG
f-CMV-Sall	36	GGGGT <u>CGACG</u> CATGTACGGGCCAGATATACGCGTTG
b-CMV-BamHI	33	GGGG <u>GATCC</u> AATTTTCGATAAGCCAGTAAGCAGT CTGCCTCACCCACATCGTCAACCTTCTCGACGATTGGGG
f-Mut-TLM	43	ACCC
b-Mut-TLM	43	GGGTCCCAATCGTCGAGAAGGTTGACGATGTGGGTGA GGCAG

**Primer für die Sequenzanalyse:**

Bezeichnung	Länge [BP]	Sequenz
f-pASK	21	AGAGTTATTTTACCACTCCCT
b-pASK	19	GACGCAGTAGCGGTAAACG
f-pCDNA3	17	ACTGGCTTATCGAAATT
b-pCDNA3	17	AGCTCTAGCATTTAGGA
f-pVL139x	17	AATGATAACCATCTCGC
b-pVL139x	15	GTCCAAGTTTCCCTG
pSPTnt100	19	TTTCTTGTTGACAAGAATC
pSPTnt650	18	TATTGGGGGCCAAGTCTG
pSPTnt1273	18	GACCCAAGCTTGCATGCC
pSPTnt1300	18	ATAGCCGCATGCGCGGAA
pSPTnt1950	17	GGCCTTAGAGTCTCCGG
pSPTnt2300	18	AATGTTAGTATCCCTTGG
PSPTnt2800	18	CGATCACCAGTTGGACCC
f-aywnt1	17	AATCCACAACCTTTTAC
f-aywnt609	19	AATTGCACCTGTATTCCCA
f-aywnt1116	18	TCTCGCCAACCTTACAAGG

**Primer und Sonde für die TaqMan-Analyse:**

Bezeichnung	Länge [BP]	Sequenz
f-Primer- Sonde	20	GGACCCCTGCTCGTGTTACA
b-Primer- Sonde	25	GAGAGAAGTCCACCMCGAGTCTAGA
Sonde- SHBs	30	FAM-TGTZGACCARAATCCTCACCATACRCAGA-TAMRA

## 10 Geräte

### Elektrophorese- und Blotsysteme

Horizontal-Elektrophorese-Systeme GNA 100 und 200 mit EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech (Hoefer), Schweden
Vertikale-Elektrophorese-Systeme, SE 260 und 600 mit EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech (Hoefer), Schweden
Semi-Dry-Blotkammer Semiphor und Multiphor II mit EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech (Hoefer), Schweden

### Zentrifugen / Rotoren

Tischzentrifugen Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Untertischzentrifuge Minifuge 2	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge Superspeed RC-5B mit folgenden Rotoren: HB 4, GS 3, SM 24, SS34	Sorvall-Instruments, Bad Homburg
Ultrazentrifuge L8 mit Ti 50 Rotor	Beckman, USA
SpeedVac Concentrator SVC 100 H	Savant, USA

### Chromatographiegeräte / Säulen

Äkta Explorer	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Ettan LC	Amersham Pharmacia Biotech
Gelfiltrationssäule Superdex200	Amersham Pharmacia Biotech
Affinitätschromatographiesäule Nickel NTA	Qiagen, Hilden
Affinitätschromatographiesäule <i>Strep-tag</i>	IBA, Gießen

### Mikroskope

Lichtmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop DM RBE und Fotoeinheit	Leitz, Wetzlar Leica, Solms

**Sonstige Geräte**

Thermo-Cycler PTC-100	MJ Research, USA
Termomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Unitron HT-Infors, Bottmingen, Schweiz
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Universalwaage	Sartorius, Göttingen
Feinwaage 1608 MP	Sartorius, Göttingen
Photometer Ultraspec 3300 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Sterilbank	HeraSafe Heraeus, Osterode
Tischschüttler	Duomax 1030, Heidolph
Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Automatischer Filmentwickler	Agfa Curix 60 Aqua, Köln
E max precision mikroplate reader	Molekular Devices, USA

**11 Zelllinien und Bakterienstämme**

Die verwendeten Zelllinien wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur, Braunschweig) bezogen.

**Eukaryontische Zelllinien**

Zelllinie	Zellart	DSMZ-Nummer
293 HEK	Humane, embryonale Nierenfibroblastozelllinie	ACC 305
HepG2	Zelllinie eines humanen Hepato- zellulären Karzinoms	ACC 180
HepG2.2.15	Stabil HBV produzierende Zelllinie auf Basis von HepG2-Zellen	(Sells et al., 1987)

## Bakterienstämme

---

### Zelllinie

---

E. coli K12 DH5 $\alpha$	<i>F<sup>-</sup>, endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), supE44, thi1, lambda<sup>-</sup>, recA1, gyrA96, relA1, Ø80dlacZ M15 (Gibco/BRL)</i>
E. coli Sure	<i>e14<sup>-</sup>, (McrA<sup>-</sup>), D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>), uvrC, [F', proAB, lac<sup>f</sup>ZD(M15, Tn10, (Tet<sup>r</sup>)] (Stratagene)</i>
E. coli XL-1 blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB lac<sup>f</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] (Stratagene)</i>

---

# G Methoden

## 1 Molekularbiologische Methoden

### 1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäurefragmente von 0,1 bis 20 kB Größe werden für analytische und präparative Zwecke in horizontalen 0,6-2,3 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Schmelzen der Agarose in TAE-Puffer wird vor dem Gießen des Gels Ethidiumbromid (Endkonzentration: 50 ng/ml) in die Agaroselösung gegeben. Die Auftrennung erfolgt bei einer Feldstärke von 2-10 V/cm.

Probenpuffer (5x):  
10 mM Tris/HCl pH8,0  
100 mM NaCl  
0,25 % Bromphenolblau  
30 % Glycerol

TAE-Puffer:  
40 mM Tris/HCl pH8,0  
40 mM Natriumacetat  
1 mM EDTA

Agarosegel: 0,8-1,2 % Agarose in TAE-Puffer

### 1.2 Auffüllen überstehender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase

Um "blunt end"-Ligation mit Fragmenten die überstehende 5'-Enden besitzen durchführen zu können, werden diese mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt. Dazu werden ca. 2 µg des DNA-Fragments mit 4 µl NEB-Puffer (10x) und 4 µl dNTP-Mischung (je 3,3 mM) versetzt, mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf ein Endvolumen von 40 µl gebracht und mit 2U Klenow-Fragment versetzt.

Die Inkubation erfolgt für 15 min bei 25°C. Das Enzym wird anschließend durch Erhitzen auf 75°C für 10 min inaktiviert.

### 1.3 Dephosphorylierung von DNA

Die Umsetzung linearisierter Vektoren mit alkalischer Phosphatase dient zur Verhinderung der Religation durch das Entfernen der 5` terminalen Phosphatgruppen. Dazu werden bis zu 15 µg linearisierte DNA mit 1/10 des Endvolumens 10x CIP-Puffer und 5 U alkalischer Phosphatase (ROCHE) versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C werden weitere 5 U Enzym zugesetzt und erneut für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Erhitzen des Ansatzes auf 68°C für 10 min sowie anschließender Reinigung mittels Quickspin-Säulen (siehe 1.4).

### 1.4 Reinigung von DNA

Um DNA aus PCR-Reaktionen, Restriktionsverdau, oder Ligase-Reaktionen zu reinigen, werden *Quickquick Spin PCR Purification*-Säulen (QIAGEN) verwendet. Maximal 10 µg der zu reinigenden Nukleinsäure werden auf 600 µl mit PB-Puffer versetzt, auf eine Spinsäule gegeben und durch Zentrifugation (10.000 g, 1 min) auf der Membran immobilisiert. Nun werden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und die DNA durch Zentrifugation gewaschen (10.000 g, 1 min). Dies wird ein zweites mal wiederholt bevor die DNA mit 30-50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eluiert wird.

### 1.5 DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen

Nach präparativer Agarosegelelektrophorese von linearisierter DNA wird das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten in ein Eppendorf-Gefäß überführt und in dreifachem Volumen (m/V) QG-Puffer gelöst. Anschließend wird die Lösung auf eine *Qiaquick Spin PCR Purification*-Säule gegeben und durch Zentrifugation auf der Säule immobilisiert. Die Reinigung der DNA erfolgt nun wie unter 1.4 beschrieben.



