

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Charakterisierung der Rolle der Transmembrandomänen des kleinen Hepatitis B Virus Hüllproteins für die Bildung von subviralen Partikeln

Vera D. Siegler

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Langosch

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl**
- 2. apl. Prof. Dr. V. Bruß
(Georg-August-Universität Göttingen)**

**Die Dissertation wurde am 06.10.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt
am 20.12.2011 angenommen.**

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis B Virus	1
1.1.1	Krankheitsbild, Therapie und Impfung	1
1.1.2	Die Virusfamilie Hepadnaviridae	1
1.2	Aufbau des Hepatitis B Virions	2
1.3	Genomstruktur	3
1.4	Transkripte und Replikationszyklus	5
1.5	Die viralen Proteine	6
1.5.1	Die viralen Oberflächenproteine	7
1.5.2	Membrantopologie der drei Hüllproteine	9
1.5.3	Die Hüllproteine von DHBV	11
1.6	Infektionszyklus	12
1.7	Subvirale Partikel	14
1.7.1	Morphologie der subviralen Partikel	15
1.7.2	Sekretionsweg	16
1.8	Ziel der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	20
2.1.3	Puffer und Lösungen	22
2.1.4	Nährmedien	24
2.1.4.1	Nährmedien und Zusätze zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	24
2.1.4.2	Nährmedien und Zusätze zur Kultivierung von humanen Hepatomazellen Huh7	24
2.1.5	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	25
2.1.6	Längen- und Größenstandards für Gele	25
2.1.6.1	DNA-Längenstandards	25
2.1.6.2	Protein-Größenstandards	26
2.1.7	Oligonukleotide	27
2.1.8	Plasmide	29
2.1.8.1	Punktmutanten der TM1	31
2.1.8.2	Punktmutanten der TM2	31
2.1.8.3	Insertionsmutanten der TM1	32
2.1.8.4	Insertionsmutanten der TM2	33
2.1.8.5	Insertionsmutanten der TM3	33
2.1.8.6	Chimären der TM1	34
2.1.8.7	Chimären der TM2	34
2.1.8.8	Chimäre des C-Terminus	35
2.1.8.9	Konstrukte mit dem Plasmid pSV33H	36
2.1.8.10	Konstrukte mit mehreren ausgetauschten Domänen	37
2.1.8.11	mCherry-S-Fusion mit dem Typ I Signal der β -Lactamase	38
2.1.9	Enzyme	39
2.1.9.1	Restriktionsendonukleasen	39
2.1.9.2	Sonstige Enzyme	40
2.1.10	Antikörper und Konjugate	40
2.1.11	Kommerzielle Kits	40

2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	41
2.2.1.1	Sterilisation.....	41
2.2.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien	41
2.2.1.3	Messung der Zelldichte	41
2.2.1.4	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> DH10B	41
2.2.1.5	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> BMH 71-18 <i>mutS</i>	42
2.2.2	Techniken zur Kultivierung der humanen Hepatomazelllinie Huh7	42
2.2.2.1	Kultivierung von Huh7-Zellen	43
2.2.2.2	Kryokonservierung und Lagerung von Huh7-Zellen	43
2.2.2.3	Rekultivierung von kryokonservierten Huh7-Zellen	43
2.2.2.4	Transiente Transfektion von Huh7-Zellen mit Fugene	44
2.2.2.5	Ernte von Zellkulturüberständen und Herstellung von Zelllysaten	44
2.2.2.5.1	Zellyse mittels Detergenz.....	44
2.2.2.5.2	Zellyse mittels wiederholtem Einfrieren und Auftauen („freeze and thaw“)	45
2.2.3	Klonierungstechniken	45
2.2.3.1	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	45
2.2.3.1.1	Herstellung überlappender DNA-Fragmente mit Hilfe von PCR (PCR1 und 2).....	46
2.2.3.1.2	Fusion überlappender DNA-Fragmente mit Hilfe von PCR 3	47
2.2.3.1.3	Megaprimer-PCR	48
2.2.3.1.4	Herstellung des Plasmids pSVBX24H-DC-Terminus mit der Megaprimer-PCR	49
2.2.3.2	Agarosegelelektrophorese für DNA.....	49
2.2.3.3	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ von Qiagen	50
2.2.3.4	Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR-Produkten.....	51
2.2.3.5	Dephosphorylierung	51
2.2.3.6	Ligation	51
2.2.3.7	Ethanol-fällung von DNA	52
2.2.3.8	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> DH10B durch Elektroporation.....	52
2.2.3.9	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen analytischen Maßstab („Minipräparation“).....	53
2.2.3.10	Isolierung von Plasmid-DNA im großen analytischen Maßstab („Maxipräparation“)	53
2.2.3.11	Phenol-Chloroform Extraktion von DNA	54
2.2.3.12	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	54
2.2.3.13	Sequenzierung	55
2.2.3.14	Herstellung der mutierten S-Konstrukte mit Hilfe überlappender PCR-Fragmente	55
2.2.3.14.1	Einführung des HA-Epitops in den Vektor pSVBX24H	56
2.2.3.14.2	Herstellung der chimären Konstrukte der TM1 und TM2	56
2.2.3.14.3	Herstellung des mCherry-S-Fusionsproteins mit dem Typ I Signal der β -Lactamase	58
2.2.4	Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe des „Transformer TM Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Clontech)	59
2.2.4.1	5'-Phosphorylierung der Mutations- und Selektionsprimer.....	60
2.2.4.2	Denaturierungsschritt und Anlagern der Oligonukleotide	60
2.2.4.3	Synthese des Hybridplasmids.....	60

2.2.4.4	Ethanol-fällung und erster selektiver Restriktionsverdau	61
2.2.4.5	Transformation in den <i>mutS</i> -defizienten <i>E. coli</i> Stamm BMH 71-18 <i>mutS</i>	61
2.2.4.6	DNA-Isolierung des gemischten Plasmid-Pools	61
2.2.4.7	Zweiter selektiver Restriktionsverdau und Transformation in <i>E. coli</i> DH10B	62
2.2.4.8	Isolierung der Plasmid-DNA aus einzelnen Klonen	62
2.2.4.9	Selektion der Klone	62
2.2.4.10	Herstellung der Punkt- und Insertionsmutanten und der verkürzten Transferrin-Konstrukte mittels zielgerichteter Mutagenese	63
2.2.4.10.1	Punktmutationen TM1	63
2.2.4.10.2	Punktmutationen TM2	64
2.2.4.10.3	Insertionsmutanten TM1	65
2.2.4.10.4	Insertionsmutanten TM2	66
2.2.4.10.5	Insertionsmutanten TM3	66
2.2.4.10.6	Verkürzte Transferrin-Konstrukte	67
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	67
2.2.5.1	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	67
2.2.5.2	Aufbereitung der Proben für die reduzierende und nicht reduzierende SDS-PAGE	68
2.2.5.3	Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Elektroblot	69
2.2.5.4	Native Agarosegele zum Nachweis von HBs-positiven Partikeln	69
2.2.5.5	Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Kapillarblot	70
2.2.5.6	Nachweis von HBsAg auf der Membran mittels Western Blot	70
2.2.5.7	Intrazellulärer Nachweis von HBsAg mittels Immunfluoreszenz	71
2.2.5.8	Messung von HBsAg mit Hilfe von ELISA	73
3	Ergebnisse	74
3.1	Mutationsanalyse zur Charakterisierung der Rolle der vier HBV S Transmembrandomänen für die Bildung von subviralen Partikeln	74
3.2	Strategie zur Charakterisierung der unterschiedlichen Mutanten	74
3.2.1	Analyse der Mutanten auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA	76
3.2.2	Intrazelluläre Lokalisation der Mutanten mittels Immunfluoreszenz	77
3.2.3	Fusion des Hämagglutinin-Epitops an den C-Terminus von S zur Unterscheidung von Mutante und Wildtyp in Koexpressionsexperimenten	78
3.3	Generierung von Mutanten der ersten Transmembrandomäne (TM1)	79
3.3.1	Substitution der Phenylalanine in TM1 durch Leucine	80
3.3.2	Analyse der F à L Punktmutanten der TM1 auf ihre Stabilität, N-Glyko- sylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA	80
3.3.3	Einführung von Alanin-Insertionen in den N-terminalen, zentralen und C- terminalen Abschnitt der TM1	82
3.3.4	Untersuchung der TM1-Insertionsmutanten auf ihre Stabilität, N-Glyko- sylierung und Sekretionsfähigkeit mittels ELISA und Western Blot	83
3.3.5	Überprüfung der Membrantopologie der zentralen Insertionsmutante von TM1 mit Hilfe des mittleren Hüllproteins M	84
3.3.6	Intrazelluläre Lokalisation der TM1-Insertionsmutanten durch Immun- fluoreszenzfärbung	86

3.3.7	Untersuchung der Koexpression und -sekretion der TM1-Insertionsmutanten mit dem WT-S	88
3.3.8	Austausch der TM1 durch das Typ I Signal der β -Lactamase	89
3.3.9	Untersuchung der β -Lactamase-Chimäre auf ihre Stabilität, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels ELISA und Western Blot.....	90
3.3.10	Überprüfung der Membrantopologie der β -Lactamase-Chimäre mit Hilfe des mittleren Hüllproteins M.....	91
3.3.11	Analyse der Koexpression und -sekretion der β -Lactamase-Chimäre mit WT-S	93
3.3.12	Intrazelluläre Lokalisation der β -Lactamase-Chimäre mit Hilfe von Immunfluoreszenz	94
3.3.13	Nachweis des mCherry-S-beta-Konstrukts mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie	94
3.3.14	Intra- und extrazellulärer Nachweis des mCherry-S-beta-Konstrukts mittels Western Blot und ELISA.....	96
3.3.15	Austausch der TM1 durch die homologe Sequenz des DHBV (DTM1).....	97
3.3.16	Untersuchung der DTM1-Chimäre auf ihre Stabilität, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels ELISA und Western Blot.....	98
3.3.17	Intrazelluläre Lokalisation der DTM1-Chimäre mittels Immunfluoreszenz	99
3.4	Generierung von Mutanten der zweiten Transmembrandomäne (TM2)	100
3.4.1	Einführung von F à L Punktmutationen in die TM2	100
3.4.2	Analyse der TM2-Punktmutanten auf ihre Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA.....	101
3.4.3	Einführung von Alanin-Insertionen in den N-terminalen, zentralen und C-terminalen Abschnitt der TM2	103
3.4.4	Analyse der TM2-Insertionsmutanten auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA.....	103
3.4.5	Intrazelluläre Lokalisation der TM2-Insertionsmutanten mittels Immunfluoreszenz.....	104
3.4.6	Untersuchung der Koexpression und -sekretion der TM2-Insertionsmutanten mit WT-S mittels Western Blot	105
3.4.7	Austausch der TM2 durch das Typ II Signal des humanen Transferrin-Rezeptors	106
3.4.8	Analyse der Transferrin-Chimären auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA.....	107
3.4.9	Intrazelluläre Lokalisation des Transdel8aa-Konstrukts mittels Immunfluoreszenz.....	109
3.4.10	Untersuchung der Koexpression und -sekretion des Transdel8aa-Konstrukts mit WT-S	109
3.4.11	Austausch der TM2 durch die homologe Sequenz des DHBV (DTM2).....	110
3.4.12	Analyse der DTM2-Chimäre auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA.....	111
3.4.13	Intrazelluläre Lokalisation der DTM2-Chimäre mit Hilfe der Immunfluoreszenz.....	112
3.4.14	Untersuchung der Koexpression und -sekretion der DTM2-Chimäre mit WT-S mittels Western Blot	113
3.5	Generierung von Mutanten der dritten Transmembrandomäne (TM3) und des hydrophoben C-Terminus	114
3.5.1	Einführung von Alanin-Insertionen in die amphipathische Helix und den N-terminalen und zentralen Abschnitt der TM3.....	114

3.5.2	Analyse des Einflusses von Alanin-Insertionen in der TM3 und der amphipathischen Helix auf Stabilität und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA.....	115
3.5.3	Untersuchung der Koexpression und -sekretion der Insertionsmutanten der TM3 und der amphipathischen Helix mit WT-S-Protein mittels Western Blot.....	116
3.5.4	Austausch des C-Terminus (TM3/4) durch die homologe Sequenz des DHBV (DC-Terminus).....	117
3.5.5	Analyse der DC-Terminus-Chimäre auf ihre Stabilität und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA.....	118
3.5.6	Intrazelluläre Lokalisation der DC-Terminus-Chimäre mittels Immunfluoreszenz.....	118
3.5.7	Überprüfung der Koexpression und -sekretion der DC-Terminus-Chimäre mit dem WT-S-Protein mittels Western Blot.....	120
3.6	Herstellung von Mutanten mit mehreren ausgetauschten Transmembrandomänen.....	120
3.6.1	Analyse der Kombinations-Mutanten auf Stabilität, Topologie und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA.....	121
3.7	Nachweis der Dimerbildung von sekretionsdefizienten Mutanten mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE.....	122
3.8	Intra- und extrazellulärer Nachweis von HBs-positiven Partikeln mittels nativer Agarosegele.....	124
4	Diskussion.....	126
4.1	Frühere Deletionsstudien.....	126
4.2	Veränderung der Primärsequenz durch Punktmutationen.....	127
4.3	Veränderung der Helixdrehung durch Insertionen.....	127
4.3.1	Veränderung der Helixorientierung der TM1 durch Insertionen.....	128
4.3.2	Veränderung der Helixdrehung der TM2 durch Insertionen.....	130
4.3.3	Veränderung der Helixorientierung der potentiellen amphipathischen Helix..	131
4.3.4	Veränderung der Helixdrehung der TM3 durch Insertionen.....	132
4.4	Analyse von chimären S-Proteinen.....	132
4.4.1	Konserviertheit der Transmembrandomänen zwischen Avihepadnaviren und Orthohepadnaviren.....	133
4.4.1.1	TM1.....	133
4.4.1.2	TM2.....	134
4.4.1.3	C-Terminus.....	134
4.4.2	Komplementationsversuche mit funktionell ähnlichen Domänen.....	136
4.4.2.1	Austausch der TM1 durch das Typ I Signal der β -Lactamase.....	136
4.4.2.2	Austausch der TM2 durch das Typ II Signal des humanen Transferrin-Rezeptors.....	137
4.5	Teilweise Komplementation der Sekretionsdefizienz durch die präS2.....	138
4.6	Modell für den Sekretionsweg.....	139
4.7	Ausblick.....	140
5	Zusammenfassung.....	142
6	Summary.....	143
7	Literatur.....	144

Danksagung

ABKÜRZUNGEN

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
anti-	Antikörper gegen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A. dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare (engl.: base pairs)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
C	Cytosin
ca.	circa
ccc	ringförmig, doppelsträngig geschlossen (engl.: covalently closed circular)
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DR	Wiederholungssequenz (engl.: direct repeat)
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTM1/2	Transmembrandomäne 1/2 des DHBV
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
G	Guanin
g	Gramm
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HBc	Hepatitis B Core
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen
HBs	Hepatitis B Surface
HBsAg	Hepatitis B s-Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
M	Molarität
m	milli
mA	Milliampere
MAb	monoklonaler Antikörper

min	Minute
mol	$6,3 \times 10^{23}$ Teilchen
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
n	nano
nt	Nukleotid
oc	offen zirkulär (engl.: open circular)
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: open reading frame)
ori	Replikationsursprung (engl.: origin of replication)
p	Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pol	Polymerase
PO	Meerrettich Peroxidase
rc	entspannt zirkulär (engl.: relaxed circular)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: rotation per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodiumdodecylsulfat)
s	Sekunden
SSC (buffer)	Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer (engl.: sodium chloride-sodium citrate (buffer))
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: single stranded DNA)
SV40	Affenvirus 40 (engl.: simian virus 40)
SVP	subvirale Partikel
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Terrific Broth Medium
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TP	Terminales Protein
Tris	Trishydromethylaminomethan
U	Einheit (engl.: unit)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht (engl.: weight) pro Volumen
μ	micro

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis B Virus

1.1.1 Krankheitsbild, Therapie und Impfung

In den 70er Jahren fand Baruch Samuel Blumberg als Auslöser von Leberentzündungen (Hepatitis) das „Australia-Antigen“, welches später mikroskopisch durch D.S. Dane als Hepatitis B Virus (HBV) identifiziert wurde (Blumberg *et al.*, 1967; Dane *et al.*, 1970). Obwohl seitdem fast 45 Jahren vergangen sind, stellt das Virus noch immer ein ernstes, globales Gesundheitsproblem dar. Jeder zweite Infizierte entwickelt eine akute Hepatitis, die sich in ca. 1 % der Fälle auch zu einer fulminanten, häufig tödlichen Form ausweiten kann. Etwa bei der Hälfte der Infizierten bleibt die Erkrankung ohne klinische Symptome, in knapp 90 % aller Patienten heilt die Infektion aus und in 5-10 % der infizierten Erwachsenen persistiert das Virus. Hierbei unterscheidet man zwischen „gesunden Trägern“ und Patienten, die eine apparente Erkrankung haben. Weltweit sind 350 Millionen Menschen mit dem Virus chronisch infiziert und haben dadurch ein erhöhtes Risiko, eine Leberzirrhose oder einen Leberkrebs zu entwickeln (WHO, 2002). Da das Hepatitis B Virus kein zytopathisches Virus ist, werden die Schäden in der Leber durch die Immunantwort des Wirtes hervorgerufen.