## 1.6 DNA-Ligation

Die Ligase des Phagen T4 katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die kovalente Verknüpfung der 5` Phosphatgruppe des einen DNA-Moleküls mit der 3` OH-Gruppe des anderen. Die Ligation erfolgt bei einem 3-fachen molaren Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragmentes gegenüber dem Vektor. 100-150 ng des linearisierten Vektors und die entsprechende Menge des Inserts werden mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf ein Volumen von 8 µl gebracht, 1 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase zugesetzt. Die Inkubation erfolgt für 20 min auf Eis, dann für mindestens 3 h bei 16°C.

Die Insertmenge berechnet sich nach folgendem Schema:

$$Menge(Insert)[ng] = \frac{MengeVektor[ng] * Basenpaare(Insert) * 3}{Basenpaare(Vektor)}$$

## 1.7 Entfernen von Nukleotidmonomeren über Gelfiltrationschromatographie

Bei Sequenzierreaktionen sowie bei Endogenen Polymerase Assays müssen die nicht in den DNA Strang eingebauten Nukleotidmonomere abgetrennt werden. Dies wird über kommerziell erhältliche Gelfiltrationssäulen (QIAGEN, Dye Ex-Spinsäulen) durchgeführt. Die Säulen werden nach den Herstellerangaben vorbereitet, der Reaktionsansatz auf das Gelbett gegeben und durch Zentrifugieren die DNA-Moleküle ab einer Länge von ca. 30 Basenpaaren eluiert.

## 1.8 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung und Reinigung wird die Nukleinsäure unter Hochsalzbedingungen (2 M Ammoniumacetat oder 0.8 M Lithiumchlorid) mit 2.5 Volumina eiskaltem Ethanol oder 0.7 Vol. Isopropanol gefällt. Bei geringen DNA-Mengen oder kurzen Fragmenten wird werden zur Erhöhung der Fällungseffizienz 10 µg <sup>1</sup>RNA pro Ansatz zugegeben und ÜN bei -20°C inkubiert bevor die DNA durch Zentrifugation für 30 min bei 10.000 g und 4°C pellettiert

wird. Das Pellet wird zum Entfernen von Salzresten mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem vollständigen Entfernen der Ethanolreste wird die Nukleinsäure in  $H_2O_{dd}$  gelöst.

### 1.9 Herstellung kompetenter *E. coli*

800 ml LB-Medium werden mit 10 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 geschüttelt. Anschließend werden die Bakterien steril abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem TFB1 Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wird im vorgekühlten Rotor abzentrifugiert und die Bakterien in 15 bis 20 ml TFB2 resuspendiert. Die Suspension wird in Eppendorf-Gefäßen in 200–500  $\mu$ l Mengen aliquotiert, die in einer Kältemischung aus Ethanol/Trockeneis vorgekühlt werden. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgt bei  $-70^{\circ}C$ .

TFB1-Puffer	100 mM Rubidiumchlorid 50 mM Manganchlorid 30 mM Kaliumacetat 10 mM Calciumchlorid 15 % Glycerol sterilfiltrieren, Lagerung bei $4^{\circ}C$ , pH 5,8
TFB2-Puffer	10 mM MOPS pH 8,0 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM Calciumchlorid 15 % Glycerol sterilfiltrieren, Lagerung bei $4^{\circ}C$

## 1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Extinktion der Nukleinsäuren wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Einer Extinktion von 1 entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 35 µg/ml einzelsträngige DNA oder RNA. Das Verhältnis der Extinktionen OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub>, das ein Maß für die Reinheit der Präparation darstellt, sollte bei 1.8-2.0 liegen.

## 1.11 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Zum Entfernen kontaminierender Proteinreste aus wäßrigen Nukleinsäurelösungen erfolgt eine ein- bis zweimalige Extraktion mit je einem Volumen Phenol (in TE äquilibriert, pH 7.5-8.0). Zur Phasentrennung wird jeweils kurz zentrifugiert (10.000 g, 1 min). Die Phenolreste werden wiederum durch mehrfache Extraktion mit einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (24:1) entfernt.

## 1.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können in einem zyklischen Prozeß, katalysiert von der hitzestabilen Taq-Polymerase, DNA-Fragmente selektiv amplifiziert werden.

Eine Standard-PCR hat ein Gesamtvolumen von 50 µl. 10 ng (bei Plasmiden) bis 2 µg (bei chromosomaler DNA) *template* wird mit je 100 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Endkonzentration 2 µM) und je 25 nmol jedes der vier dNTP`s (Endkonzentration 500 µM) und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf ein geeignetes Volumen gebracht. Nach Zugabe von 0,5 U Polymerase (CLONTECH, Advantage2-Polymerase) werden die Zyklen (i. R. 30 Zyklen) in einem Thermoblock gestartet. Die erhaltene DNA wird wie unter 1.4 beschrieben aufgearbeitet.

Denaturierung:	1 min	95°C	} 30 Zyklen
Denaturierung:	1 min	95°C	
Annealing:	1 min	55°C	
Elongation:	1-5 min	68°C	

### 1.13 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese können Plasmide mit Hilfe einer PCR-Reaktion und spezifischen Primern ortsgerichtet mutiert werden. Für die Mutagenese wird der *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (STRATAGENE) verwendet.

Durch PCR mit einem zueinander komplementären, die Mutationen beinhaltenden, Primerpaar (Design der Primer und die PCR Reaktion erfolgen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers) und dem zu mutierenden Vektor als „Template“ entstehen im Zuge der Amplifikation „genickte“ Plasmide, die im Gegensatz zum in *E. coli* produzierten *Template*-DNA nicht methyliert sind.

Zyklusfolge:

Denaturierung:	3 min	95°C	} 18 Zyklen
Denaturierung:	30 s	95°C	
Annealing:	1 min	55°C	
Elongation:	14 min	68°C	

Durch Zugabe von 10 U *DpnI* (STRATAGENE) für eine Stunde bei 37°C wird die parentale DNA verdaut und anschließend ein µl des Amplifikates in *E. coli* XL-1 blue (STRATAGENE) transformiert und ausplattiert. Die erhaltenen Klone werden durch DNA-Minipräparation und anschließendem Restriktionsverdau analysiert.

### 1.14 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für eine solche Präparation wird je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge der QIAprep Spin Miniprep Kit oder für eine größere Ausbeute der QIAprep Maxiprep Kit (QIAGEN) verwendet. Sie basieren auf dem von Birnboim und Doly [183] beschriebenen Verfahren. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert und die bakterielle DNA sowie Proteine denaturiert. Die bakterielle RNA wird bereits während der alkalischen Lyse durch die im Resuspendierungspuffer anwesende RNase A abgebaut. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus einer Übernachtskultur. Hierzu werden für eine Miniprep

3-5 ml LB-Medium und für eine Maxiprep 500 ml mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht kultiviert. Die Bakterien werden gemäß dem Herstellerprotokoll bearbeitet. Zur Kontrolle der DNA Präparation werden 1-5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

LB-Medium:	10 g/l Bacto Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	zzgl. 100 µg/ml Ampizillin bzw.
	25 µg/ml Kanamycin
LB-Agarplatten:	LB-Medium
	15 g/l Agar
	zzgl. 100 µg/ml Ampizillin bzw.
	25 µg/ml Kanamycin

### 1.15 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach einer modifizierten Form der Strangabbruchmethode nach Sanger. Anstelle von radioaktiv markierten Didesoxynukleotiden werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleotide verwendet. Dadurch kann die Reaktion in einem PCR-Ansatz ausgeführt werden.

Zu 250–300 ng des zu sequenzierenden Plasmides werden 0,5 µl Primer (10 µM) und 2 µl Premix (APPLIED BIOSYSTEMS, AmpliTaq® FS BigDyeTerminator) gegeben und auf 10 µl Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgt nach folgendem Schema:

Denaturierung:	96°C	30s	} 20-30 Zyklen
Annealing:	55°C	15s	
Elongation:	60°C	4min	

### **1.16 Restriktionsverdau von DNA**

Der Verdau von DNA durch Typ II Restriktionsenzyme erfolgt nach Herstellerangaben (ROCHE).

Der Volumenanteil des Enzyms sollte dabei 10 % nicht überschreiten.

### **1.17 Transformation von kompetenten *E. coli***

Die eisgekühlte DNA-Lösung (Plasmid- bzw. Ligationsansatz) wird mit 100 µl kompetenter Zellsuspension versetzt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgt für genau 90 s bei 42°C, dann folgt eine 5 minütige Abkühlung auf Eis. Nach dem Zusatz von 600 µl kaltem LB-Medium und der Inkubation für 90 min bei 37°C unter Schütteln werden die Bakterien auf einem geeigneten Selektionsmedium ausplattiert (LB Agar mit Antibiotika).