Therapeutische Maßnahmen wie der Einsatz von Inhibitoren der viralen Polymerase (z.B. Adefovir, Lamivudin) und die Gabe von Interferon α erreichen zwar eine Verminderung der Viruslast, aber in der Regel keine Ausheilung der chronischen Infektion.

Der beste Schutz gegen HBV ist die aktive Impfung mit dem Impfstoff, der 1984 erstmals in Hefe produziert wurde (McAleer *et al.*, 1984). Sein Hauptbestandteil ist das kleine Oberflächenprotein S. Dieses Protein wird in Form von so genannten subviralen Partikeln zusammen mit zellulären Lipiden von der Zelle abgegeben und bildet das Hauptepitop des Virusoberflächenantigens (HBsAg) aus. Sowohl in der natürlichen Infektion als auch im Zellkultursystem werden die subviralen Partikel in großer Menge sekretiert, was eine Besonderheit der Hepadnaviridae ist.

1.1.2 Die Virusfamilie Hepadnaviridae

Das humane Hepatitis B Virus gehört zur Familie der Hepadnaviridae (Hepar = Leber, dna = DNA-Genom), die sich bezüglich der Wirte ihrer Mitglieder in die Gattungen Orthohepadnaviren (Säugetiere) und Avihepadnaviren (Vögel) unterteilt. Das Virus infiziert nur Hepatozyten des Menschen und hat damit einen sehr engen Wirtstropismus, den auch die

anderen Mitglieder der beiden Gattungen aufweisen. Die bekanntesten nicht humanpathogenen Vertreter der Orthohepadnaviren sind das Hepatitis-Virus des Waldmurmeltiers (WHV = „woodchuck hepatitis virus“, Summers *et al.*, 1978) und des Erdhörnchens (GSHV = „ground squirrel hepatitis virus“, Marion *et al.*, 1980). Ausgewachsene und neugeborene Waldmurmeltiere sind ein erfolgreich verwendetes Infektionsmodell, da sich in ihnen experimentell sowohl akute als auch chronische Krankheitsverläufe erzeugen lassen. Bei den Avihepadnaviren gehört das Enten Hepatitis B Virus (DHBV = „duck hepatitis B virus“, Mason *et al.*, 1980) zu den am besten charakterisierten Vertretern. Da mit primären Entenhepatocyten ein Infektionssystem für DHBV existiert, das leichter verfügbar ist als das für HBV, wurden viele Erkenntnisse über Hepadnaviridae mit diesem Tiermodell erworben. Neben DHBV zählt auch das Hepatitis B Virus des Graureihers (HHBV = „heron hepatitis B virus“, Sprengel *et al.*, 1988) zu den Vertretern der Avihepadnaviren.

1.2 Aufbau des Hepatitis B Virions

Das infektiöse Hepatitis B Virion wird auch als Dane-Partikel bezeichnet, da D.S. Dane die ersten mikroskopischen Aufnahmen machte (Dane *et al.*, 1970). Es hat einen Durchmesser von 42 nm und besteht aus einer viralen Hülle, die ein genomhaltiges Kapsid umschließt (Abb. 1). Die Virushülle ist aus Lipiden und den drei viralen Oberflächenproteinen zusammengesetzt. In ihrem Inneren liegt das ikosaedrische Nukleokapsid, das aus Homodimeren des viralen Core-Proteins durch Selbstassemblierung entsteht. Es beinhaltet das DNA-Genom des Virus und hat einen Durchmesser von ca. 30 nm. Abhängig von der Menge der Dimere kann das Nukleokapsid zwei unterschiedliche, symmetrische Formen annehmen (Crowther *et al.*, 1994). Assemblieren 90 Dimere zu einem Kapsid, so entsteht eine T=3 Symmetrie, während 120 Dimere eine T=4 Symmetrie erzeugen. Wird das Core-Protein in anderen pro- oder eukaryotischen Zellen exprimiert, so entstehen dort leere, d.h. genomfreie Kapside. Solche in *E.coli*-Bakterien produzierten Kapside wurden verwendet, um die Kristallstruktur des HBV-Kapsids aufzuklären (Wynne *et al.*, 1999).

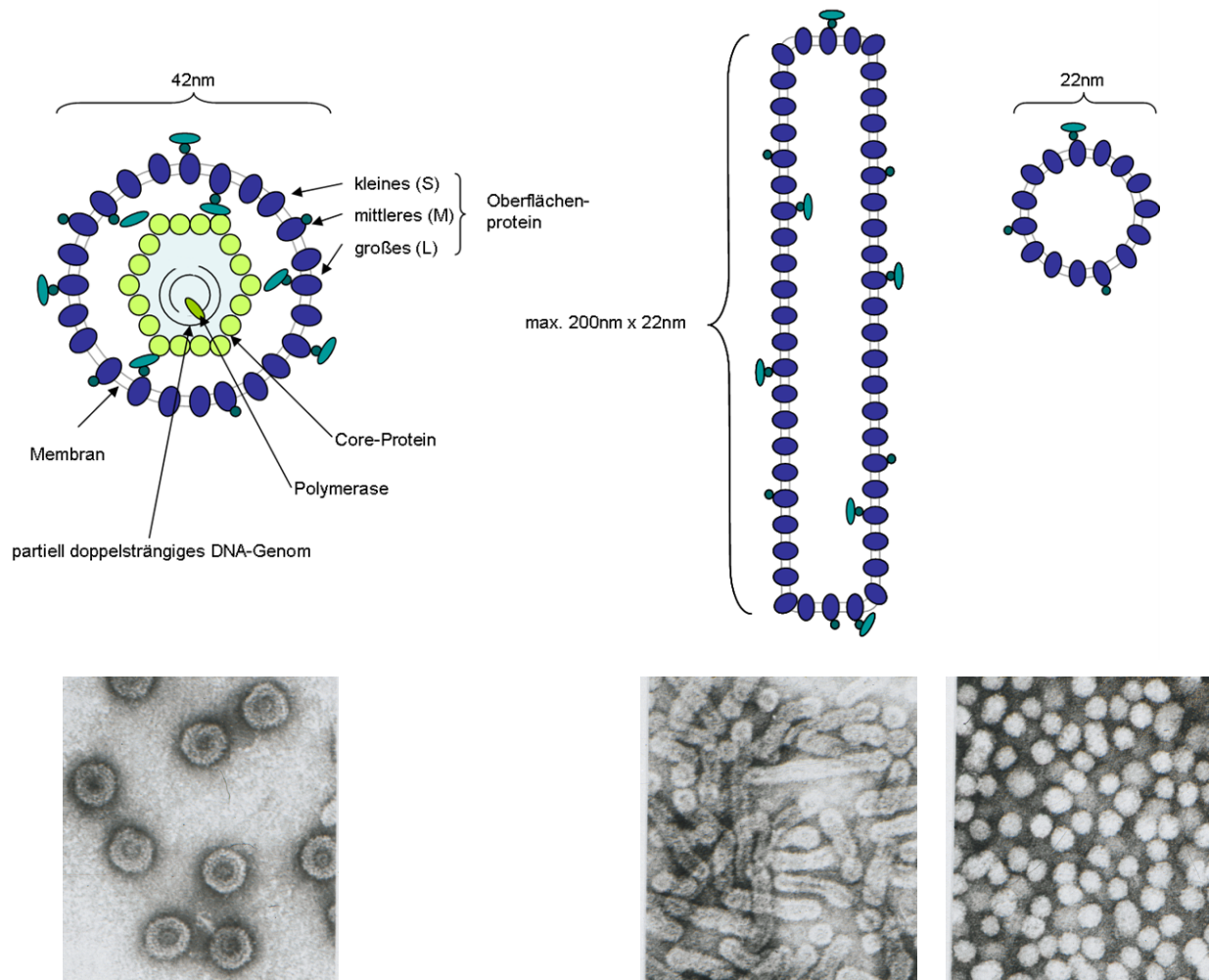


Abb. 1: Schematische Darstellung des Viruspartikels und der sphärischen und filamentösen subviralen Partikel von HBV. Das kleine (S), mittlere (M) und große (L) Hüllprotein sind mit ihren verschiedenen Domänen S/präS1/präS2 in blau dargestellt. Grün angefärbt ist das aus Core-Proteinen (Hbc) bestehende Kapsid, das das virale Genom umhüllt. Mit dem Genom assoziiert ist die virale Polymerase. Die subviralen Partikel bestehen nur aus den Hüllproteinen und zellulären Lipiden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen stammen von W. Gerlich. (Graphik von Beate Schittl, persönliche Mitteilung).

1.3 Genomstruktur

Eingebettet in das virale Nukleokapsid liegt das zirkuläre DNA-Genom des Virus mit einer Größe von 3,2 kb (Abb. 2). Es ist partiell doppelsträngig, was bedeutet, dass es aus einem vollständigen, kodierenden (-)-Strang und einem unvollständigen (+)-Strang besteht, der in seinem 3'-Bereich unterschiedlich lang sein kann (Hruska *et al.*, 1977). Warum die Synthese abbricht und diese variablen Enden entstehen, ist nicht geklärt. Die 5'-Enden der beiden Stränge unterscheiden sich ebenfalls: am 5'-Ende des (-)-Strangs ist kovalent das terminale Protein (TP) gebunden, das eine Domäne des viralen Polymerasekomplex darstellt. Der (+)-

Strang trägt dagegen in seinem 5'-Bereich ein kurzes RNA-Oligonukleotid, das als Primer für seine Synthese dient.

Die 5'-Enden der beiden Stränge erzeugen durch Bindung über komplementäre Sequenzen einen Ringschluss. Diese Bereiche an den Enden der Genomstränge entstehen während der Replikation und werden auch als kohesive Enden bezeichnet. An den Enden beider Stränge liegen zudem „direct repeats“, die 11 nt lang sind und als DR1 und DR2 angegeben werden. Die DR1 liegt am 3'-Ende des (-)-Strangs, während beim (+)-Strang auf das RNA-Oligonukleotid die DR2 folgt. Die Bereiche erfüllen beim Replikationszyklus des Genoms eine wichtige Rolle.

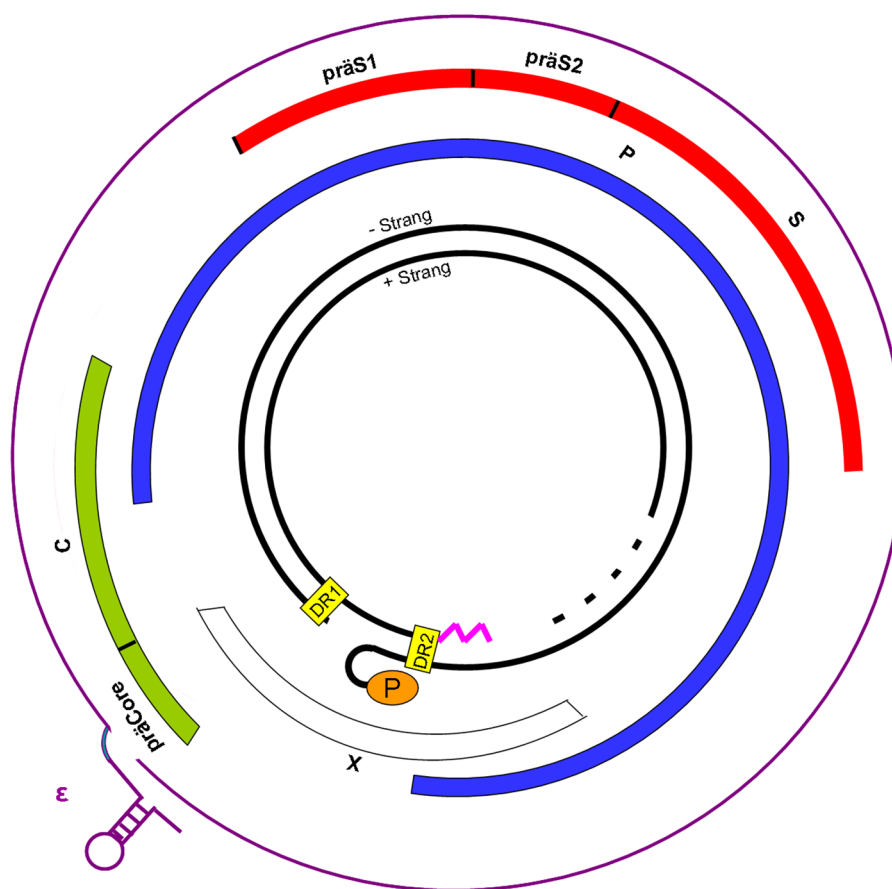


Abb. 2: Genomstruktur des Hepatitis B Virus. Das partiell doppelsträngige DNA-Genom in seiner „relaxed circular“ (rc)-Konformation ist in schwarz dargestellt. An das 5'-Ende des kodierenden (-)-Strangs ist die Polymerase (P) gebunden. Am 3'-Ende des (+)-Strangs hängt der RNA-Primer (rosa Zickzack-Linie). DR1 und DR2 sind die beiden „direct repeats“ an den Enden der beiden Stränge. Durch eine unterbrochene Linie ist das variable Ende des (+)-Strangs gekennzeichnet. Um das Genom sind die offenen Leserahmen angegeben: C (Core), präCore (HBe), X (X-Protein), präS1/präS2/S (Oberflächenproteine), P (Polymerase). Die äußere, violette Linie um das Genom stellt die pgRNA mit ihrer ϵ -Struktur (ϵ) am 5'-Ende dar.