### 2.1.2 Kultivierung von dendritischen Zellen

Zur Kultivierung von dendritischen Zellen werden ca. 60 ml *Buffy Coat* verwendet. Das vom Deutschen Roten Kreuz erhältliche Material wird auf 140 ml mit PBS verdünnt. Zur Isolation von Peripheren Blut Monocyten (PBMC) werden 15 ml Ficoll in einem 50 ml Falcon vorgelegt, mit 35 ml des Ausgangsmaterials überschichtet und bei 24°C für 30 min und 340g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sollte der Rotor ungebremst zum Stehen kommen. Nun wird die Interphase vorsichtig abgenommen und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (4°C, 400g, 7 min) bevor die Zellen in Zellkulturschalen in einer Zelldichte von  $2-4 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI 1640/1 % humanes Plasma kultiviert werden. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wird das Medium erneuert und über Nacht im Zellkulturschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Überstand mit darin enthaltenen B-Zellen abgenommen, die Zellen mit Zellkulturmedium gewaschen und die Monocyten durch Inkubation mit 1600 U/ml GM-CSF sowie 1000 U/ml IL-4 in RPMI 1640-Medium zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. Dieser Vorgang dauert 6-7 Tage wobei nach vier Tagen das Medium erneuert wird.

PBS-Puffer:	40 g NaCl
	1 g KCl
	5,75 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	pH7,1
	ad 5 l mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

### 2.2 Einfrieren und Auftauen von immortalisierten Zellen

Zur Konservierung werden trypsinierte Zellen in 1,5 ml Einfriermedium suspendiert und langsam durch ein Kryostat (das mit Isopropanol gefüllt ist und über den Temperaturkoeffizienten von Isopropanol eine kontrollierte Abkühlrate der Zellen von 1°C pro Minute gewährleistet) auf -80 °C gebracht, um sie dann in flüssigem Stickstoff zu lagern.





### **2.3.2 Lipofektion**

Zur Transfektion einer 10 cm-Schale werden 10 µg Plasmid-DNA mit FCS-freiem Medium auf 730 µl mit FCS freiem Medium (RPMI 1640 bzw. DMEM) aufgefüllt, mit 20 µl Plus-Reagenz (INVITROGEN) versetzt, durchmischt und 15 min bei RT inkubiert. In einem zweiten Reaktionsgefäß werden 720 µl FCS freies Medium mit 30 µl Lipofectamin (INVITROGEN) versetzt, diese anschließend zu dem DNA Gemisch gegeben und nochmals 15 min bei RT inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellkulturschalen wird nun durch 6 ml FCS und antibiotikafreies Medium ersetzt, das DNA/Lipofectamin Gemisch hinzugegeben und für 3-4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Medium durch Komplettmedium ersetzt und der Transfektionsansatz bei 37°C für weitere 2-5 Tage inkubiert.

Bei der Transfektion von Objektträgern oder 6 cm-Schalen werden die Mengen der eingesetzten Reagenzien proportional zu der zu transfizierenden Fläche verringert.

## **2.4 In vivo Markierung zellulärer Proteine von Säugerzellen**

Die Markierung von zellulären Proteinen erfolgt 24 h nach transienter Transfektion (siehe 2.3). Die Zellen werden, um intrazellulär vorhandenes Methionin zu depletieren, für 90 min in methioninfreiem DMEM Medium (0.5 % FCS) inkubiert. Das Medium wird nun mit 6 ml desselben Mediums, das mit 0,5 mCi <sup>35</sup>S-Met versetzt ist, ersetzt. Die Inkubation erfolgt für 2 h.



aufgeschlossen und mit 10x TBS (100µl) versetzt werden. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zellkerne werden durch Zentrifugation bei 400 g und 4°C für 10 min abgetrennt. Der Überstand wird nun auf 2,7 ml eines 250 mM Sucrose-Kissens in TBS überschichtet und die Mikrosomen durch Zenrifugation bei 180.000 g im SW-60TI Rotor (BECKMAN) für 30 min von zytosolischen Proteinen getrennt. Nach vorsichtigem waschen wird das Pellet in 1 ml TBS/Tetracain-Lösung aufgenommen und kann wie unter 2.8 beschrieben weiterverwendet werden.

TBS-Puffer (1x):  
50 mM Tris/HCl, pH7,5  
150 mM NaCl  
(2 mM Tetracain)

## 2.8 Tryptischer Verdau der Mikrosomenpräparation

Die unter 2.7 erhaltene Lösung wird nach dem Zusatz von 2 µl einer 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung in drei 300µl Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktionen wird mit 10 µg Trypsin (ROCHE), eine Fraktion mit 10 µg Trypsin und 1,5 µl einer 10 %igen NP-40-Lösung (in TBS) versetzt und die dritte Fraktion bleibt als Kontrolle unbehandelt. Die Proben werden nun durch Inkubation für 60 min bei 4°C inkubiert und die Proteolyse anschließend durch Zugabe von 15 µg Aprotinin (ROCHE) inhibiert. Zu den noch nicht mit Detergenz versetzten Proben werden 1,5 µl einer 10 %igen NP-40-Lösung gegeben und zur Lösung der Mikrosomen für 20 min bei 4°C inkubiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 6000 g sedimentiert. Die Proben können nun, wie unter 2.6 beschrieben präzipitiert, gelelektrophoretisch getrennt und einer Autoradiographie unterzogen werden.

## 2.9 Kultivierung von *E. coli*

Bakterienkulturen werden in Schüttelkolben in LB-Medium oder auf den entsprechenden Agarplatten bei 37°C gehalten. Die Konservierung erfolgt als Glycerolkultur bei -20°C. Je nach Resistenzgen des in den Bakterien

enthaltenden Plasmides werden die Kulturen mit Ampizillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) versetzt.

LB-Medium: 10 g Bactotryptone  
5 g Bacto-Yeast extract  
5 g NaCl  
in 1 l H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

## 2.10 Lyse von *E. coli*

### 2.10.1 durch Ultraschall

Die Zellen einer Induktionkultur werden abzentrifugiert mit PBS gewaschen und in 20 ml Puffer W suspendiert. Anschließend werden die Zellen durch Ultraschall (4 min, 100 % Leistung, 60 % Zyklus) aufgeschlossen, die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (30 min, 12.000g, 4°C) entfernt und das Lysat weiterverwendet (siehe 3.3.1).

### 2.10.2 durch Lysozym

Die Zellen werden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in Puffer W suspendiert. Die Zellsuspension wird in 50 ml-Falcons überführt und drei "Gefrier-Tau"-Zyklen unterzogen. Dies geschieht durch das Frieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Tauen im Wasserbad bei 37°C. Anschließend werden zu 20 ml Zell-Suspension 10 mg Lysozym (SIGMA) sowie 100 U DNase (ROCHE) gegeben und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile werden nun bis zu dem Erhalt einer klaren Lösung abzentrifugiert (30-40 min, 12.000g, 4°C) und das Lysat wie unter 3.3.1 weiter verwendet.

PBS-Puffer: 40 g NaCl  
1 g KCl  
5,75 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·x2H<sub>2</sub>O  
1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH7,1  
ad 5 l mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

Puffer W: 100 mM Tris/HCl, pH8,0  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA

### 3 Proteinchemische Methoden

#### 3.1 Induktionskultur von *E. coli*

Bei dem verwendeten Expressionsplasmid pASK-IBA7 liegt das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines Tetracyclin abhängigen Promotors/Operators (*tetA*) [156]. Die Proteinsynthese wird durch die Zugabe von 0,2 mg/l Anhydrotetracyclin (AHT) induziert.

Etwa 900 ml mit Ampicillin (100 µg/ml) versetztes LB-Medium wird mit 100 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die 4 bis 6 stündige Induktion erfolgt durch Zugabe von 100 µl AHT-Stammlösung entsprechend einer Endkonzentration von 0,44 µM. Die Zellen werden geerntet, einmal mit PBS gewaschen und können nun zur Proteingewinnung aufgeschlossen werden.