1.4 Transkripte und Replikationszyklus

Gelangt das Genom in den Zellkern wird zuerst der (+)-Strang durch die zelluläre Maschinerie vervollständigt und eine kovalent verknüpfte, zirkuläre DNA (covalently closed circular DNA = cccDNA) erzeugt. Der (-)-Strang der cccDNA dient als Matrize für die verschiedenen viralen Transkripte. Man unterscheidet 5 unterschiedliche mRNAs: Die prägenomische RNA (pgRNA), aus der durch reverse Transkription das DNA-Genom erzeugt wird (Summers und Mason, 1982) umfasst die volle Genomlänge mit einer zusätzlichen Redundanz von ca. 120 nt (inkl. DR1). Insgesamt hat sie eine Größe von ~3,5 kb. Von ihr werden die virale Polymerase und das Core-Protein (Gough, 1983) abgelesen. Eine zweite am 5'-Ende um etwa 30 nt verlängerte RNA wird als precoreRNA bezeichnet und dient als Matrize für das sekretierte HBe-Protein. Die subgenomischen RNAs mit einer Länge von ~2,4 und ~2,1 kb ermöglichen die Produktion der drei Oberflächenproteine. Das kleine und mittlere Hüllprotein werden von der 2,1 kb großen RNA abgelesen (Cattaneo *et al.*, 1983; Cattaneo *et al.*, 1984). Das virale X-Protein wird von einer ~0,9 kb großen RNA kodiert (Gough, 1983). Alle RNAs tragen an ihrem 5'-Ende eine CAP-Struktur und an ihrem 3'-Ende ein polyA-Signal.

Als Matrize für das DNA-Genom dient die prägenomische RNA. An ihrem 5'-Ende trägt sie ein „direct repeat“ und eine „stem-loop“-Struktur, das ϵ -Signal. Für die Umhüllung der pgRNA durch das Kapsid wird der virale Polymerase-Komplex als strukturelle Komponente unabhängig von seinen Enzymaktivitäten benötigt (Bartenschlager *et al.*, 1990; Hirsch *et al.*, 1990). Die Polymerase bindet an das ϵ -Umhüllungssignal am 5'-Ende der pgRNA (Pollack und Ganem, 1994) und leitet damit die Bildung von Replikations-kompetenten Kapsiden ein (Bartenschlager und Schaller, 1992). Einige Nukleotide in einer Ausbuchtung der ϵ -Struktur dienen als Matrize für die Herstellung eines kurzen (-)-Strang-DNA-Primers von ca. 6 Nukleotiden (Nassal und Rieger, 1996). Zusammen mit dem Oligonukleotid wechselt das Protein im nächsten Schritt an das 3'-Ende der pgRNA und bindet über das hergestellte Tetranukleotid an die dortige DR1-Sequenz (Tavis *et al.*, 1994; Tavis und Ganem, 1995). Damit beginnt die Synthese des (-)-Strangs, während durch die RNaseH-Aktivität der Polymerase die pgRNA abgebaut wird. 15-18 RNA-Nukleotide mit der CAP-Struktur am 5'-Ende werden nicht abgebaut und dienen als Primer für die Synthese des (+)-Strangs (Lien *et al.*, 1986; Will *et al.*, 1987). Dieses RNA-Stück beinhaltet auch die DR-Region und kann deshalb an den komplementären DR2-Bereich am 5'-Ende des (-)-Strangs binden, was man als Primer-Translokation bezeichnet.

Die Synthese des Plusstrangs kann deshalb erfolgen, weil eine zweite Primer-Translokation die Zirkularisation der beiden Stränge über ihre redundanten Enden hervorruft. Der Plusstrang wird nur unvollständig synthetisiert und bricht nach 1000- 2000 Basen ab.

1.5 Die viralen Proteine

Das Hepatitis B Virus kodiert in seinem Genom nur sieben Proteine, die von vier offenen Leserahmen abgelesen werden: das Core-Protein, das sekretierte HBe, die virale Polymerase, das X-Protein und die drei Oberflächenproteine.

Das virale Core-Protein (HBc) wird von der pgRNA abgelesen, die den C-ORF beinhaltet. Abhängig vom Genotyp umfasst das Protein 183 – 185 Aminosäuren und ist 21 kDa groß. Homodimere aus zwei Core-Proteinen, die über Disulfidbrücken zwischen ihren Cysteinen verbunden sind, bilden den Grundbaustein für das Nukleokapsid (Zhou und Standring, 1992). Hierbei sind vor allem Cys61 und Cys183 für die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Monomeren verantwortlich (Zheng *et al.*, 1992; Nassal *et al.*, 1992). Der Zusammenbau der Kapside erfolgt durch Selbstassemblierung im Zytoplasma. Der basische, Arginin-reiche C-Terminus des Proteins ist für die Bindung und Verpackung des Prägenoms und die korrekte (+)-Strang-Synthese von Bedeutung (Hatton *et al.*, 1992; Nassal, 1992). Für die Kapsidformation ist dagegen der N-terminale Bereich notwendig und ausreichend (Gallina *et al.*, 1989).

Von einem Startkoden oberhalb des Core-Starts wird das präCore-Protein oder HBe abgelesen. Als mRNA dient hierfür die präcoreRNA, die das zusätzliche Startkodon trägt. Im Vergleich zum Core-Protein trägt HBe 29 zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus und ist 25 kDa groß. Die ersten 19 Aminosäuren dienen als Sekretionssignal, das das Protein zum sekretorischen Weg der Zellen leitet (Ou *et al.*, 1986). Bevor das Protein als 17 kDa-Form von der Zelle abgegeben wird, durchläuft es noch N- und C-terminale Prozessierungen. Die prozessierte Form wird auch in den Seren von infizierten Individuen gefunden und dessen Antigen (HBeAg) dient als wichtiger Marker für eine HBV-Infektion.

Die Polymerase des Hepatitis B Virus ist ein multifunktionelles Protein mit einer Größe von ~90 kDa und wird vom pol-ORF abgelesen (Bavand *et al.*, 1989). Über seine terminale Protein (TP)-Domäne ist das Protein kovalent an das 5'-Ende des (-)-Strangs gebunden und hat sowohl RNAseH- als auch reverse Transkriptase (RT)-Aktivität. Die TP-Domäne initiiert über ein

Tyrosin die Replikation als Protein-Primer (Weber *et al.*, 1994). Durch die RNaseH-Aktivität wird während der Negativstrangsynthese die abgelesene pgRNA abgebaut und die RT-Domäne schreibt die RNA in DNA um und synthetisiert den DNA-(+)-Strang.

Die Aufgabe des viralen X-Proteins ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird von einer eigenen subgenomischen RNA mit einer Größe von ~ 0,9 kb abgelesen. Lucifora *et al.* (2011) konnten zeigen, dass X für den Beginn und die Erhaltung der viralen Replikation benötigt wird und damit einen wichtigen Regulator darstellt.

Die viralen Hüllproteine werden von den beiden größeren subgenomischen RNAs abgelesen (2,1 und 2,4 kb). Das größere Transkript kodiert für das große Hüllprotein, während das kleine Transkript für die Herstellung des mittleren und kleinen Hüllproteins verwendet wird.

1.5.1 Die viralen Oberflächenproteine

Die Hülle des infektiösen Virions besteht aus zellulären Lipidmembranen, in die drei unterschiedliche Hüllproteine eingebettet sind. Nach ihrer Größe werden sie als kleines (S small), mittleres (M, medium) und großes (L, large) Hüllprotein bezeichnet (Abb.3). Sie werden alle vom gleichen offenen Leserahmen abgelesen, der drei Translationsstarts beinhaltet und insgesamt abhängig vom Genotyp 389 oder 400 Kodons umfasst (Heermann *et al.*, 1984). Beginnt die Translation beim ersten Startkodon, so entsteht das große Hüllprotein mit einer Länge von 389 oder 400 Aminosäuren (abhängig vom Genotyp), während aus der zweiten und dritten Startstelle das mittlere Hüllprotein (281 Aminosäuren) und das kleine Hüllprotein (226 Aminosäuren) hervorgehen (Sheu und Lo, 1992). Die 226 Aminosäuren des kleinen Hüllproteins werden auch als S-Domäne bezeichnet und bilden den C-Terminus der mittleren und großen Oberflächenproteine. Diese unterscheiden sich somit nur in ihrem N-Terminus.

Das S-Protein, das nur aus der S-Domäne besteht, hat eine Größe von 24 kDa. Ungefähr 50 % der gebildeten kleinen Hüllproteine werden im ER an einer N-Glykosylierungsstelle am Asn146 glykosyliert (Peterson *et al.*, 1982) (Abb. 3). Die angehängten Zuckerreste führen dazu, dass die glykosylierten S-Proteine mit 27 kDa größer sind als die unglykosylierten Formen. Die kleinen Hüllproteine nehmen im Infektionszyklus des Virus eine herausragende Rolle ein. Zum einen sind sie für die Knospung der infektiösen Viren essentiell, zum anderen sind sie in der Lage, ohne zusätzliche virale Faktoren in eine partikuläre Form überzugehen und als so genannte subvirale Partikel die Zelle zu verlassen.

Die Funktion des mittleren Hüllproteins ist dagegen noch nicht vollständig geklärt. Für die Bildung von Viren und subviralen Partikeln (Bruss und Ganem, 1991a) sowie für die Infektion (Fernholz *et al.*, 1991) wird es nicht benötigt, ist aber in allen Säugetier-Hepadnaviren vorhanden (Neurath und Kent, 1988). Im Vergleich zum kleinen Hüllprotein trägt es 55 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus, die als präS2 Domäne bezeichnet werden. Innerhalb dieses Bereichs liegt an Position 4 eine zusätzliche N-Glykosylierungsstelle (Asn4), die in M-Proteinen genutzt wird (Stibbe und Gerlich, 1983). Auch die N-Glykosylierungsstelle in der S-Domäne wird in einigen M-Proteinen genutzt, was dazu führt, dass intrazellulär sowohl unglykosylierte Proteine (30 kDa), einfach glykosylierte (33 kDa) und doppelt glykosylierte (36 kDa) M-Proteine vorhanden sind.

Das große Hüllprotein enthält neben der S- und präS2-Region zusätzliche 108/119 Aminosäuren – die präS1-Domäne. Das Protein ist, wie auch das kleine Hüllprotein, für die Bildung von Viren unerlässlich (Bruss und Ganem, 1991a). Zudem spielt die präS1-Region bei der Infektion eine Rolle für die Interaktion von Rezeptor und Virus (Urban und Gripon, 2002). Hierbei ist vor allem der Myristylrest an Glycin 2 (Persing *et al.*, 1987) für die Infektivität des Virus unerlässlich ist (Gripon *et al.*, 1995; Bruss *et al.*, 1996). Das große Hüllprotein ist in Viren im Vergleich zu subviralen Partikeln angereichert (Heermann *et al.*, 1984; Chisari *et al.*, 1986).

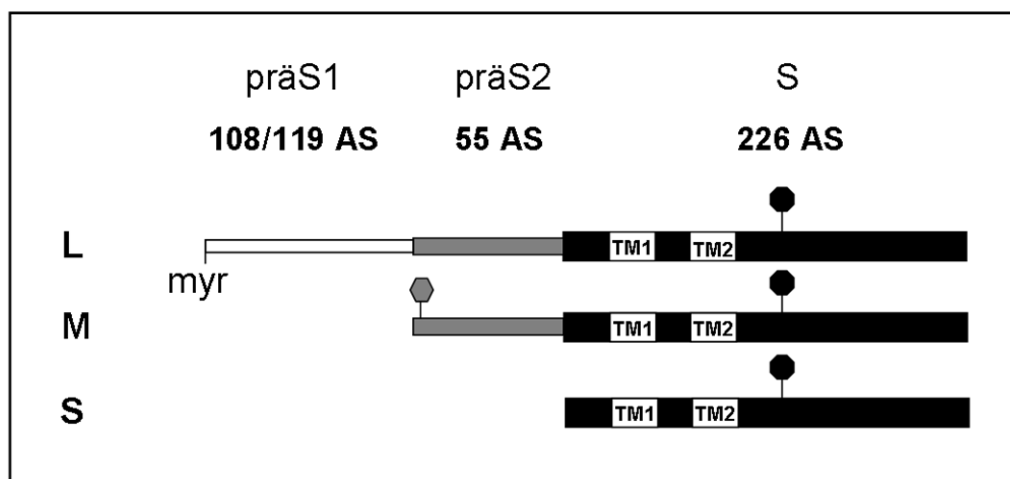
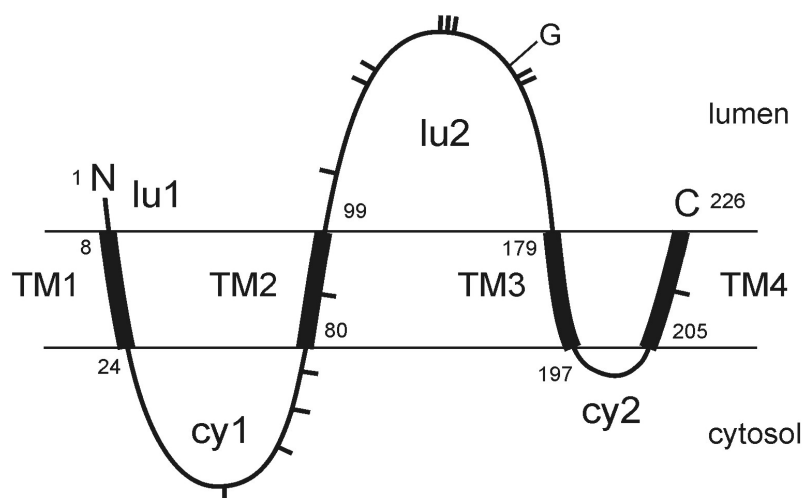


Abb. 3: Schematische Darstellung des kleinen (S), mittleren (M) und großen (L) Oberflächenproteins des Hepatitis B Virus. Die obligatorische N-Glykosylierungsstelle an Asn146 ist mit einem schwarzen Vieleck dargestellt. Die N-Glykosylierungsstelle am Asn4 in der präS2 Region des mittleren Hüllproteins ist durch ein graues Sechseck gekennzeichnet. Sie wird nur im M-Protein, nicht aber im L-Protein benutzt und wird deshalb auch als variabel bezeichnet. myr = Myristoylierung an Asn2.

1.5.2 Membrantopologie der drei Hüllproteine

Die Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus werden nach ihrer Translation als Transmembranproteine in die ER-Membran inseriert. Ihre komplexe Membrantopologie wird von ihrer gemeinsamen S-Domäne bestimmt, die vier Transmembrandomänen ausbildet (Abb. 4, A). Die Transmembrandomäne 1 (TM1) liegt am N-Terminus in einem hydrophoben Bereich zwischen den Aminosäuren 8-24. Sie wirkt als ein Typ I Signal, das den N-Terminus über die ER-Membran transferiert, später aber nicht durch Signal-Peptidasen entfernt wird (Eble *et al.*, 1986). Als topologisches Typ II Signal wirkt dagegen die Transmembrandomäne 2 (TM2), die zwischen den Resten 80-98 lokalisiert ist. Ihr N-Terminus zeigt in Richtung des Zytosols, während der C-Terminus an das Lumen des ER grenzt. Ihre Orientierung und ihre zusätzliche Funktion als „Stop-Transfer“-Signal haben zur Folge, dass der C-terminale Rest des Proteins über die ER-Membran transportiert wird, während der N-Terminale Teil im Zytosol bleibt (Eble *et al.*, 1987). Somit entsteht zwischen der TM1 und der TM2 eine zytosolische Schleife (cy1). Da auch der C-Terminus des kleinen Hüllproteins zwei weitere hydrophobe Bereiche enthält, wird vermutet, dass er über die Transmembrandomänen 3 und 4 (TM3/4) in die Membran inseriert. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich Domänen, die an den C-Terminus des Proteins angehängt wurden, im ER-Lumen befanden. Der C-Terminus wird deshalb ebenfalls im Lumen vermutet (Eble *et al.*, 1986). Zwischen der TM2 und dem C-Terminus entsteht die luminale Schleife (lu2), die das Hauptepitop aller drei Oberflächenproteine trägt und in der die N-Glykosylierungsstelle Asn146 liegt.

A)



B)

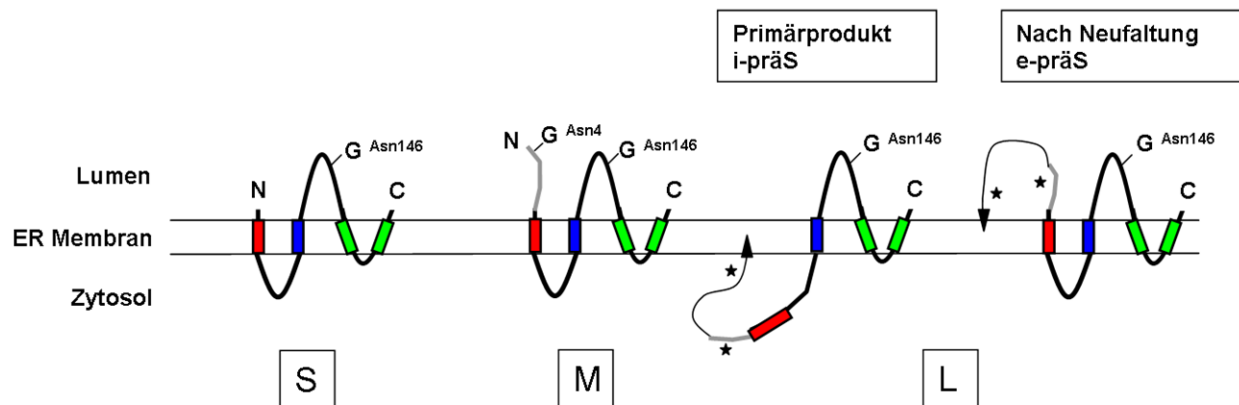


Abb. 4: Schematische Darstellung der Transmembrantopologie des kleinen, mittleren und großen HBV-Hüllproteins. (A) Topologie des kleinen Hüllproteins. Die transmembranen (TM), zytosolischen (cy1+2) und luminalen (lu1+2) Domänen sind mit ihrer ungefähren Aminosäureposition angegeben. Schwarze Striche stellen die 14 Cysteine des Proteins dar. G = N-Glykosylierungsstelle am Asn146 (Graphik Volker Bruss, persönliche Mitteilung). (B) Die Topologie aller drei Proteine wird durch die S-Domäne mit seinen zwei topologischen Signalen TM1 (rot) und TM2 (blau) und seinem hydrophoben C-Terminus (grün) bestimmt. Das M-Protein weist die gleiche Topologie wie das S-Protein auf, so dass die präS2-Domäne (graue Linie) in das ER-Lumen zeigt. Die beiden unterschiedlichen Topologien (e-praS und i-praS) des großen Hüllproteins L sind auf der rechten Seite dargestellt. In der i-praS-Form zeigt die präS1-Domäne in das Zytosol, während bei der e-praS-Form die Domäne im ER-Lumen liegt. Ob der Myristylrest (schwarzer Pfeil) mit der Membran assoziiert ist, wie oben dargestellt, ist noch nicht geklärt. Die N-Glykosylierungsstelle am Asn146 (G^{Asn146} , S-Domäne), die in allen Proteinen in ca. 50% der Fälle genutzt wird und die zusätzliche Glykosylierungsstelle im M-Protein an Asn4 sind ebenfalls angegeben (G^{Asn4}). * = mögliche, nicht genutzte Glykosylierungsstellen.

Das M-Protein bildet trotz zusätzlicher präS2-Domäne die gleiche Membrantopologie aus wie das S-Protein (Abb. 4, B). Da in der präS2-Region kein zusätzliches topologisches Signal liegt, aber der N-Terminus von M über die ER-Membran transferiert wird, erfüllt diese Aufgabe wohl ebenfalls das Typ I Signal in der S-Domäne (Eble *et al.*, 1990).

Das L-Protein weist dagegen nach seiner Translation eine davon abweichende Topologie auf. Seine N-terminalen Domänen präS2 und präS1 verbleiben zuerst im Zytosol und werden nicht über die ER-Membran transportiert (Bruss *et al.*, 1994). Diese Konformation, in der die TM1 der S-Domäne nicht in die ER-Membran inseriert, wird als i-praS Form bezeichnet. Aufgrund ihrer internen Lage im Protein kann die TM1 ihre Translokationsfunktion vermutlich nicht erfüllen und die TM2 verankert die L-Kette in der Membran (Bruss, 2004). In der i-praS-Form wird nur die Glykosylierungsstelle in der S-Domäne teilweise genutzt.

Nach ihrer Translation durchlaufen etwa 50% der L-Proteine eine topologische Veränderung in die e-praS-Form, bei der die präS-Regionen in das Lumen des ER transloziert werden (Bruss *et*

al., 1994; Ostapchuck *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995). Es wird vermutet, dass während dieses Konformationswechsels die TM1 in die Membran inseriert wird (Bruss, 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass die TM2 im L-Protein für die Translokation von L notwendig ist (Lambert und Prange, 2001). Durch diese beiden unterschiedlichen Formen kann das L-Protein zwei Aufgaben parallel erfüllen. Die i-praS-Form ermöglicht eventuell den Kontakt von Hülle und Nukleokapsid während des Knospungsprozesses und die e-praS-Form, bei der die präS-Domänen an der Virusoberfläche liegen, vermittelt die Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche.

1.5.3 Die Hüllproteine von DHBV

Im Vergleich zu HBV fehlt dem DHBV die präS₂-Domäne, und es exprimiert somit nur ein kleines (18 kDa) und ein großes (36 kDa) Hüllprotein von einem offenen Leserahmen. Das S-Protein umfasst 167 Aminosäuren und das L-Protein trägt N-terminal zusätzliche 161 Aminosäuren (präS) (Funk *et al.*, 2007). Beide Proteine werden nicht N-glykosyliert, aber das L-Protein wird phosphoryliert (Grgacic und Anderson, 1994). Weder die Replikation noch die Morphogenese des Virus sind von der Phosphorylierung an Ser118 beeinflusst, was die Bedeutung dieser Modifikation noch offen lässt (Rothmann *et al.*, 1998; Borel *et al.*, 1998). Das L trägt zudem einen Myristylrest am C-terminalen Glycin, der für die Infektiosität benötigt wird (Macrae *et al.*, 1991). Die einzelnen Domänen der Hüllproteine von HBV und DHBV zeigen unterschiedliche Homologien: während die präS-Region von DHBV keine Ähnlichkeiten in der Primärsequenz zu den präS-Domänen von HBV zeigt, ist der Bereich der S-Domäne teilweise homolog. Die Sequenz zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2 zeigt 38 % Homologie und der C-Terminus 23 % (Gerhardt und Bruss, 1995). Diese niedrige Homologie führt vermutlich dazu, dass sich S-Proteine von HBV und S-Proteine von DHBV nicht in gemischte Partikel zusammenlagern können, die von der Zelle sekretiert werden (Gerhardt und Bruss, 1995).

Die Hüllproteine werden ebenfalls über Transmembrandomänen in die ER-Membran inseriert. Wie auch bei HBV ist noch nicht geklärt, ob der C-Terminus eine oder zwei Transmembrandomänen beinhaltet. Neben einer sehr ähnlichen oder gleichen Membrantopologie der S-Domänen, liegt in DHBV auch die duale Topologie der L-Proteine vor (Guo und Pugh, 1997; Swameye und Schaller, 1997). Im Gegensatz zu HBV benötigt DHBV das S-Protein für die Translokation der präS-Domäne über die ER-Membran (Grgacic *et al.*, 2000). Hierbei ist vor allem die TM1 des kleinen Hüllproteins eine wichtige strukturelle Komponente für die Translokation von 50% der L-Proteine über die ER-Membran (Grgacic,

2002). Dabei könnten die TM1-Domänen der S-Proteine lateral miteinander interagieren und einen Kanal bilden, durch den die präS-Domäne transloziert wird (Guo und Pugh, 1997). Beide Hüllproteine zusammen können, wie auch bei HBV, als DNA-freie, subvirale Partikel abgegeben werden, die in Lebern und Seren von infizierten Enten detektiert werden konnten (Schlicht *et al.*, 1987).

1.6 Infektionszyklus

DHBV und HBV haben, wie alle Hepadnaviren, einen sehr engen Wirtstropismus. Das humane HBV kann nur differenzierte humane Hepatozyten infizieren. Welche zellulären Komponenten das Virus als Rezeptor nutzt, ist bisher nicht bekannt. Für das DHBV wurde die duck Carboxypeptidase D (dCTD) als möglicher Rezeptor identifiziert (Kuroki *et al.*, 1994; Kuroki *et al.*, 1995; Breiner *et al.*, 1998). Als Eintrittsweg des HBV wird die rezeptorvermittelte Endozytose angenommen, so dass nach Fusion der Membranen das Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen wird. Bei DHBV spielt hierbei die TM1 im großen Hüllprotein vermutlich als Fusionspeptid eine Rolle im Fusionsprozess, da eine Verringerung der Hydrophobizität der TM1 durch Alanin-Substitutionen die Infektivität senkte (Chojnacki *et al.*, 2005). Auch für HBV konnte gezeigt werden, dass hydrophobe Bereiche in der TM1 des großen Hüllproteins für die Infektivität des Virus essentiell waren (Lepère-Douard *et al.*, 2009). Wenn das Nukleokapsid in das Zytoplasma gelangt ist, wird es zum Zellkern transportiert, wo das Genom in das Innere abgegeben wird. Der (+)-Strang der partiell doppelsträngigen, viralen DNA wird dort von zellulären Enzymen vervollständigt und zur cccDNA umgewandelt. Bis zu 50 Kopien der cccDNA, die vermutlich in Form von Histon-assoziierten Minichromosomen vorliegen (Bock *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1995), können in natürlich infizierten Hepatozyten vorkommen (Zhu *et al.*, 2001). Von der cccDNA werden mit Hilfe der zellulären RNA-Polymerase II die prägenomischen und subgenomischen RNA-Transkripte abgelesen und in das Zytoplasma transportiert. Die ca. 3,5 kb lange pgRNA dient als Matrize für die Synthese des DNA-Genoms und wird im Zytoplasma in das aus Core-Proteinen selbstassemblierende Kapsid verpackt. In seinem Inneren erfolgt das Umschreiben der pgRNA in die rc-DNA-Form. Die Kapside können dann entweder zurück zum Kern transportiert werden, um den cccDNA-Pool zu erhöhen oder werden von den Oberflächenproteinen umhüllt. Da in Viren nur DNA-haltige, reife Kapside gefunden wurden (Gerelsaikhani *et al.*, 1996), wird vermutet, dass das Kapsid während der (+)-Strang-Synthese eine konformationelle Veränderung durchläuft, die als „Verpackungssignal“ dient (Summers und Mason, 1982).

Es wird vermutet, dass die Knospung der Viren an einer Membran innerhalb der Zelle stattfindet. In der präS1-Domäne des L-Proteins konnte eine Domäne (AS 103-124) charakterisiert werden, in der Mutationen die Umhüllung von reifen Kapsiden verhinderten (Bruss, 1997). Auch Deletionen in einem Bereich von elf Aminosäuren (AS 35-46) in der zytosolischen Schleife des S-Proteins blockierten die Bildung von Viren (Löffler-Mary *et al.*, 2000). In einer Mutationsanalyse, die auf der Kristallstruktur des Kapsids basierte, wurden zudem elf Reste im Core gefunden, die denselben Phänotyp verursachten (Ponsel und Bruss, 2003). Das Modell geht deshalb davon aus, dass es bei der Verpackung zu einer direkten Interaktion von Kapsid und Hüllproteinen über die identifizierten Bereiche kommen könnte.

An welcher internen Membran der Knospungsprozess von Statten geht, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in Komponenten des ESCRT-Komplexes (ESCRT = endosomal sorting complex required for transport) die Sekretion von Hepatitis B Viren unterbinden konnte (Lambert *et al.*, 2007). Die einzelnen Proteine des ESCRT werden zum späten Endosom rekrutiert und ermöglichen dort die Bildung von „multivesicular bodies“ (MVBs). Diese Kompartimente besitzen die Eigenschaft intraluminale Vesikel zu erzeugen, die aus dem Zytosol in das Lumen der MVBs knospen können. Als möglicher Knospungsort kommen deshalb die MVBs in Frage. Die Sekretion von subviralen Partikeln dagegen war durch ESCRT-Inhibitoren nicht gestört, weshalb von einem anderen sekretorischen Weg ausgegangen wird (Lambert *et al.*, 2007).

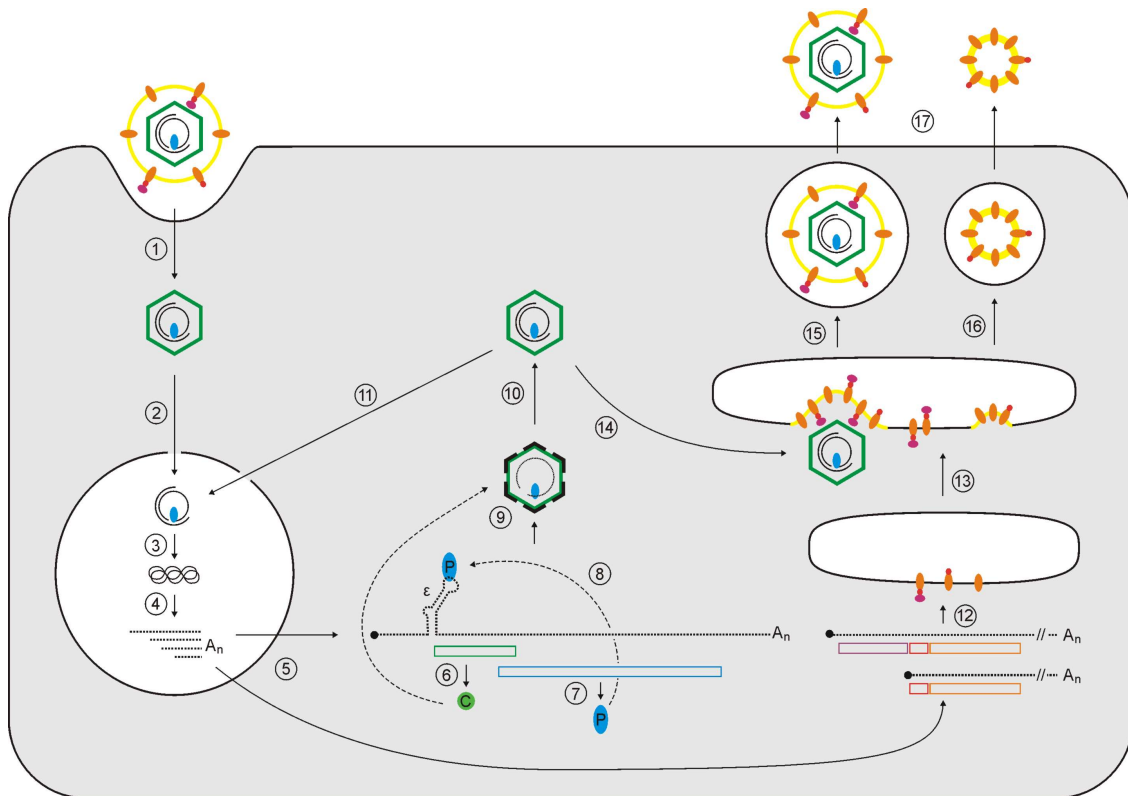


Abb. 5: Infektionszyklus des Hepatitis B Virus. (1) Eintritt des Virus in die Zelle und Abgabe des Nukleokapsids in das Zytoplasma, (2) Transport des Kapsids zum Kern, (3) Bildung der cccDNA, (4) Transkription der cccDNA, (5) Transport der viralen mRNAs aus dem Kern, (6) + (7) Translation des Core-ORF und des Polymerase-ORF, (8) Bindung der Polymerase an die pgRNA, (9) Umhüllung des Polymerase-Prägenom-Komplexes durch Core-Proteine, (10) Synthese des DNA-Genoms durch reverse Transkription, (11) Rückführung der Genome in den Zellkern, (12) Translation der Oberflächenproteine, (13) Knospung von subviralen Partikeln, (14) Umhüllung der reifen Kapside, (15)+(16) Sekretion von Viren und SVP aus der Zelle, (17) Viren und subvirale Partikel außerhalb der Zelle (Graphik Volker Bruss, persönliche Mitteilung).