LB-Medium:	10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl zzgl. 100 µg/ml Ampizillin
AHT Stammlösung (10.000x):	1 ml DMF 2 mg Anhydrotetracyclin lichtgeschützt bei -20°C lagern

#### 3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

##### 3.2.1 nach Bradford

Durch die Bindung an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nach 595 nm [184]. Allerdings ist diese Methode nicht bei Anwesenheit von Detergenzien anwendbar und die Sensitivität variiert je nach Protein [185].

1 ml Bradfordreagenz (1:5 verdünnt aus der BIORAD-Stammlösung) werden in einer Küvette mit 3 µl der Probe gemischt und die Extinktion innerhalb einer Stunde bei 595 nm gemessen.

### 3.2.2 durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Tryptophan, sowie schwächer auch Tyrosin und Phenylalanin, absorbieren bei 280 nm. Aufgrund dieser Absorption kann die Konzentration von Proteinen ermittelt werden. Der Wert berechnet sich nach folgender Formel:

$$c(\text{Protein}) = 1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260} \text{ [mg/ml]}$$

Die Formel berücksichtigt Verunreinigungen der Probe durch Anwesenheit von Nucleinsäuren und ist damit für die Bestimmung der Kapsidkonzentration mit darin eingeschlossener RNA/DNA geeignet.

Dabei wurde berücksichtigt, dass im Falle der Berechnung der Kapsidanzahl etwa die Hälfte der gereinigten Proteine in Kapsiden vorliegt. Der errechnete Wert wurde durch zwei geteilt.

## 3.3 Säulenchromatographische Methoden

### 3.3.1 Affinitätschromatographie

Die aus dem pASK-System gewonnenen Proteine können aufgrund des aminoterminalen *Strep-tags* an einer mit *Strep-Tactin* beladenen Sepharose 4B-Matrix immobilisiert werden (IBA).

Nach der Elution mit einem Desthiobiotin-haltigen Puffer wird die Säule durch das Waschen mit einem HABA-haltigen Puffer regeneriert.

Das Lysat einer Induktionskultur (siehe 2.10) wird über eine *Strep-Tactin*-Sepharose Säule gegeben. Die immobilisierten Proteine werden mit dem 10fachen Säulenvolumen mit Puffer W gewaschen und anschließend mit dem 4fachen Säulenvolumen mit Puffer E eluiert. Die Regeneration des Säulenmaterial erfolgt nach Herstellerangaben.

Puffer W:	100 mM Tris/HCl, pH8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA

Puffer E:	100 mM Tris/HCl, pH8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM Desthiobiotin
Puffer R:	100 mM Tris/HCl, pH8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2 mM 2, - (4-hydroxy-phenylazo)- benzoesäure (HABA)

### 3.3.2 Gelfiltrationschromatographie

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie können Proteine entsprechend ihrer Größe getrennt werden. Komplette Core-Proteine können daher über eine Sephadex200-Säule (PHARMACIA) von HBcAg-Monomeren/Dimeren isoliert werden. Als Laufmittel wird Puffer W verwendet.

### 3.4 Native Gelelektrophorese

Core-Kapside können in nativer Form mittel Agarosegelelektrophorese von anderen Proteinen getrennt und anschließend nach einer von Southern [186] beschriebenen Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden.

Zur Darstellung der Core-Partikel werden diese im 1 % Agarose/TAE-Gel unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu werden 8µl der Proben mit 2 µl DNA Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei 8 V/cm. Die Proben werden nun in 1x SSC über Nacht vom Agarosegel auf eine Nitrozellulose-Membran, die zuvor in 1x SSC äquilibriert wird, mittels „Kapillar-Blot“ transferiert.

Die Detektion der Core-Proteine erfolgte anschließend durch Immunoblot (3.9).

SSC-Lösung (20x):	3 M NaCl 0,3 M Na <sub>3</sub> Citrat pH 7,0 mit HCl einstellen filtrieren
-------------------	---



### 3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine größer als 30 kDa werden nach dem Verfahren nach Laemmli [187], kleinere Proteine nach Schägger und v. Jagow [188] gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Trenngels wird dabei der Größe des gesuchten Proteins angepasst.

Die Proteinproben werden in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert. Das Einlaufen der Proben erfolgt bei 80 V für 15 min, danach wird die Spannung auf 130 V erhöht, Die Erwärmung der Gele wird durch Wasserkühlung verhindert. Als Größenstandard werden Rainbowmarker verschiedener Zusammensetzung (AMERSHAM) verwendet.

SDS-Probenpuffer:	200 mM Tris/HCl pH 6,8
	6 % SDS
	20 % Glycerol
	10 % DTT
	0,1 mg/ml Bromphenolblau
	aliquotiert bei -20°C lagern

### 3.6 Färben von Proteingelen

#### 3.6.1 Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinmengen (>30 ng) werden die Gele für 20 min in 0.1 %iger Coomassie Brilliant Blue R250 Lösung (in 30 % Ethanol, 10 % Eisessig) bei 55°C gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgt in 25 % Ethanol, 10 % Eisessig.

#### 3.6.2 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

Zum Nachweis von kleinen Proteinmengen (bis zu 3 ng) wird die Silberfärbung nach Heukeshoven and Dernick [189] angewendet. Das Prinzip beruht auf der selektiven Reduktion der von Proteinen komplexierten Silberionen durch



### 3.8 Deassemblierung und Reassemblierung von Core-Partikeln

Die *in vitro*- De- und Reassemblierung von Core-Partikeln erfolgt durch Dialyse. Nach der *Strep-tag*-Chromatographie werden die Core-Partikel in einen Dialyseschlauch (MWCO: 3000 kDa, mit 10 %iger BSA-Lösung gesättigt) gefüllt und zur Deassemblierung gegen das 500fache Volumen Deassemblierungspuffer bei 4°C für 16 h unter leichtem Rühren dialysiert. Die Assemblierung erfolgt anschließend in Gegenwart eines 5fachen molaren Überschusses an zu verpackender DNA (pVaxSHBs) gegen ein 500faches Volumen Assemblierungspuffer für mindestens 16 h bei Raumtemperatur. Die DNA wird hierfür zu den denaturierten Proteinen in den Dialyseschlauch gegeben.

Deassemblierungspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 M EDTA
	4 M Harnstoff

Reassemblierungspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 mM MgCl <sub>2</sub>

### 3.9 "Western Blotting", Immunoblot

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wird nach dem diskontinuierlichen "Semi-dry"-Verfahren bei 2-4 mA/cm<sup>2</sup> für 45min durchgeführt.

Nach dem Waschen des Blots für mindestens 30 min in PBS-T beginnt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (in 10 % Milchpulver in PBST) für 2 h bei Raumtemperatur. Nichtgebundener Antikörper wird durch fünfmaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Die nun folgende Inkubation mit dem zweiten peroxidasekonjugierten Antikörper erfolgt ebenfalls in 10 % Milchpulver/PBS-T.

Nach erneutem Waschen wird der Blot entwickelt. Als Substrat dient Luminol (3-Aminophtalhydrazid) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Als Produkte entstehen 3-Aminophtalsäure,

Stickstoff und Lichtquanten bei einer Wellenlänge von 425 nm. Die Detektion der Lichtquanten erfolgt durch Auflegen eines Röntgenfilms.

PBS-T: 0,05 % Tween 20  
in PBS

## 4 Virologische Methoden

### 4.1 ELISA

Zur Quantifizierung der Oberflächenantigene, des HBc-, HBe-Ag sowie des anti-HBc Titers von immunisierten Tieren werden kommerziell erhältliche ELISA (BEHRING, Schwalbach) verwendet. Die Durchführung der Tests erfolgt nach den jeweiligen Protokollen der Herstellerfirma.

### 4.2 Endogene Polymerase Reaktion (EPR)

Mit Hilfe des Endogenen Polymerase Assays ist es möglich die in das Core-Kapsid bzw. das komplette Virion verpackte DNA radioaktiv zu markieren und auf diese Weise reife Viruspartikel nachzuweisen.