1.7 Subvirale Partikel

Von der HBV-infizierten Zelle werden neben infektiösen Viren auch so genannte subvirale Partikel in das Serum abgegeben. Sie bestehen aus den viralen Hüllproteinen und zellulären Lipiden. Da ihnen sowohl das Nukleokapsid als auch das virale Genom fehlen, sind sie nicht infektiös. Allerdings gleichen sie in ihrer Oberflächenstruktur einem Virus, weshalb sie hoch immunogen sind. Transfiziert man Zelle mit der kodierenden Region für das HBsAg, sekretieren sie Partikel, die morphologisch und von ihren Antigenen nicht von denen aus dem Serum unterscheidbar sind (Huovila *et al.*, 1992). Dies konnte für Affenzellen (Crowley *et al.*, 1983; Moriarty *et al.*, 1981; Liu *et al.*, 1982), Mäusefibroblasten (Dubois *et al.*, 1980) und Hamsterzellen (Patzner *et al.*, 1984) gezeigt werden. Die Expression des S-Proteins ist somit ausreichend, um in Zellkultur subvirale Partikel zu produzieren. Ihre Immunogenität und ihre einfache Herstellung in eukaryotischen Zellen oder Hefe haben deshalb dazu geführt, dass

subvirale Partikel als Basis für die Impfung gegen HBV dienen. Während pro Tag nur etwa 1-10 Viren pro infizierter Hepatozyte entstehen (Nowak *et al.*, 1996), erreichen die subviralen Partikel einen 1000-10.000 fachen Überschuss in Patientenseren (Robinson und Lutwick, 1976; Ganem und Varmus, 1987). Welche Aufgabe dieses Überschusses an nicht infektiösen Partikeln erfüllt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Da sie dieselben Antigene wie Viren auf ihrer Oberfläche tragen, könnten sie neutralisierende Antikörper des Wirts abfangen, und damit für die infektiösen Viren die Chance für eine Neuinfektion erhöhen (Ganem, 1991; Seeger *et al.*, 2007). Ebenfalls in Betracht gezogen wurde, dass subvirale Partikel zu einem Immuntoleranz-Status beitragen, der eine Voraussetzung für eine hochproduktive, persistierende Infektion ist (Gerlich und Kann, 2005).

1.7.1 Morphologie der subviralen Partikel

Abhängig von ihrer Zusammensetzung können die subviralen Partikel heterogene Formen annehmen. Die vorherrschenden Formen sind Sphären und Filamente mit ungefähr 22 nm Durchmesser (Abb. 1). Der Hauptbestandteil ist in beiden Fällen das kleine Hüllprotein und in geringerer Menge das mittlere Hüllprotein. In filamentösen Formen und Viren wird das L-Protein verstärkt eingebaut (Heermann *et al.*, 1984). Allerdings führt die Koexpression von S mit dem großen Hüllprotein zu einer Reduzierung der Partikelsekretion (Chisari *et al.*, 1986; Persing *et al.*, 1986; Ou und Rutter, 1987). Bei der Analyse von sphärischen Partikeln aus transgenen Mäusen konnten Gilbert *et al.* (2005) zeigen, dass diese eine oktaedrische Grundstruktur aufwiesen. Für einen dieser Lipoprotein-Partikel werden ungefähr 100 S-Monomere benötigt (Heermann *et al.*, 1984; Aggerbeck und Peterson, 1985), die sehr dicht gepackt sein müssen, da der Lipidanteil der Partikel nur etwa 25 % beträgt (Gavilanes *et al.*, 1982). Diese Zusammensetzung spricht gegen eine Anordnung der Lipide in einer Doppellipidmembran (Satoh *et al.*, 2000). Die Hauptlipidkomponente der Partikel ist Phosphatidylcholin mit ca. 80%. Vor allem das 1,2-diacyl-Glycerophosphocholin wird präferentiell in die HBsAg-Partikel eingebaut und zwar unabhängig, ob die Partikel in humanen Hepatomazellen (Satoh *et al.*, 1990) oder Mäusefibroblasten (Satoh *et al.*, 2000) produziert wurden. Eine davon abweichende Zusammensetzung haben dagegen Partikel, die aus dem Serum von Patienten isoliert wurden. Sie bestehen nur zu 60 % aus Phosphatidylcholin und jeweils zu 15% aus Cholesterylester und Cholesterol (Gavilanes *et al.*, 1982). Da während der Zirkulation der subviralen Partikel ein Austausch, Transfer und eine Neumodellierung der Lipidkomponenten stattfinden könnte, wäre dies eine Erklärung für die Unterschiede (Satoh *et al.*, 1990).

1.7.2 Sekretionsweg

Die Sekretion von subviralen Partikeln aus infizierten Zellen in das Serum ist ein Phänomen, das hauptsächlich von Hepadnaviren bekannt ist. Nicht nur deshalb ist der Mechanismus, der zur Bildung und Sekretion der Partikel führt, noch nicht vollständig verstanden. Das gängige Modell geht davon aus, dass die kleinen Hüllproteine an der ER-Membran als integrale Transmembranproteine synthetisiert werden (Simon *et al.*, 1988) (Abb. 6). Parallel zur Insertion in die Membran wird die Hälfte der Proteine durch ER-Enzyme am Asparagin 146 N-glykosyliert (Peterson *et al.*, 1982). Danach kommt es vermutlich durch Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken zur Dimerisierung der Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass einige der 14 Cysteine zu intermolekularen Brückenbildungen beitragen (Mangold *et al.*, 1997). Dimere gelten als der Hauptbaustein der subviralen Partikel (Gilbert *et al.*, 2005) und bilden sich ohne spezielle Präferenzen zwischen unglykosylierten und glykosylierten Formen des Proteins aus (Wunderlich und Bruss, 1996). Kolokalisationsexperimente des ER-Enzyms Protein Disulfid Isomerase (PDI) mit dem S-Protein lassen vermuten, dass die PDI sehr schnell die Dimerisierung der S-Proteine im ER katalysiert, die Dimere dann aber in ein ER/Golgi intermediäres Kompartiment transportiert werden, wo keine PDI mehr lokalisiert ist und die Dimere zu höheren Oligomeren vernetzt werden könnten (Huovila *et al.*, 1992). Neben den Disulfidbrücken scheinen für spätere Schritte der Partikelbildung auch andere Interaktionen zwischen den S-Ketten eine Rolle zu spielen, da Mutanten, bei denen 10 der 14 Cysteine durch Serine ersetzt wurden, noch immer mit Wildtyp-Effizienz sekretiert wurden (Wunderlich und Bruss, 1996). Wo die weitere Vernetzung der Dimere zu Oligomeren und die eigentliche Partikelbildung ablaufen, ist deshalb noch unklar. Da die Hüllproteine nicht in der Zytoplasmamembran detektiert werden können (Patzner *et al.*, 1986), sondern im ER lokalisiert sind, erscheint eine Knospung dort als sehr wahrscheinlich. Eine Möglichkeit für den Beginn der Partikelmorphogenese könnte die Bildung von Dimeren im ER sein, die aufgrund von hohen Konzentrationen von PDI nicht zu höheren Oligomeren vernetzt werden können. Nachdem diese Dimere zu einem ER/Golgi intermediären Kompartiment (ERGIC) transportiert wurden, wo die Anzahl an Chaperonen geringer ist, könnten sich die für die Partikelbildung essentiellen Quervernetzungen bilden (Huovila *et al.*, 1992). Andere Gruppen postulieren dagegen, dass die dimerisierten S-Proteine lange, teils verzweigte Filamente im perinukläären Raum an der ER-Membran bilden. Diese werden vermutlich durch ER-Chaperone zu längs- oder quervernetzten, kristallinen Strukturen gefaltet, in Vesikel verpackt und zum ERGIC transportiert (Patzner *et al.*, 1986; Patient *et al.*, 2007). Es wurde beobachtet, dass sich die Filamente in bis zu 1-2 µm großen ERGIC-Zisternen

sammeln und eine entspannte Form einnehmen, vermutlich weil das zelluläre Milieu verändert ist und/oder sie mit neuen Chaperonen interagieren (Patient *et al.*, 2009a). Dass sich dort an den Enden der Filamente vesikuläre, subvirale Partikel abschnüren, die aufgrund der geringen Größe durch den Golgi transportiert werden können, ist bisher nur eine Hypothese, die durch EM- Aufnahmen gestützt ist (Patient *et al.*, 2007). Im Golgi werden die Mannose-reichen Zuckerreste am S durch komplexere Reste ersetzt und die Partikel direkt über den sekretorischen Weg aus der Zelle ausgeschleust. Patzer *et al.* (1986) konnten nachweisen, dass alle S-Proteine, die sich in großen ER-ähnlichen Kompartimenten aufhielten, keine komplexen Zuckerreste trugen und demnach den Golgi noch nicht passiert hatten. Man geht deshalb davon aus, dass der Transport von diesen Kompartimenten zum Golgi der limitierende Faktor für die Sekretion ist.

Während die Viren für ihre Sekretion die zelluläre Maschinerie für die Bildung von „multivesicular bodies“ (MVB) benötigen, scheint die Sekretionsroute der subviralen Partikel davon unabhängig zu verlaufen (Lambert *et al.*, 2007). Die lässt auf zwei unterschiedliche Exportwege von Viren und subviralen Partikeln schließen.

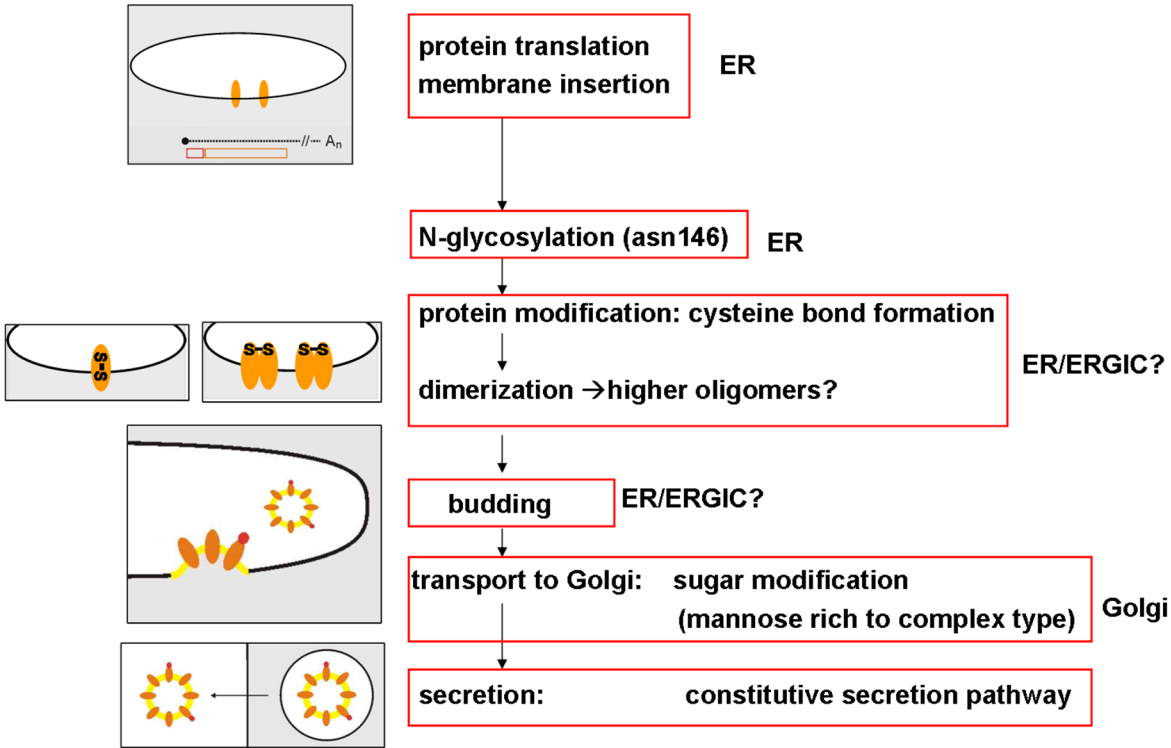


Abb. 6: Modell des Sekretionsweges der subviralen Partikel.

1.8 Ziel der Arbeit

Die vier Transmembrandomänen des kleinen Hüllproteins stellen wichtige strukturelle Komponenten für die korrekte Konformation der Hüllproteine dar (Eble *et al.*, 1986; Eble *et al.*, 1987). Darüber hinaus ermöglicht diese komplexe Membrantopologie dem S die Selbstassemblierung und Knospung zu subviralen Partikeln. Da Deletionen von Teilen oder der ganzen hydrophoben Transmembrandomänen nicht nur die Stabilität des Proteins verringern können, sondern auch dessen Sekretion blockieren (Bruss und Ganem, 1991b; Prange *et al.*, 1992; Lepère-Douard *et al.*, 2009), scheinen die Transmembrandomänen eine wichtige Funktion in der Partikelmorphogenese zu übernehmen.