#### 4.2.1 Nachweis von Virionen im Zellkulturüberstand

Für den Virusnachweis aus Zellkulturüberstand werden HepG2-Zellen in zwei 10cm-Zellkulturschalen bei 50 %iger Konfluenz transfiziert (Virusgenom bzw. Triple-Transfektion mit Core, Pol und Verpackungskonstrukt) und nach dem Wechsel des Transfektionsmediums fünf Tage bei 37°C inkubiert. Die so erhaltenen 20 ml Zellkulturüberstand werden in Pall-Konzentratoren auf ein Volumen von ca. 600 µl eingeeengt und die darin enthaltenen Viren wie unter 2.6 beschrieben immunpräzipitiert. Das Präzipitat wird nun in 40 µl EPR-Puffer aufgenommen und für 3 h bei 37°C in Gegenwart von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10µCi) inkubiert. Um die virale DNA von den Hüllproteinen zu befreien werden 2 µl

20 %ige wässrige SDS-Lösung und 4 µl Proteinase K (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) zugeben und für weitere 2 Stunden bei 43°C inkubiert. Die nicht eingebauten Nukleotide werden wie unter 1.7 beschrieben über Dye-Ex Spinsäulen entfernt. Nach der Zugabe von 30 µl NH<sub>4</sub>Ac (10 M), sowie 1 µl <sup>3</sup>H-RNA (10 mg/ml) wird die Lösung auf 300 µl mit TNE-Puffer aufgefüllt und die DNA durch Zugabe von 750 µl Ethanol gefällt (siehe 1.8).

Die radioaktiv markierte DNA wird nun abzentrifugiert, getrocknet, in 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen, mit 4 µl DNA Probenpuffer versetzt und über ein 1 %iges Agarosegel elektrophoretisch von noch vorhandenem nicht eingebautem dCTP in einer Höfer-Kammer bei 40 V für 4 Stunden getrennt. Das Gel wird anschließend auf einen Chemilumineszenzfilm transferiert, an der Luft getrocknet und eine Autoradiographie durchgeführt.

EPR-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH7,5
	50 mM NH <sub>4</sub> Cl
	40 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,3 % 2-Mercaptoethanol
	1 % NP-40
	je 3,3 mM dATP, dGTP, dTTP

#### 4.2.2 Nachweis von intrazellulären Virionen

Für den Nachweis von intrazellulär vorhanden Virionen werden HepG2-Zellen wie unter 4.2.1 beschrieben transfiziert. Eine Zellkulturschale wird drei mal mit PBS gewaschen, mit 1 ml Hirt-Lysis-Puffer versetzt und bei 37°C für 10 min inkubiert. Die nun abgelösten Zellen werden zusammen mit dem Lysis-Puffer in Eppendorf-Gefäße überführt und die Zellkerne durch Zentrifugation für 30 min bei 10.000 g und 4°C abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 2 µl Triton X-100 versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert bevor wiederum für 30 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert wird. Das Zelllysate wird nun einer Immunpräzipitation unterzogen (siehe 2.6) und das Präzipitat wie in 4.2.2 beschrieben weiterverarbeitet.

Hirt-Lysis-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH8,0
	1 mM EDTA
	1 % NP-40





## 5 Indirekte Immunfluoreszenz

### 5.1 von eukaryontischen Zellen

Pro Objektträgerfeld werden etwa  $10^6$  Zellen (HepG2) ausgelegt. Die Zellen werden bei einer Konfluenz von ca. 60 % entweder transfiziert (siehe 2.3.2) und einen Tag bei 37°C inkubiert oder mit den Kapsiden für 30 min bis 4 h inkubiert. Dabei werden die in Puffer E vorliegenden Kapside mit dem gleichen Volumen FCS-freiem Medium verdünnt. Nach dem zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS erfolgt die Fixierung durch Inkubation mit 4 %igem Formaldehyd in PBS für 10 min. Durch die Gegenwart von 1 mg/ml DAPI wird hierbei die DNA und somit indirekt der Zellkern gefärbt.

Anschließend werden unspezifische Bindungen durch die Inkubation mit 10 % BSA in PBS-T abgeblockt, bevor der erste Antikörper in einer 10 % BSA/PBS-T Verdünnung für 30 min auf die Zellen gegeben wird. Um das Austrocknen der Präparate zu vermeiden wird die Inkubation in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Objektträger werden anschließend 30 min unter viermaligem Wechseln des Puffers mit PBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper, konjugiert mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy2 oder Cy3, wird ebenfalls in 10 % BSA/PBS-T verdünnt zugesetzt und für 30 min inkubiert. Abschließend werden die Präparate für weitere 30 min unter viermaligem Wechsel des Puffers mit PBST gewaschen. Auf die fixierten Zellen wird dann ein Tropfen 10 %ige Glycerollösung gegeben und mit einem Deckglas blasenfrei abgedeckt. Die Betrachtung der Präparate erfolgt nun im Fluoreszenz- oder im Durchlicht.

PBS-T: 0,05 % Tween 20  
in PBS

### 5.2 von dendritischen Zellen

Die Inkubation der dendritischen Zellen erfolgt in Suspension. Hierfür werden ca.  $10^5$  Zellen aus 10 ml Zellkulturüberstand abzentrifugiert (1000g) in 0,5 ml FCS-freiem Medium aufgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und



mit 500  $\mu\text{l}$  der in Puffer E vorliegenden Kapside für 4 h bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen abzentrifugiert (3000 g, 1 min), 2x mit PBS gewaschen und durch 10 minütige Inkubation mit Fixierlösung fixiert. Durch die Anwesenheit der DNA-färbenden Verbindung DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) kann indirekt eine Kernfärbung vorgenommen werden. Die Zellen werden wiederum 2x mit PBS gewaschen, in 100 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  aufgenommen, auf einen Objektträger gegeben und an der Luft getrocknet. Nun können die immobilisierten Zellen in PBS rehydratisiert und wie unter 5.1 beschrieben der Immunfärbung unterzogen werden.

Fixierlösung: 4 % Paraformaldehyd  
in PBS

## H Literaturverzeichnis

1. Nowoslawski, A., et al., *Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis*. Am J Pathol, 1972. **68**(1): p. 31-56.
2. Johnson, P.J., et al., *Hepatocellular carcinoma in Great Britain: influence of age, sex, HBsAg status, and aetiology of underlying cirrhosis*. Gut, 1978. **19**(11): p. 1022-6.
3. Mason, W.S., G. Seal, and J. Summers, *Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus*. J Virol, 1980. **36**(3): p. 829-36.
4. Ganem, D. and H.E. Varmus, *The molecular biology of the hepatitis B viruses*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 651-93.
5. McLachlan, A., ed. *Molecular Biology Of The Hepatitis B Virus*. ed. A. McLachlan. 1991, CRC Press: Ann Arbor.
6. Pult, I., et al., *Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks*. Virology, 2001. **289**(1): p. 114-28.
7. Miller, R.H. and W.S. Robinson, *Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(8): p. 2531-5.
8. Neurath, A.R., et al., *Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus*. Cell, 1986. **46**(3): p. 429-36.
9. Trujillo, M.A., et al., *Functional analysis of a liver-specific enhancer of the hepatitis B virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3797-801.
10. Dane, D.S., C.H. Cameron, and M. Briggs, *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*. Lancet, 1970. **1**(7649): p. 695-8.
11. Kaplan, P.M., et al., *DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen*. J Virol, 1973. **12**(5): p. 995-1005.
12. Gerlich, W.H. and W.S. Robinson, *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand*. Cell, 1980. **21**(3): p. 801-9.
13. Gerlich, W.H., et al., *Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase*. J Virol, 1982. **42**(3): p. 761-6.
14. Landers, T.A., H.B. Greenberg, and W.S. Robinson, *Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction*. J Virol, 1977. **23**(2): p. 368-76.

15. Galibert, F., et al., *Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli*. Nature, 1979. **281**(5733): p. 646-50.
16. Hruska, J.F., et al., *Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction*. J Virol, 1977. **21**(2): p. 666-72.
17. Charnay, P., et al., *Cloning in Escherichia coli and physical structure of hepatitis B virion DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(5): p. 2222-6.
18. Siddiqui, A., F. Sattler, and W.S. Robinson, *Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4664-8.
19. Will, H., et al., *Replication strategy of human hepatitis B virus*. J Virol, 1987. **61**(3): p. 904-11.
20. Gavilanes, F., J.M. Gonzalez-Ros, and D.L. Peterson, *Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins*. J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7770-7.
21. Meyers, M.L., et al., *Hepatitis B virus polypeptide X: expression in Escherichia coli and identification of specific antibodies in sera from hepatitis B virus-infected humans*. J Virol, 1986. **57**(1): p. 101-9.
22. Ben-Levy, R., et al., *Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(4): p. 1804-9.
23. Wu, X., et al., *Functional organization of enhancer (ENII) of hepatitis B virus*. Virology, 1992. **191**(1): p. 490-4.
24. Tur-Kaspa, R., et al., *Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(6): p. 1627-31.
25. Petit, M.A., et al., *PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes*. Virology, 1992. **187**(1): p. 211-22.
26. Budkowska, A., et al., *Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 840-8.
27. Bruss, V. and D. Ganem, *The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 1059-63.
28. Hertogs, K., et al., *Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein*. Virology, 1993. **197**(2): p. 549-57.
29. Franco, A., et al., *Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes*. J Exp Med, 1992. **175**(5): p. 1195-205.