Es sollte deshalb in dieser Arbeit näher charakterisiert werden, welche Rolle die Transmembrandomänen des kleinen HBV Hüllproteins für einzelne Schritte der Partikelbildung spielen. Hierbei sollten die frühen Ereignisse, wie die Ausbildung der korrekten Membrantopologie durch Insertion der Kette in die ER-Membran, die N-Glykosylierung und Dimerisierung, sowie späte Schritte wie die Bildung und Sekretion der Partikel untersucht werden. Um all diese Aspekte zu beleuchten, sollten unterschiedliche Mutationen in die Transmembrandomänen eingeführt werden und die Bereiche durch funktionell ähnliche Regionen anderer Proteine ersetzt werden. Zudem sollte die Konserviertheit der Transmembrandomänen zwischen DHBV und HBV untersucht werden. Hierfür sollten Chimären aus HBV mit den DHBV-Transmembrandomänen erzeugt und getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Standort
30 % Acrylamid Mix Proto Gel	National Diagnostics, Atlanta, US
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP	New England Biolabs, Frankfurt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI (0,1 mg/ml)	Chemicon International, Temecula, US
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTPs (10 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entwicklerlösung A und B	Agfa Healthcare NV, Mortsel, BE
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fixiererlösung	Agfa Healthcare NV, Mortsel, BE
Fugene 6/HD/Xtreme	Roche, Mannheim
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycerin (99 %)	Applichem, Darmstadt
Glykogen	Fermentas, St. Leon-Rot
HCl (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kalium-Acetat	Merck, Darmstadt
KCl	Carl Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mounting Media (IF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Riedel de Haen, Seelze

Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat x 2H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Fluka, Buchs
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Merck, Darmstadt
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tween20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Laborgerät	Hersteller, Standort
Abbott HBs ELISA	Abbott, Wiesbaden
Absaughilfe Zellkultur Vacuboy	Integra Biosciences AG, Zizers, CH
Absaugsystem Zellkultur Vacusafe	Integra Biosciences AG, Zizers, CH
Brutschrank für Bakterien (37°C)	Memmert, Schwabach
CO ₂ -Inkubator Zellkultur Hera Cell 150i	Thermo Scientific, Dreieich
Elektroblot-Kammer Fastblot B34	Biometra/Analytic Jena, Jena
Elektroporator <i>E.coli</i> Pulser	Biorad, München
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, BE
Feinwaage AC 100	Mettler, Gießen
Filmkassette 18x24	Agfa Gevaert, Mortsel, BE
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank (-80°C), Hera Freeze	Heraeus, Hanau
Geldokumentationsanlage	Biorad, München
Grobwaage EG2200-2NM	Kern und Sohn, Balingen
Heizwasserbad Zellkultur	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Hybridisierungsflaschen	Biometra/Analytic Jena, Jena
Hybridisierungsöfen Compact Line OV4	Biometra/Analytic Jena, Jena
Kühlschrank	Liebherr, Biberach
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco17	Thermo Scientific, Dreieich
Kühlzentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen
Laufkammer SDS-PAGE Maxigel	Biometra/Analytic Jena, Jena
Laufkammer SDS-PAGE Multigel	Biometra/Analytic Jena, Jena
Laufkammer für Agarosegelelektrophorese	Thermo Scientific, Dreieich
Magnetrührer Variomax Monotherm	Neolab, Heidelberg

Mikroskop Olympus Fluoview	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus IX81	Olympus, Hamburg
Mikroskop ZK Primo Vert	Carl Zeiss Jena, Jena
Mikrowelle Privileg 9029GD	Privileg, Stuttgart
Mini-Zentrifuge (Tischzentrifuge) SproutR	Heathrow Scientific LLC, Nottingham, UK
Nanodrop ND 2000c	Peqlab, Erlangen
PCR-Gerät Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter inoLab WTW series	WTW, Weilheim
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe accu jetR pro	Brand, Wertheim
Probenmischer (Vortexgerät) MS3 basic	IKA Schütt, Göttingen
Quartzküvette Spectrophotometer Cell Micro	Biorad, München
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, CH
Spannungsgerät Agarose Power Pack 300	Biorad, München
Spannungsgerät SDS Standard Power Pack P25	Biometra/Analytic Jena, Jena
Spectrophotometer Smart Spec TM Plus	Biorad, München
Sterilbank Lamin Air HLB2448 GS	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch 312 nm	Bachhofer, Reutlingen
Wippe Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge ZK Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge ZK Labofuge 400 Function line	Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Standort
1,5 ml-/2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml-Falcon	Greiner bio-one, Frickenhausen
50 ml-Falcon	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmalküvetten	Braun, Melsungen
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gelspitzen GelTip 100 ART	Molecular Bio Products, San Diego, US
Hyperfilme ECL	GE Healthcare, München
Kryogefäße (Zellkultur)	Nunc, Langenselbold
Kulturröhrchen Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Gefäße	Kisker, Steinfurt
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Deckgläschen (rund)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Spitzen Sterican	Braun, Melsungen
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter MillexGP 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Whatman-Papiere	Whatman GmbH, Dassel
Zellkulturschalen (10 cm, 6-well)	Nunc, Langenselbold

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Annealing Puffer (Mutagenese)	200 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O 500 mM NaCl ad pH 7,5 mit 37 % (v/v) HCl
DNA-Ladepuffer (10x)	50 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol mit H ₂ O auffüllen
Kathodentransferpuffer (200 ml)	200 ml Transferpuffer 0,5 % (w/v) SDS
Ladepuffer für native Agarosegele (6x)	50 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol 6x TAE
Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 20 mM EDTA 0,5 % (v/v) Nonidet P40
Milchpuffer (Western Blot)	10 % (w/v) Magermilchpulver 0,1 % (v/v) Tween20 In 1x PBS pH 7,4
PBS pH 7,4	1,4 mM NaCl 0,5 mM KCl 1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2,2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T (Waschpuffer Western Blot)	PBS pH 7,4 0,1 % Tween20
PFA Lösung (Immunfluoreszenz)	2 % (w/v) PFA in H ₂ O à bei 60 °C lösen, pH auf 7,4 einstellen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Puffer I (Plasmidpräparation)	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Puffer II (Plasmidpräparation)	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer III (Plasmidpräparation)	3 M K ⁺ 5 M Acetat- mit Eisessig auf pH 5,5
Puffer IV (Plasmidpräparation)	13 % (w/v) PEG 6000 1,6 M NaCl
Salzlösung (10x)	0,2 M Tris 2 M Glycin
Saponin-Lösung (Immunfluoreszenz)	5 % (w/v) Saponin in PBS
SDS-Ladepuffer (5x)	250 mM Tris pH 6,8 10 % (w/v) SDS 7,5 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 25 % (w/v) DTT (frisch dazugeben)
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Puffer 1 (Trenngel)	1,5 M Tris (pH 8,8)
SDS-PAGE Puffer 2 (Sammelgel)	1 M Tris (pH 6,8)
SSC (20x) pH 7,0	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat-Dihydrat pH 7,0
Synthesis Puffer (Mutagenese)	300 mM Tris HCl 30 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O ad pH 7,8 mit 37 % (v/v) HCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer (1l)	700 ml A.dest. 100 ml Salzlösung (10x) 200 ml Methanol

2.1.4 Nährmedien

2.1.4.1 Nährmedien und Zusätze zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Nährmedium <i>E.coli</i>	Hersteller, Standort
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Carl Roth, Karlsruhe
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	Carl Roth, Karlsruhe
Terrific Broth (TB)	Carl Roth, Karlsruhe

Antibiotikum	Stock	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetrazyclin	5 mg/ml	50 µg/ml

2.1.4.2 Nährmedien und Zusätze zur Kultivierung von humanen Hepatomazellen Huh7

Das DME-Medium (DMEM) wurde mit 10 % FKS versetzt und 1 mM Na-Pyruvat-Lösung, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) zugegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

Nährmedium Huh7	Hersteller, Standort
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) mit 4,5g/l Glucose, L-Glutamin	Lonza, Vervier, BE
Na-Pyruvat Lösung (100 mM)	PAA, Pasching, A
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, A
MEM Non essential amino acids (100x)	PAA, Pasching, A
Fötale Rinderserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (10x)	Biochrom, Berlin

2.1.5 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Bakterienstämme	Genotyp	Nachweis
<i>E.coli</i> , BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>supE thi Δ (lac -proAB) [mutS::Tn10]</i> [F' <i>proAB+ lacIq lacZΔM15</i>]	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F
Electromax <i>E.coli</i> DH10B	F <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80d <i>lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG</i>	Life Technologies /Invitrogen, Darmstadt

Eukarotische Zelllinie	Herkunft	Nachweis
Huh7	humane Hepatomazelllinie	Nakabayashi <i>et al.</i> , 1982

2.1.6 Längen- und Größenstandards für Gele

2.1.6.1 DNA-Längenstandards

Marker	Hersteller, Standort	Fragmente in Basenpaaren (bp)
λ-DNA/ <i>Eco91I</i> (<i>BstEII</i>), Marker, 15 (A)	New England Biolabs, Frankfurt	8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (B)	Fermentas, St. Leon-Rot	1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

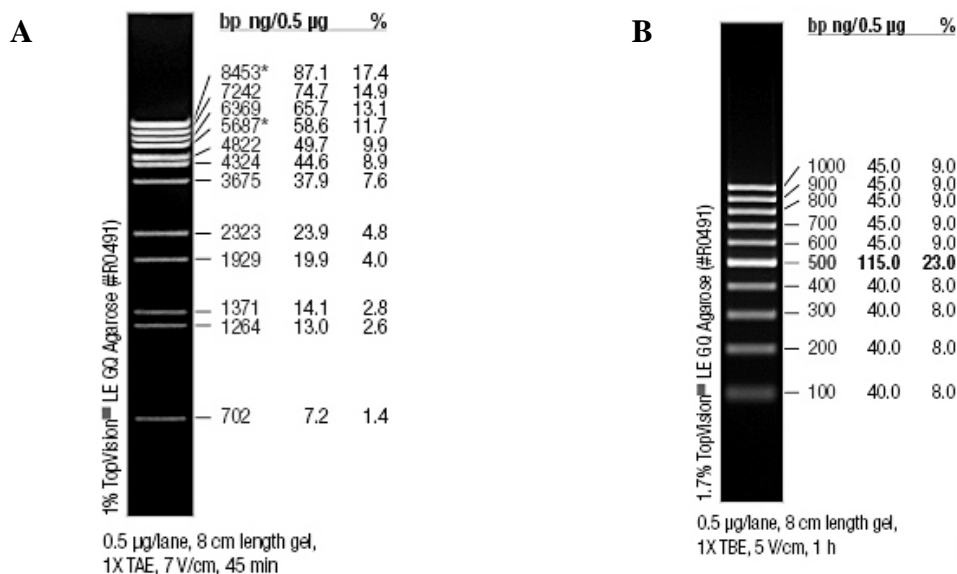


Abb. 7: DNA-Größenstandards (A) λ-DNA/*Eco91I* (*BstEII*) Marker (B) GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder

2.1.6.2 Protein-Größenstandards

Marker	Hersteller, Standort	Proteinbanden in kDa
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (A)	Fermentas, St. Leon-Rot	170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (B)	Fermentas, St. Leon-Rot	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10

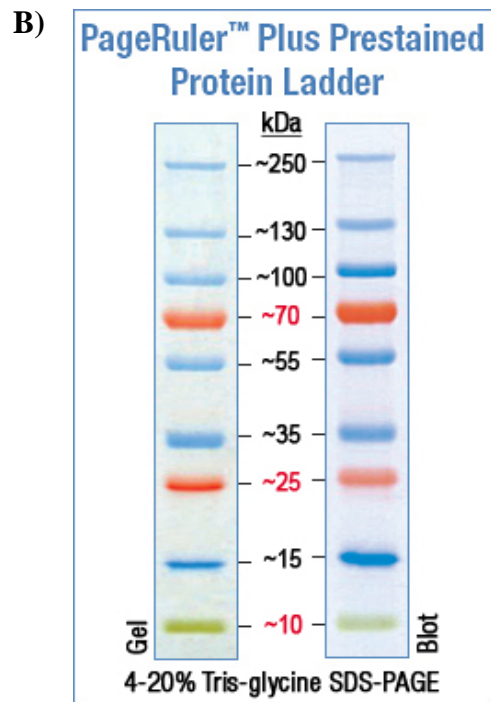
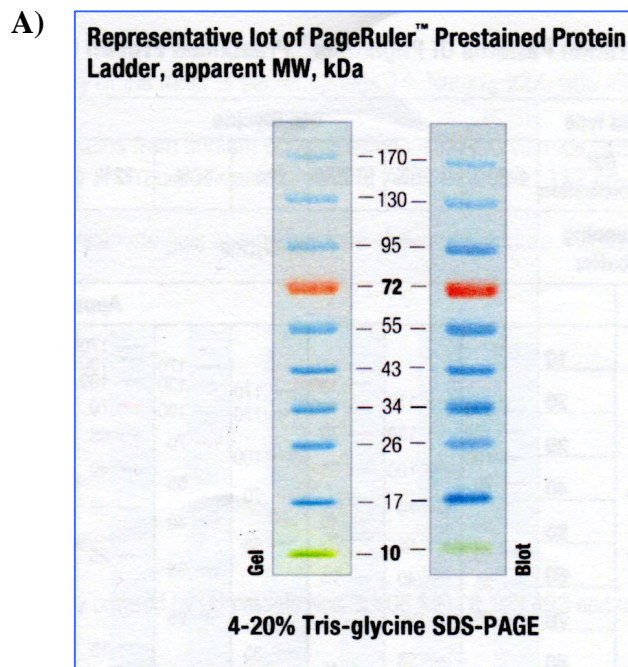


Abb. 8: Protein-Größenstandards (A) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (B) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

2.1.7 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
Punktmutationen TM1		
VBVS3 (F8L)	CACATCAGGATTGCTAGGACCCC	f, Mutationsprimer
VBVS4 (F19L)	CAGGCGGGGTTGTTCTTGTGAC	f, Mutationsprimer
VBVS5 (F20L)	CAGGCGGGGTTTTTGTGTTGAC	f, Mutationsprimer
VBVS9 (F19/20L)	CAGGCGGGGTTATTATTGTTGACAAG	f, Mutationsprimer
Punktmutationen TM2		
VBVN6 (F80L)	CTGCGGCGTTTGATCATATTCC	f, Mutationsprimer
VBVN7 (F83L)	GCGTTTTATCATATTGCTCTTCATCC	f, Mutationsprimer
VBVN8 (F85L)	CATATTCCTCTTGATCCTGCTGC	f, Mutationsprimer
VBVN9 (F93L)	GCCTCATCTTGTTATTGTTCTTC	f, Mutationsprimer
VBFF1 (F80/83L)	GCGGCGTTTGATCATATTGCTCTTCATCCTGC	f, Mutationsprimer
VBFF2 (F80/85L)	GCGGCGTTTAAATCATATTCCTCCTCATCCTGCTGC	f, Mutationsprimer
VBFF3 (F83/85L)	GCGGCGTTTATCATACTCCTCCTCATCCTGCTGC	f, Mutationsprimer
VBVN10 (F80/83/85L)	GCGGCGTTTGATCATATTGCTCTTGATCC	f, Mutationsprimer
VBVN1	GGACCATGCAAAACCTGCA	f, PCR, Sequenzierung
VBVN4	CGAGCAACGGGGTAAAGG	r, PCR
VBVN11	CGAGCTCGAATTCGGTGTATTC	f, Selektion <i>MfeI</i> → <i>EcoRI</i>
VBVS10Sel	CGAGCTCCAATTGCGTGTATTC	f, Selektion <i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
VBVL13	CTGCAGGATCCCAGAGTCAGG	f, Sequenzierung
Insertionen TM1		
1AlaTM1N	CACATCAGGATTCGCCCTAGGACCCCTGC	f, Mutationsprimer
2AlaTM1N	CACATCAGGATTCGCCGCCCTAGGACCCCTGC	f, Mutationsprimer
TM1Ins1Ala	GGACCCCTGCTCGTGGCCTTACAGGCGGGGTTTTTC	f, Mutationsprimer
TM1Ins2Ala	GGACCCCTGCTCGTGGCCGCCTTACAGGCGGGGTTTTTC	f, Mutationsprimer
1AlaTM1C	GTTTTTCTTGTTGGCCACAAGAATCCTCAC	f, Mutationsprimer
2AlaTM1C	GTTTTTCTTGTTGGCCGCCACAAGAATCCTCAC	f, Mutationsprimer
Insertionen TM2		
1AlaTM2N	GTCTGCGGCGTTTTGCCATCATATTCCTCTTC	f, Mutationsprimer
22Nlänger	GATGTGTCTGCGGCGTTTTGCCGCCATCATATTCCTCTTC ATCC	f, Mutationsprimer,
VBVS15	ATATTCCTCTTCGCCATCCTGCTGCTATGC	f, Mutationsprimer
VBVS16	ATATTCCTCTTCGCCGCCATCCTGCTGCTATGC	f, Mutationsprimer
1AlaTM2Clänger	CATCTTCTTATTGGTCTTGCCCTGGATTATCAAGGTATG	f, Mutationsprimer
2AlaTM2C	CTTATTGGTCTTGCCGCCCTGGATTATCAAGG	f, Mutationsprimer
Insertionen TM3		
1AlaNTM3	TCAGTCCGTTTCGCGTCTTGCTCAG	f, Mutationsprimer
1Ala NTM3_2	GTTCAGTGGTTCGCGGTAGGGCTTTCCC	f, Mutationsprimer
1AlaCTM3	CCCCTGTTGGGCTCTTTCAGCTATATG	f, Mutationsprimer