30. Kuroki, K., et al., *A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles*. J Virol, 1994. **68**(4): p. 2091-6.
31. Ishikawa, T., et al., *Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus*. Virology, 1994. **202**(2): p. 1061-4.
32. Eng, F.J., et al., *gp180, a protein that binds duck hepatitis B virus particles, has metallopeptidase D-like enzymatic activity*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8382-8.
33. Kock, J., E.M. Borst, and H.J. Schlicht, *Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 5827-31.
34. Kock, J. and H.J. Schlicht, *Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4867-74.
35. Bock, C.T., et al., *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell*. Virus Genes, 1994. **8**(3): p. 215-29.
36. Seeger, C., D. Ganem, and H.E. Varmus, *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy*. Science, 1986. **232**(4749): p. 477-84.
37. Radziwill, G., W. Tucker, and H. Schaller, *Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 613-20.
38. Bosch, V., et al., *The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand*. Virology, 1988. **166**(2): p. 475-85.
39. Bartenschlager, R. and H. Schaller, *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription*. Embo J, 1988. **7**(13): p. 4185-92.
40. Blum, H.E., W. Gerok, and G.N. Vyas, *The molecular biology of hepatitis B virus*. Trends Genet, 1989. **5**(5): p. 154-8.
41. Cattaneo, R., H. Will, and H. Schaller, *Hepatitis B virus transcription in the infected liver*. Embo J, 1984. **3**(9): p. 2191-6.
42. Imazeki, F., et al., *RNA transcripts of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 1987. **7**(4): p. 753-7.
43. 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, 1990. **344**(6266): p. 552-5.

44. Bartenschlager, R., M. Junker-Niepmann, and H. Schaller, *The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation*. J Virol, 1990. **64**(11): p. 5324-32.
45. Twu, J.S. and R.H. Schloemer, *Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus*. J Virol, 1987. **61**(11): p. 3448-53.
46. Zahm, P., P.H. Hofschneider, and R. Koshy, *The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis*. Oncogene, 1988. **3**(2): p. 169-77.
47. Colgrove, R., G. Simon, and D. Ganem, *Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 4019-26.
48. Koike, K., et al., *Oncogenic potential of hepatitis B virus*. Mol Biol Med, 1989. **6**(2): p. 151-60.
49. Kekule, A.S., et al., *Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway*. Nature, 1993. **361**(6414): p. 742-5.
50. Wollersheim, M., U. Debelka, and P.H. Hofschneider, *A transactivating function encoded in the hepatitis B virus X gene is conserved in the integrated state*. Oncogene, 1988. **3**(5): p. 545-52.
51. Siddiqui, A., et al., *trans-activation of viral enhancers including long terminal repeat of the human immunodeficiency virus by the hepatitis B virus X protein*. Virology, 1989. **169**(2): p. 479-84.
52. Seto, E., P.J. Mitchell, and T.S. Yen, *Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors*. Nature, 1990. **344**(6261): p. 72-4.
53. Twu, J.S., K. Chu, and W.S. Robinson, *Hepatitis B virus X gene activates kappa B-like enhancer sequences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5168-72.
54. Rossner, M.T., *Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator*. J Med Virol, 1992. **36**(2): p. 101-17.
55. Reifenberg, K., et al., *The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10399-405.
56. Maguire, H.F., J.P. Hoeffler, and A. Siddiqui, *HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions*. Science, 1991. **252**(5007): p. 842-4.
57. Feitelson, M.A., et al., *Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 1993. **8**(5): p. 1109-17.

58. Takada, S. and K. Koike, *Three sites of the hepatitis B virus X protein cooperatively interact with cellular proteins*. *Virology*, 1994. **205**(2): p. 503-10.
59. Fischer, M., L. Runkel, and H. Schaller, *HBx protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit*. *Virus Genes*, 1995. **10**(1): p. 99-102.
60. Lee, T.H., S.J. Elledge, and J.S. Butel, *Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein*. *J Virol*, 1995. **69**(2): p. 1107-14.
61. Haviv, I., D. Vaizel, and Y. Shaul, *pX, the HBV-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a TAF-independent manner*. *Embo J*, 1996. **15**(13): p. 3413-20.
62. Huang, J., et al., *Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein*. *J Virol*, 1996. **70**(8): p. 5582-91.
63. Lin, Y., et al., *Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(11): p. 7132-9.
64. Blum, H.E., et al., *Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro*. *J Virol*, 1992. **66**(2): p. 1223-7.
65. Chen, H.S., et al., *The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks*. *J Virol*, 1993. **67**(3): p. 1218-26.
66. Zoulim, F., et al., *New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection*. *J Clin Microbiol*, 1992. **30**(5): p. 1111-9.
67. Chang, S.F., et al., *Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame*. *J Virol*, 2001. **75**(1): p. 161-70.
68. Magnus, L.O. and H. Norder, *Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene*. *Intervirology*, 1995. **38**(1-2): p. 24-34.
69. Standring, D.N., et al., *Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region*. *J Virol*, 1984. **50**(2): p. 563-71.
70. Eble, B.E., V.R. Lingappa, and D. Ganem, *Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide*. *Mol Cell Biol*, 1986. **6**(5): p. 1454-63.
71. Eble, B.E., V.R. Lingappa, and D. Ganem, *The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across*

- membranes by downstream signal sequences.* J Virol, 1990. **64**(3): p. 1414-9.
72. Eble, B.E., et al., *Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen.* Mol Cell Biol, 1987. **7**(10): p. 3591-601.
73. Guerrero, E., *Model for the protein arrangement in HBsAg particles based on physical and chemical studies,* in *Viral hepatitis and liver disease*, R. Alan, Editor. 1988: New York.
74. Stibbe, W. and W.H. Gerlich, *Characterization of pre-s gene products in hepatitis B surface antigen.* Dev Biol Stand, 1983. **54**: p. 33-43.
75. Heermann, K.-H. and W.H. Gerlich, *Surface proteins of hepatitis B virus,* in *Molecular biology of the Hepatitis B Virus*, A. McLachlan, Editor. 1989, crc press. p. 109-143.
76. Pontisso, P., et al., *Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles.* Virology, 1989. **173**(2): p. 522-30.
77. Kekule, A.S., et al., *The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator.* Nature, 1990. **343**(6257): p. 457-61.
78. Lauer, U., et al., *The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene.* J Virol, 1992. **66**(9): p. 5284-9.
79. Hildt, E., *Untersuchung der Struktur und Funktion des Hepatitis B-Virus Transaktivators MHBst,* in *Fakultät für Chemie und Pharmazie.* 1995, Eberhard-Karls-Universität: Tübingen.
80. Courtois, G., S. Baumhueter, and G.R. Crabtree, *Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 7937-41.
81. Persing, D.H., H.E. Varmus, and D. Ganem, *The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid.* J Virol, 1987. **61**(5): p. 1672-7.
82. Bruss, V., et al., *Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein.* Embo J, 1994. **13**(10): p. 2273-9.
83. Ostapchuk, P., P. Hearing, and D. Ganem, *A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis.* Embo J, 1994. **13**(5): p. 1048-57.
84. Prange, R. and R.E. Streeck, *Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins.* Embo J, 1995. **14**(2): p. 247-56.

85. Cheng, K.C., G.L. Smith, and B. Moss, *Hepatitis B virus large surface protein is not secreted but is immunogenic when selectively expressed by recombinant vaccinia virus*. J Virol, 1986. **60**(2): p. 337-44.
86. Chisari, F.V., et al., *Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(19): p. 6909-13.
87. Dyson, M.R. and K. Murray, *Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: association of the core and surface antigens of hepatitis B virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 2194-8.
88. Poisson, F., et al., *Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle*. Virology, 1997. **228**(1): p. 115-20.
89. Koschel, M., et al., *Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 1-7.
90. 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, 1997. **71**(12): p. 9350-7.
91. Ueda, K., T. Tsurimoto, and K. Matsubara, *Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles*. J Virol, 1991. **65**(7): p. 3521-9.
92. Prange, R., R. Nagel, and R.E. Streeck, *Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles*. J Virol, 1992. **66**(10): p. 5832-41.
93. Loffler-Mary, H., M. Werr, and R. Prange, *Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70*. Virology, 1997. **235**(1): p. 144-52.
94. Stöckl, L., *Untersuchung der Topologie des großen Oberflächenproteins LHBs aus Hepatitis B Virus*, in Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften. 1998, Technischen Universität München: München.
95. Guo, J.T. and J.C. Pugh, *Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis*. J Virol, 1997. **71**(2): p. 1107-14.
96. Berting, A., et al., *Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein*. Intervirology, 1995. **38**(1-2): p. 8-15.
97. Stirk, H.J., J.M. Thornton, and C.R. Howard, *A topological model for hepatitis B surface antigen*. Intervirology, 1992. **33**(3): p. 148-58.