HA-tag		
VBVS17	TGCCGGATTATGCGACCTGGTCGACAGTTGGTAAACCTAA CAAAACAAAAG	f, Klonierung, HA-tag
VBVS18	AGGCTCGCATAATCCGGCACATCATAACGGATAAATGTATA CCCAGAGACAAAAG	r, Klonierung, HA-tag
Chimäre		
TM1-fwd	ATCGGATTACTGGTAAGCTTTTTCTTGTTGATA AGAATCCTCACAATACCG	f, Klonierung DTM1
TM1-rev	TACCAGTAATCCGATTAGGCCAGCTAGTAT TCCTGATGTGATGTTCTCC	r, Klonierung DTM1
TM2-fwd	TCCTGCTAGTAGCAGCCGGCTTGCTGTATCTGACG GATTATCAAGGTATGTTGC	f, Klonierung DTM2
TM2-rev	CTGCTACTAGCAGGATTAAGAGGAAGATGATAAAAAG ACGCCGACACATCCAGC	r, Klonierung DTM2
Betalact-fwd	TTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCT AGAATCCTCACAATACCG	f, Klonierung β -Lactamase
Betalact-rev	AAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGAC TCCTGATGTGATGTTCTCC	r, Klonierung β -Lactamase
Transferrin-fwd	ATTGCTGTGATCGTCTTTTTCTTGATTGGATTTATGATTG GCTACTTGGGCTAT GATTATCAAGGTATGTTGC	f, Klonierung Transferrin-Rezept.
Transferrin-rev	GAAAAAGACGATCACAGCAATAGTCCCATAGCAGATACTT CCACTACA ACGCCGACACATCCAGC	r, Klonierung Transferrin-Rezept.
Transdelvorne	GTGTCTGCGGCGTATCTGCTATGGGAC	f, Klonierung Transferrin-Rezept.
Transdelhinten	GATTTATGATTGGCGATTATCAAGGTATG	f, Klonierung Transferrin-Rezept.
C-terminus-fwd	TGGCTCAGTTTACTAGTGCCA TCGGATCCGAAATCTCTCGTCGCTT	f, Klonierung DC-terminus
C-terminus-rev	CCCCATCTTTTTGTTTTGTTAGGGTTTA ACTCTTGTA AAAAAGAGCAGACAG	r, Klonierung DC-terminus
fwd-Klonierung	ACCATAGTCCGCCCTAACT	f, Klonierung
revKlonierung 2	CGGTATAAAGGGACTCACGA	r, Klonierung
mCherry-Fusion		
KlonierNhefwd	GACATCCCCGACTACTTG	f, Klonierung
FusMutNheIneu	GAGGTGGCGGGTTCGCTAGCATGGAGAACATCAC	f, Klonierung
betaFusionfwd	GGGGACCTGTGGCTAGCATGGAGAACATCAC	f, Klonierung
FusMutNheIRev	GTGATGTTCTCCATGCTAGCGACCCCGCCACCTC	r, Klonierung
Fusionrev	CAGCGGTATAAAGGGACTCACG	r, Klonierung

Tab. 1: In der Tabelle sind alle verwendeten Oligonukleotide angegeben. Bei den Primern, die für die Insertionen oder Punktmutationen verwendet wurden, sind die Änderungen unterstrichen. Bei den Primern für die Herstellung der chimären Konstrukte, ist die HBV-Sequenz markiert.

2.1.8 Plasmide

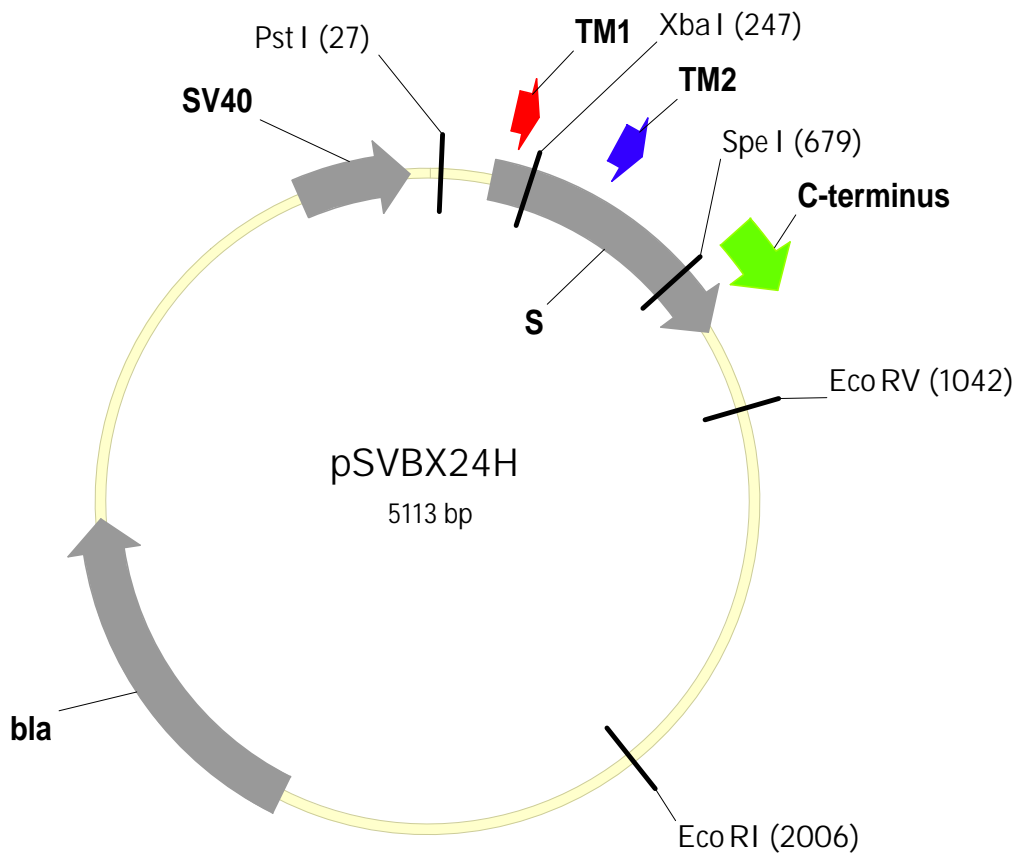


Abb. 9: Schematische Darstellung des Plasmids pSVBX24H. Die Vektorkarten wurden mit dem Programm Vector NTI® (Invitrogen) erstellt.

pSVBX24H (Gerhardt und Bruss, 1995)

Das Plasmid trägt die kodierende Sequenz für das kleine Hüllprotein S des HBV sowie das Polyadenylierungssignal unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Es wurde durch Insertion eines 1,9 kb großen HBV-Fragments in den Expressionsvektor pSV65 gewonnen. Für die Selektion in *E.coli* ist zudem das β -Lactamase-Gen (*bla*) auf dem Plasmid lokalisiert, das eine Ampicillin-Resistenz verursacht.

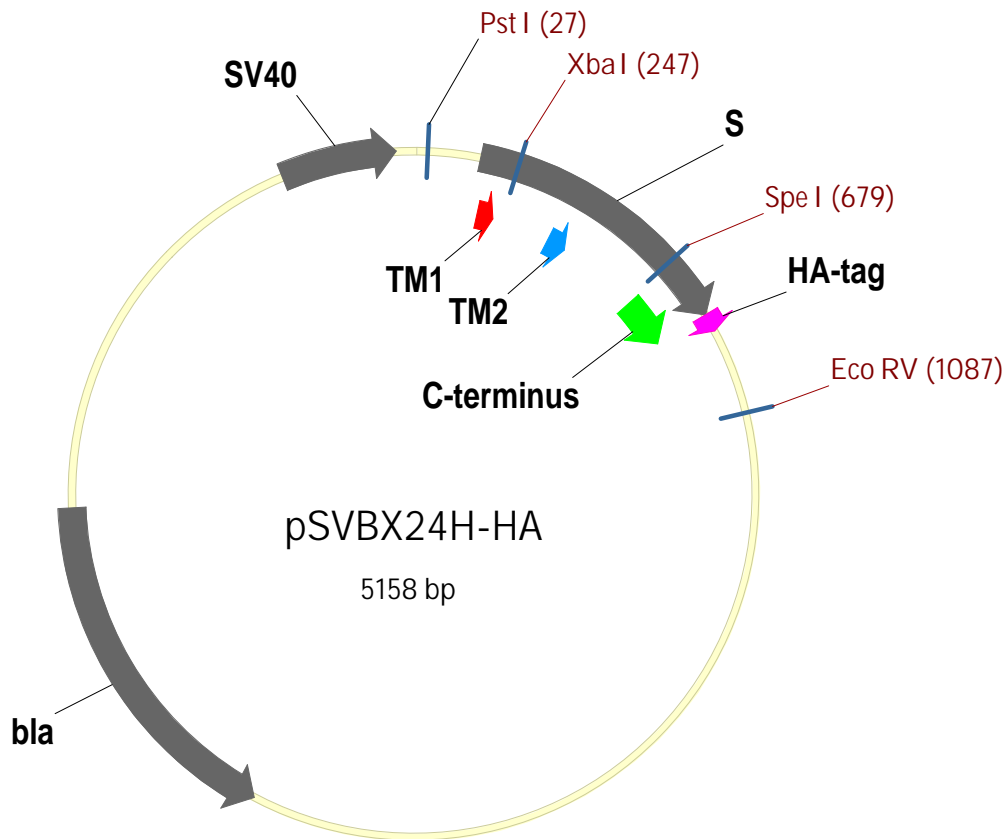


Abb. 10: Schematische Darstellung des Plasmids pSVBX24H-HA.

pSVBX24H-HA (diese Arbeit)

Durch Fusion des 11 Aminosäuren (YPYDVPDYASL) umfassenden Hämagglutinin (HA)-Epitops des Influenza Virus an den C-Terminus des kleinen Hüllproteins entstand das Plasmid pSVBX24H-HA. Falls nicht anders angegeben, diene allen Mutanten das Plasmid pSVBX24H-HA als Rückgrat. Einige Mutanten tragen in dem Basentriplett für die Aminosäure an elfter Position des HA-Epitops eine stumme Mutation von CTA (Leu) zu CTG (Leu).

pSV17D

Das Plasmid pSV17D dient der Expression des SDHBs-Protein und wurde aus dem Vektor pSV14 (Gerhardt und Bruss, 1996) durch Veränderung des Startcodons (3`-AAAATGT-5` in 3`-ACCATGT-5`) im Rahmen der Diplomarbeit von Ellen Gerhardt erzeugt. Es wurde zur Amplifikation des Megaprimers verwendet.

2.1.8.1 Punktmutanten der TM1

Die Punktmutationen der TM1 und TM2 wurden mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese in die kodierende Sequenz des S-Proteins eingeführt. Die in den jeweiligen Basentriplets ausgetauschten Nukleotide sind in der Tabelle der Oligonukleotide unterstrichen.

pSVBX24H-HA-F8L

pSVBX24H-HA-F19L

pSVBX24H-HA-F20L (alle diese Arbeit)

Die Plasmide pSVBX24H-HA-F8L, pSVBX24H-HA-F19L und pSVBX24H-HA-F20L kodieren für die Einzelpunktmutanten der TM1 und tragen an der Aminosäureposition 8, 19 oder 20 der kodierenden S-Sequenz jeweils an Stelle des ursprünglichen Basentriplets für Phenylalanin eines für Leucin.

pSVBX24H-HA-F8/19L

pSVBX24H-HA-F8/20L

pSVBX24H-HA-F19/20L

pSVBX24H-HA-F8/19/20L (alle diese Arbeit)

Die Plasmide tragen unterschiedliche Kombinationen von Phe à Leu Substitutionen in der Sequenz von TM1. Die Punktmutation an Position 8 wurde kombiniert mit einem Aminosäureaustausch an Position 19 (pSVBX24H-HA-F8/19L) oder 20 (pSVBX24H-HA-F8/20L) sowie 19 und 20 (pSVBX24H-HA-F8/19/20L). Zudem trägt eine Mutante ein Leucin anstelle des Phenylalanins an Position 19 und 20 der kodierenden Sequenz (pSVBX24H-HA-F19/20L).

2.1.8.2 Punktmutanten der TM2

pSVBX24H-HA-F80L

pSVBX24H-HA-F83L

pSVBX24H-HA-F85L

pSVBX24H-HA-F93L

pSVBX24H-HA-F80/83/85/93L (alle Masterarbeit Jeanette Navratil)

Homolog zur Einführung der Punktmutationen in TM1 wurden auch in TM2 die bestehenden Phenylalanine an den Aminosäurepositionen 80 (F80L), 83 (F83L), 85 (F85L) und 93 (F93L)

durch Leucine ersetzt. Diese Einzelmutanten, sowie eine vierfache Mutante (pSVBX24H-HA-F80/83/85/93L), wurden im Rahmen der Masterarbeit von Jeanette Navratil hergestellt und in dieser Arbeit verwendet.

pSVBX24H-HA-F80/83L

pSVBX24H-HA-F80/85L

pSVBX24H-HA-F83/85L

pSVBX24H-HA-F80/83/85L (alle Bachelorarbeit Franziska Frey)

Die Plasmide, die Kombinationen der Einzelmutationen in TM2 trugen, wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Franziska Frey hergestellt. So wurde die veränderte Aminosäure an Position 80 mit der an Position 83 (F80/83L) sowie 85 (F80/85L) kombiniert. Es wurde auch eine zweifache Punktmutante mit einem Austausch an Position 83 und 85 (F83/85L) sowie eine dreifache Mutante an den Positionen 80, 83 und 85 (F80/83/85L) hergestellt. Alle Mutanten wurden in dieser Arbeit verwendet.

2.1.8.3 Insertionsmutanten der TM1

Die Insertion zusätzlicher Basentriplets für Alanin (GCC, GCG, GCT) in die Sequenz der TM1, TM2 und TM3 wurde mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese durchgeführt. Es wurden an jeder Position ein oder zwei Alanine eingeführt. Die Position der zusätzlichen Nukleotide ist in der Tabelle der Oligonukleotide unterstrichen. Alle Insertionsmutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

pSVBX24H-HA-TM11AlaN

pSVBX24H-HA-TM12AlaN

In diesen Konstrukten wurden ein oder zwei Alanine in den N-terminalen Bereich der TM1 inseriert. Die zusätzlichen Alanine befinden sich an Aminosäureposition 9 (1Ala) bzw. 9 und 10 (2Ala).

pSVBX24H-HA-TM11AlaMi

pSVBX24H-HA-TM12AlaMi

Zur Herstellung der beiden Plasmide wurden ein oder zwei Alanine in den zentralen, membranständigen Bereich der TM1 inseriert. Die zusätzlichen Alanine befinden sich an Aminosäureposition 15 (1Ala) bzw. 15 und 16 (2Ala).

pSVBX24H-HA-TM11AlaC**pSVBX24H-HA-TM12AlaC**

Diese Plasmide tragen ein oder zwei zusätzliche Alanine im C-terminalen Bereich der TM1. Die eingefügten Alanine befinden sich an Aminosäureposition 23 (1Ala) bzw. 23 und 24 (2Ala) der kodierenden Sequenz.