98. Grgacic, E.V., C. Kuhn, and H. Schaller, *Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation*. J Virol, 2000. **74**(5): p. 2455-8.
99. Lambert, C. and R. Prange, *Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22265-72.
100. Scaglioni, P.P., M. Melegari, and J.R. Wands, *Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 345-53.
101. Nassal, M. and A. Rieger, *An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus*. J Virol, 1993. **67**(7): p. 4307-15.
102. Pumpens, P. and E. Grens, *HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes*. Intervirology, 2001. **44**(2-3): p. 98-114.
103. Gerelsaikhan, T., J.E. Tavis, and V. Bruss, *Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4269-74.
104. Crowther, R.A., et al., *Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy*. Cell, 1994. **77**(6): p. 943-50.
105. Zlotnick, A., et al., *Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein*. Biochemistry, 1996. **35**(23): p. 7412-21.
106. Conway, J.F., et al., *Localization of the N terminus of hepatitis B virus capsid protein by peptide-based difference mapping from cryoelectron microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14622-7.
107. Zlotnick, A., et al., *Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9556-61.
108. Seifer, M. and D.N. Stranding, *Assembly and antigenicity of hepatitis B virus core particles*. Intervirology, 1995. **38**(1-2): p. 47-62.
109. Bottcher, B., et al., *Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection*. Embo J, 1998. **17**(23): p. 6839-45.
110. Ponsel, D. and V. Bruss. *Genetic mapping of hepatitis B virus core protein domain involved in nucleocapsid envelopment*. in *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie*. 2002. Erlangen.

111. Kann, M. and W.H. Gerlich, *Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 7993-8000.
112. Gazina, E.V., et al., *Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4721-8.
113. Kann, M., et al., *Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 45-55.
114. Derossi, D., et al., *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10444-50.
115. Derossi, D., G. Chassaing, and A. Prochiantz, *Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(2): p. 84-7.
116. Kilk, K., et al., *Cellular internalization of a cargo complex with a novel peptide derived from the third helix of the islet-1 homeodomain. Comparison with the penetratin peptide*. Bioconjug Chem, 2001. **12**(6): p. 911-6.
117. Vives, E., P. Brodin, and B. Lebleu, *A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 16010-7.
118. Elliott, G. and P. O'Hare, *Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein*. Cell, 1997. **88**(2): p. 223-33.
119. Dorange, F., et al., *Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 9): p. 2219-30.
120. Rojas, M., et al., *Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(4): p. 370-5.
121. Oess, S. and E. Hildt, *Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens*. Gene Ther, 2000. **7**(9): p. 750-8.
122. Pooga, M., et al., *Cell penetration by transportan*. Faseb J, 1998. **12**(1): p. 67-77.
123. Vidal, P., et al., *[New strategy for RNA vectorization in mammalian cells. Use of a peptide vector]*. C R Acad Sci III, 1997. **320**(4): p. 279-87.
124. Morris, M.C., et al., *A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(14): p. 2730-6.

125. Morris, M.C., et al., *A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(12): p. 1173-6.
126. Oehlke, J., et al., *Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1414**(1-2): p. 127-39.
127. Morris, M.C., et al., *Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(5): p. 461-6.
128. Brandenburg, B., *Genstransfer unter Verwendung zellpermeabler, DNA bindender Fusionsproteine und zellpermeabler Nukleokapside*, in Fakultät für Biologie, Chemie und Pharmazie. 2001, Freie Universität: Berlin.
129. Oess, S., *Entdeckung und Charakterisierung eines neuen Zellpermeabilität vermittelnden Peptidmotives aus den Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus*, in Fakultät für Chemie und Pharmazie. 2000, Ludwigs-Maximilians-Universität: München.
130. <http://www.wiley.com/genetherapy/clinical/vectors.html>.
131. Anderson, W.F., *Prospects for human gene therapy*. Science, 1984. **226**(4673): p. 401-9.
132. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
133. Tsai, S.Y., K. Schillinger, and X. Ye, *Adenovirus-mediated transfer of regulable gene expression*. Curr Opin Mol Ther, 2000. **2**(5): p. 515-23.
134. Kotin, R.M., et al., *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(6): p. 2211-5.
135. Pagano, J.S. and A. Vaheri, *Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D)*. Arch Gesamte Virusforsch, 1965. **17**(3): p. 456-64.
136. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5*. Virology, 1973. **54**(2): p. 536-9.
137. Wu, C.H., J.M. Wilson, and G.Y. Wu, *Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by mammalian regulatory elements in vivo*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 16985-7.
138. Wagner, E., M. Ogris, and W. Zauner, *Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **30**(1-3): p. 97-113.
139. Sato, N., et al., *Tumor targeting and imaging of intraperitoneal tumors by use of antisense oligo-DNA complexed with dendrimers and/or avidin in mice*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(11): p. 3606-12.

140. Tan, P.H., et al., *Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium*. Transplantation, 2001. **71**(4): p. 552-60.
141. Luo, D. and W.M. Saltzman, *Synthetic DNA delivery systems*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(1): p. 33-7.
142. Fasbender, A., et al., *A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia*. Gene Ther, 1997. **4**(11): p. 1173-80.
143. Matsui, H., et al., *Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1117-26.
144. Salunke, D.M., D.L. Caspar, and R.L. Garcea, *Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1*. Cell, 1986. **46**(6): p. 895-904.
145. Zhou, J., et al., *Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro*. J Gen Virol, 1993. **74 ( Pt 4)**: p. 763-8.
146. Zhou, X. and N. Muzyczka, *In vitro packaging of adeno-associated virus DNA*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3241-7.
147. Campbell, S. and V.M. Vogt, *Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6487-97.
148. Zhang, W., et al., *Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in Escherichia coli: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro*. Virology, 1998. **243**(2): p. 423-31.
149. Morikawa, Y., T. Goto, and K. Sano, *In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27997-8002.
150. Speir, J.A., et al., *Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy*. Structure, 1995. **3**(1): p. 63-78.
151. Zlotnick, A., et al., *Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus*. Virology, 2000. **277**(2): p. 450-6.
152. Wan, Y., et al., *Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(11): p. 1355-63.
153. Weiss, L., *Etablierung eines in vitro Modellsystems zur Untersuchung der HBV-Replikation und Entwicklung neuer Strategien zur HBV Therapie*. 1995, Ludwigs-Maximilians-Universität: München.
154. Conway, J.F., et al., *Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy*. Nature, 1997. **386**(6620): p. 91-4.

155. Schmidt, T.G., et al., *Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin*. J Mol Biol, 1996. **255**(5): p. 753-66.
156. Skerra, A., *Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli*. Gene, 1994. **151**(1-2): p. 131-5.
157. 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, 1989. **63**(11): p. 4645-52.
158. Habenberger, P., *Etablierung eines Gentransferensystems auf der Basis des Hepatitis B Virus*, in Fakultät für Biologie. 1999, Eberhard Karls Universität: Tübingen.
159. Kramvis, A. and M.C. Kew, *The core promoter of hepatitis B virus*. J Viral Hepat, 1999. **6**(6): p. 415-27.
160. Kyte, J. and R.F. Doolittle, *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 1982. **157**(1): p. 105-32.
161. El Ouahabi, A., et al., *The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids*. FEBS Lett, 1997. **414**(2): p. 187-92.
162. Wizemann, H. and A. von Brunn, *Purification of E. coli-expressed HIS-tagged hepatitis B core antigen by Ni<sup>2+</sup>-chelate affinity chromatography*. J Virol Methods, 1999. **77**(2): p. 189-97.
163. Skerra, A. and T.G. Schmidt, *Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins*. Methods Enzymol, 2000. **326**: p. 271-304.
164. Koschel, M., R. Thomssen, and V. Bruss, *Extensive mutagenesis of the hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2153-60.
165. Kratz, P.A., B. Bottcher, and M. Nassal, *Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1915-20.
166. Koletzki, D., et al., *HBV core particles allow the insertion and surface exposure of the entire potentially protective region of Puumala hantavirus nucleocapsid protein*. Biol Chem, 1999. **380**(3): p. 325-33.
167. Lingappa, J.R., et al., *A eukaryotic cytosolic chaperonin is associated with a high molecular weight intermediate in the assembly of hepatitis B virus capsid, a multimeric particle*. J Cell Biol, 1994. **125**(1): p. 99-111.
168. Schlicht, H.J., R. Bartenschlager, and H. Schaller, *The duck hepatitis B virus core protein contains a highly phosphorylated C terminus that is*

- essential for replication but not for RNA packaging.* J Virol, 1989. **63**(7): p. 2995-3000.
169. Shibagaki, N. and M.C. Udey, *Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity.* J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2393-401.
170. Janeway, C.A. and P. Travers, *Immunologie.* Vol. 2. Auflage. 1997, Heidelberg: Spektrum Akad. Vlg.
171. Habenberger, P., *Etablierung eines Gentransfersystems auf der Basis des Hepatitis B Virus,* in *Fakultät für Biologie.* 1995, Eberhard Karls Universität: Tübingen.
172. Mabit, H. and H. Schaller, *Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding.* J Virol, 2000. **74**(24): p. 11472-8.
173. Jeong, J.K., G.S. Yoon, and W.S. Ryu, *Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA.* J Virol, 2000. **74**(12): p. 5502-8.
174. Foley, R., R. Tozer, and Y. Wan, *Genetically modified dendritic cells in cancer therapy: implications for transfusion medicine.* Transfus Med Rev, 2001. **15**(4): p. 292-304.
175. Liu, C.S., et al., *VP22 enhanced intercellular trafficking of HSV thymidine kinase reduced the level of ganciclovir needed to cause suicide cell death.* J Gene Med, 2001. **3**(2): p. 145-52.
176. Gleiter, S. and H. Lilie, *Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles.* Protein Sci, 2001. **10**(2): p. 434-44.
177. Stubenrauch, K., et al., *Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles.* Biochem J, 2001. **356**(Pt 3): p. 867-73.
178. Le Seyec, J., et al., *Role of the PreS2-Domain of the Large Envelope Protein in Hepatitis B Virus Assembly and Infectivity.* Journal of Virology, 1998. **72**(7): p. 5573-5578.
179. Gerlich, W.H., X. Lu, and K.H. Heermann, *Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus.* J Hepatol, 1993. **17 Suppl 3**: p. S10-4.
180. Lu, X., T.M. Block, and W.H. Gerlich, *Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line.* J Virol, 1996. **70**(4): p. 2277-85.
181. Breiner, K.M. and H. Schaller, *Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection.* J Virol, 2000. **74**(5): p. 2203-9.

182. Dandri, M., et al., *Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus*. *Hepatology*, 2001. **33**(4): p. 981-8.
183. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
184. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
185. Stoscheck, C.M., *Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein assay to different proteins*. *Anal Biochem*, 1990. **184**(1): p. 111-6.
186. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. *J Mol Biol*, 1975. **98**(3): p. 503-17.
187. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(259): p. 680-5.
188. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. *Anal Biochem*, 1987. **166**(2): p. 368-79.
189. Heukeshoven, J. and R. Dernick, *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. *Electrophoresis*, 1988. **9**(1): p. 28-32.

# I Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption	DTT	Dithiothreitol
Ag	Antigen	dTTP	Deoxythymidin- triphosphat
Ak, Ab	Antikörper, Antibody	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
AHT	Anhydroteracyclin	ECL	Enhanced Chemoluminescence
AS	Aminosäure	EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay
Bisacrylamid	N,N'-Methylen- bisacrylamid	ER	Endoplasmatisches Retikulum
Bp	Basenpaare	FCS, FKS	Fötales Kälberserum
BSA	Bovines Serum-Albumin	FPLC	Fluid Protein Liquid Chromatographie
ccc	<i>covalently closed circular</i>	g	Gravitation, Erdbeschleunigung
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
CMV	Cytomegalovirus	GM-CSF	<i>granulocyte/ macrophage colony- stimulating factor</i>
C-Terminus	Carboxyterminus	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat	HBc	Hepatitis B Core Protein
DC	dendritische Zelle	HBs	Hepatitis B Surface Protein
Da	Dalton	HBV	Hepatitis B Virus
DAPI	4',6'-diamidino-2- phenylindole hydrochloride	HEPES	N'-2-Hydroxyethyl- piperazin- 2-ethansulfonsäure
dATP	Deoxyadenosin- triphosphat	IL-4	Interleukin-4
dCTP	Deoxycytidintriphosphat	IgG	Immunglobulin-G
ddNTP	Didesoxybukleotid- triphosphat	IPTG	Isopropyl-beta- Dthiogalactopyranosid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
dGTP	Deoxyguanosin- triphosphat		
DMEM	DULBECCOs Modified EAGLE Medium		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonucleic Acid		
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'- triphosphat		



LHBs	Large Hepatitis B Surface Protein	SHBs	Small Hepatitis B Surface Protein
MCS	Multiple Cloning Side	TEM	Transferelektronenmikroskop
MHBs	Middle Hepatitis B Surface Protein	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
M	molarität	TLM	Translokationsmotiv
min	Minuten	Tris	Tris(hydroxymethyl)amino-Methan
MOPS	3-N-(Morpholino)-propansulfon säure	TBS	Tris gepufferte Saline
mAB	monoklonaler Antikörper	tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
mRNA	Boten (massanger) Ribonukleinsäure	TLM-Core	TLM in den <i>spike tip</i> des Core-Proteins integriert
nm	Nanometer	TW-Core	TLM N-terminal an das Core-Protein fusioniert
NP-40	Nonidet P-40	U	Unit, Einheit enzymatischer Aktivität
N-Terminus	Aminotermius	UV	Ultraviolett
nt <sub>HBV</sub>	Nukleotidposition nach HBV Nomenklatur	V	Volt
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat	v/v	volume per volume, Volumenprozent
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	w/v	weight per volume, Gewichtsprozent
PBMC	periphere Blut Monozyten	WT	Wildtyp
PBS	Phosphat gepufferte Saline		
PCR	Polymerase Kettenreaktion		
PEG	Polyethylenglycol		
Pi	anorganisches Phosphat		
PKC	Proteinkinase C		
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid		
Pol	Polymerase		
PVDF	Polyvinylendifluorid		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	rotations per minute		
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		

## J Danksagung

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Dezember 1998 bis November 1999 in der Experimentellen Onkologie und Therapieforschung am Klinikum München Rechts der Isar und von Dezember 1999 bis Januar 2002 in der Nachwuchsgruppe I am Robert Koch-Institut durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eberhard Hildt für die sehr interessante Aufgabenstellung, sowie für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen zur Anfertigung dieser Arbeit. Für seine Unterstützung und Förderung, für anregende Diskussionen und vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Kessler möchte ich für die freundliche Bereitschaft, die vorliegende Dissertation an der Technischen Universität München zu vertreten, danken.

Ganz herzlich möchte ich meinem Laborkollegen Börries Brandenburg danken. Durch seine herzliche und freundliche Art wurde so manches Tief leicht durchschritten.

Meinen Münchener Laborkollegen Anne Frye, Daniela Katapodis, Ulla Mattke, Stefanie Oess, Anja Schweier, sowie meinen Berliner Laborkollegen Hans Huser, Beate Malkowski, Efterpi Kardalidou, Ariane Kopitzki, Tilmann Bürckstümmer, Beate Friedrich, Annett Hillemann, Florian Löffelbein, Melanie Rieger und Michael Schneider möchte ich für die große Hilfsbereitschaft und für das ausgezeichnete Arbeitsklima danken. Herrn Dr. Gelderblom möchte ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Analysen und Elke Bleifuss für die Präparation der dendritischen Zellen sowie für ihr beispielhaft gewissenhaftes Korrekturlesen danken.

Ich danke Sabine Neidhold und Dietrich Simon für fachliche als auch die ein oder andere materielle Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern, meinem Bruder, sowie meinen Freunden und Bekannten, die nicht zuletzt durch ihre moralische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Ramona Förste für ihre immerwährende Unterstützung und Hilfe beim Anfertigen dieser Arbeit. Vielen Dank für alles!