2.1.8.4 Insertionsmutanten der TM2**pSVBX24H-HA-TM21AlaN****pSVBX24H-HA-TM22AlaN**

In die Konstrukte pSVBX24H-HA-TM21AlaN und pSVBX24H-HA-TM22AlaN wurde 1 bzw. wurden 2 zusätzliche Alanine in den N-terminalen Bereich der TM2 eingebracht. Die Alanine liegen an Position 81 bzw. 81 und 82 der Aminosäuresequenz von S.

pSVBX24H-TM21AlaMi**pSVBX24H-TM22AlaMi**

In diesen Konstrukten wurden ein oder zwei Alanine in den zentralen Bereich der TM2 inseriert. Die zusätzlichen Alanine befinden sich an Aminosäureposition 86 (1Ala) bzw. 86 und 87 (2Ala). Als Ausgangsplasmid wurde hier das Plasmid pSVBX24H ohne HA-Epitop verwendet, so dass die zentralen Insertionsmutanten ebenfalls kein HA-Epitop tragen.

pSVBX24H-HA-TM21AlaC**pSVBX24H-HA-TM22AlaC**

Ein Alanin oder zwei Alanine wurden in den Konstrukten pSVBX24H-HA-TM21AlaC bzw. pSVBX24H-HA-TM22AlaC an Aminosäureposition 98 (1Ala) bzw. 98 und 99 in den C-terminalen Bereich der TM2 eingeführt.

2.1.8.5 Insertionsmutanten der TM3**pSVBX24H-HA-TM31AlaN****pSVBX24H-HA-TM31AlaMitte**

Die Konstrukte pSVBX24H-HA-TM31AlaN und pSVBX24H-HA-TM31AlaMitte tragen an Aminosäureposition 184 bzw. 192 ein zusätzliches Alanin in der Sequenz für TM3.

pSVBX24H-HA-TM31AlaAH

An Aminosäureposition 154 bis 174 beinhaltet die Sequenz des S-Proteins eine amphipathische Helix (persönliche Mitteilung Camille Sureau). An Position 171 wurde ein zusätzliches Alanin zentral in die Helix eingebracht.

2.1.8.6 Chimären der TM1

Die Transmembrandomänen 1 und 2 wurden bei den folgenden Chimären mit Hilfe von überlappenden PCR-Fragmenten erzeugt. Die jeweilige Durchführung ist in Absatz 2.2.3.14 angegeben. Die bp-Angaben beziehen sich auf das HBV-Genom aus Valenzuela *et al.*, (1980). Als Nukleotid Nr.1 wird das letzte C der *EcoRI*-Schnittstelle (GAATTC) im Genom gezählt. Die Angaben der Aminosäurepositionen beziehen sich auf den offenen Leserahmen des kleinen Hüllproteins.

pSVBX24H-HA-DTM1 (diese Arbeit)

Das Plasmid pSVBX24H-HA-DTM1 trägt anstelle der TM1 (AS 8-23, bp 174-221) die homologe Sequenz des DHBV (bp 1305 - bp 1351; Sprengel *et al.*, 1985, AS 8-23). Bei Expression des Plasmids entsteht ein chimäres S-Protein, das anstelle der TM1 die DHBV TM1 trägt.

pSVBX24H-HA-beta (diese Arbeit)

Für die Konstruktion von pSVBX24H-HA-beta wurde die erste Transmembrandomäne (AS 8-23) des S-Proteins mit der Typ I Signalsequenz der β -Lactamase ersetzt (AS 8-23, Koshland *et al.*, 1982). Das restliche Plasmid entspricht dem ursprünglichen pSVBX24H-HA.

2.1.8.7 Chimären der TM2**pSVBX24H-HA-DTM2 (diese Arbeit)**

Das Plasmid pSVBX24H-HA-DTM2 enthält anstelle der TM2 (AS 80-98, bp 390-446) des HBV S-Proteins die homologe Sequenz des kleinen Hüllproteins von DHBV (bp 1518 – bp 1574; Sprengel *et al.*, 1985, AS 79-97).

pSVBX24H-HA-Transferrin (diese Arbeit)

In dem Konstrukt pSVBX24H-HA-Transferrin wurde die TM2 von S durch die Typ II Transmembrandomäne des humanen Transferrin-Rezeptors (HTR) ersetzt. Die Sequenz wurde aus der Publikation von McClelland *et al.* (1984) entnommen. Von der dort angegebenen Transmembrandomäne wurde nur der Bereich von AS 62-88 (gesamt 27 AS) in den Vektor inseriert.

pSVBX24H-HA-TransdelVO und pSVBX24H-HA-TransdelHI (diese Arbeit)

Die in den Vektor pSVBX24H-HA-Transferrin inserierte Transmembrandomäne des humanen Transferrin-Rezeptors war um acht Aminosäuren länger als die entsprechende TM2 von S. Aus diesem Grund wurde in den Plasmiden pSVBX24H-HA-TransferrindelVo und pSVBX24H-HA-TransferrindelHI die Sequenz vorne (Vo) und hinten (Hi) jeweils um 4 Aminosäuren verkürzt.

pSVBX24H-HA-Transdel8aa (diese Arbeit)

In dem Plasmid pSVBX24H-HA-Transferrindel8aa ist die Sequenz der Transmembrandomäne des humanen Transferrin-Rezeptors um je 4 Aminosäuren vorne und hinten deletiert, so dass die Gesamtlänge von 19 Aminosäuren der Länge der TM2 von S entspricht.

2.1.8.8 Chimäre des C-Terminus**pSVBX24H-DC-Terminus (diese Arbeit)**

In dem Plasmid pSVBX24H-DC-Terminus wurde der C-Terminus des kleinen Hüllproteins (nt 687-830, AS 179-226), der die beiden potentiellen Transmembrandomänen 3 und 4 beinhaltet, durch den C-Terminus des DHBV ersetzt (bp 1656 – bp 1784; Sprengel *et al.*, 1985, AS 125 - 167). Aufgrund der Klonierungsstrategie trägt diese Mutante keinen HA-tag.

pSV33H-betaM (diese Arbeit)

Das Konstrukt trägt die Genomsequenzen für das S- und M-Protein, bei denen die TM1 von S mit der Typ I Signalsequenz der β -Lactamase ausgetauscht wurde. Da S und M vom gleichen Leserahmen abgelesen werden, entstehen chimäre S und M Proteine, die beide die ausgetauschte TM1 tragen. Um das Plasmid pSV33H-betaM zu erhalten, wurde aus dem Vektor pSVBX24H-HA-beta über die Schnittstellen *PstI* und *SpeI* ein 662 bp großes Fragment geschnitten und in den ebenfalls mit *PstI* und *SpeI* behandelten Vektor pSV33H ligiert.

pSV33H-TM11AlaM**pSV33H-TM12AlaM (diese Arbeit)**

Für die beiden Konstrukte diente das Plasmid pSV33H als Rückgrat. Die Insertion von einem Alanin bzw. zwei Alaninen an Position 9 bzw. 9 und 10 der Aminosäuresequenz des S-Proteins führt dazu, dass sowohl das exprimierte M- als auch das S-Protein diese Insertion tragen. Um die Plasmide zu erhalten, wurden die Vektoren pSVBX24H-HA-1AlaMi und pSVBX24H-HA-2AlaMi einem sequentiellen *PstI/SpeI*-Restriktionsverdau unterzogen. Die beiden entstandenen 662 bp-Fragmente wurden aus dem Gel aufgereinigt und in den ebenfalls durch *PstI* und *SpeI* geschnittenen Vektor pSV33H ligiert.

2.1.8.10 Konstrukte mit mehreren ausgetauschten Domänen**pSVBX24H-HA-DTM1/DTM2 (diese Arbeit)**

Das Konstrukt pSVBX24H-HA-DTM1/DTM2 trägt anstelle der ersten und zweiten Transmembrandomäne die homologen Sequenzen des DHBV. Die Positionen der entsprechenden Sequenzabschnitte im DHBV Genom sind bei den Plasmiden pSVBX24H-HA-DTM1 und pSVBX24H-HA-DTM2 angegeben. Zur Herstellung wurde der Vektor pSVBX24H-HA-DTM1 mit den Plasmiden *XbaI* und *PstI* geschnitten. Das erhaltene 230 bp Fragment wurde aus dem Gel aufgereinigt und in den ebenfalls *XbaI* und *PstI* behandelten Vektor pSVBX24H-HA-DTM2 ligiert.

pSVBX24H-DTM2/DCterm (diese Arbeit)

In diesem Konstrukt wurde sowohl die zweite Transmembrandomäne als auch der C-Terminus mit den homologen Sequenzen des DHBV ersetzt. Die Positionen der entsprechenden Sequenzabschnitte im DHBV-Genom sind bei den Plasmiden pSVBX24H-HA-DTM2 und pSVBX24H-DC-terminus angegeben. Zur Herstellung wurde mit Hilfe der Schnittstellen *SpeI*

und *EcoRV* ein 355 bp großes Fragment aus dem Vektor pSVBX24H-DCterminus geschnitten und in den *EcoRV/SpeI* behandelten Vektor pSVBX24H-HA-DTM2 ligiert.

pSVBX24H-HA-beta/DTM2 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid trägt anstelle der TM1 das Typ I Signal der β -Lactamase und anstelle des TM2 die homologe Sequenz des DHBV (bp 1518 – bp 1574; Sprengel *et al.*, 1985).

pSVBX24H-DTM1/DTM2/DCterm (diese Arbeit)

In diesem Konstrukt wurden die erste und zweite Transmembrandomäne sowie der C-Terminus mit den homologen Sequenzen des DHBV ersetzt. Die Positionen der entsprechenden Sequenzabschnitte im DHBV Genom sind bei den Plasmiden pSVBX24H-HA-DTM1, pSVBX24H-HA-DTM2 und pSVBX24H-HA-DC-terminus angegeben. Zur Herstellung des Konstrukts wurde der Vektor pSVBX24H-DC-terminus mit den Enzymen *EcoRV* und *SpeI* behandelt. Das erhaltene Fragment mit einer Größe von 355 bp wurde in den Vektor pSVBX24H-HA-DTM1/DTM2 eingefügt.

2.1.8.11 mCherry-S-Fusion mit dem Typ I Signal der β -Lactamase

pSVBX24HmCherry-Linker5-beta (diese Arbeit)

Das Plasmid pSVBX24HmCherry-Linker5 wurde im Rahmen der Masterarbeit von Maria Patra kloniert. Als Ausgangsplasmid diente pSVBX24H. Vor den offenen Leserahmen für das kleine Hüllprotein S wurde die kodierende Sequenz für das fluoreszierende mCherry-Protein kloniert und die Signal Sequenz des Rabies Virus. Zwischen der mCherry- und der S-Sequenz wurde zudem ein Linker von 22 Aminosäuren eingeführt (SLDPATSVDG GGGVDGGGGVEN). Als Produkt entstand ein sekretionskompetentes mCherry-S-Fusionsprotein. In dieser Arbeit wurden die beiden letzten Kodons des Linkers (AS E und N) so verändert, dass eine *NheI*-Schnittstelle entstand (pSVBX24HmCherry-Linker5-*NheI*). Über diese wurde anstelle der TM1 das Typ I Signal der β -Lactamase in die Sequenz für das kleine Hüllprotein eingeführt (pSVBX24HmCherry-Linker5-beta).

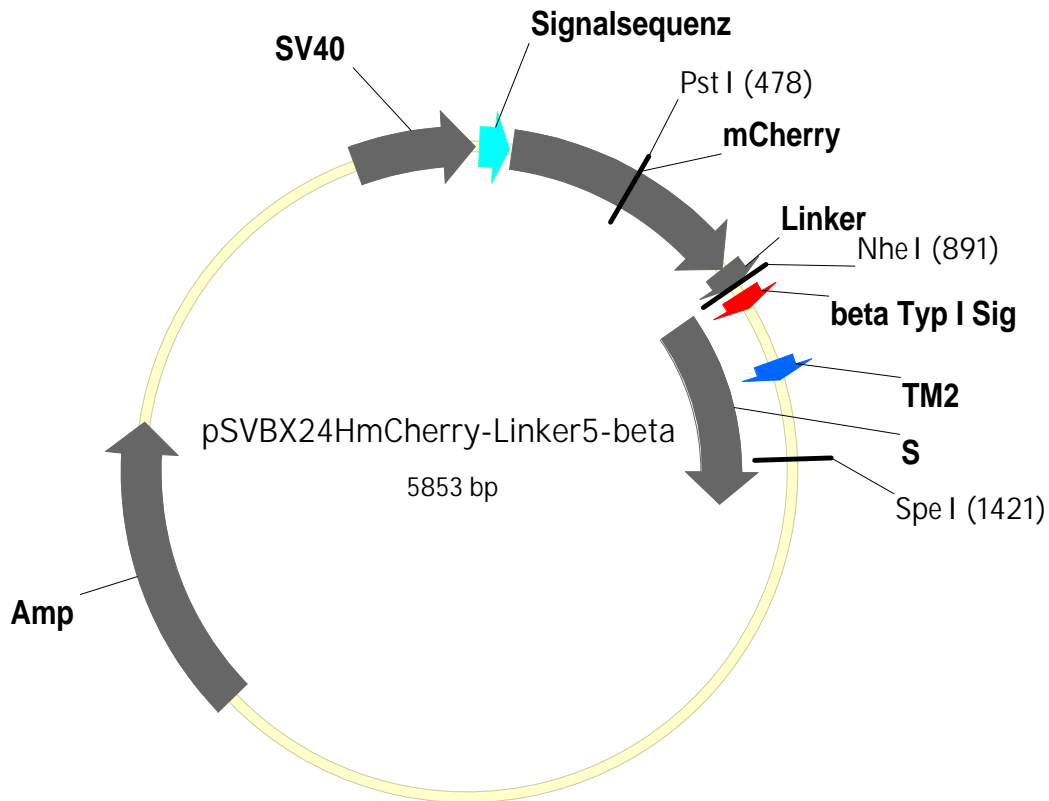


Abb. 12: Schematische Darstellung des Plasmids pSVBX24HmCherry-Linker5-beta (Masterarbeit Maria Patra).

2.1.9 Enzyme

2.1.9.1 Restriktionsendonukleasen

Name	Schnittstelle	Konzentration/Puffer	Hersteller, Standort
<i>EcoRI</i>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	10 U/μl, EcoRI-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EcoRV</i>	5'-GATATC-3' 3'-CTATAG-5'	10 U/μl, NEB3+BSA	New England Biolabs, Frankfurt
<i>MfeI</i>	5'-CAATTG-3' 3'-GTTAAC-5'	10 U/μl, NEB4	New England Biolabs, Frankfurt
<i>NheI</i> -HF	5'-GCTAGC-3' 3'-CGATCG-5'	20 U/μl, NEB4+BSA	New England Biolabs, Frankfurt
<i>PstI</i>	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'	20 U/μl, NEB3+BSA	New England Biolabs, Frankfurt
<i>SpeI</i>	5'-ACTAGT-3' 3'-TGATCA-5'	10 U/μl, NEB4+BSA	New England Biolabs, Frankfurt
<i>XbaI</i>	5'-TCTAGA-3' 3'-AGATCT-5'	20 U/μl, NEB4+BSA	New England Biolabs, Frankfurt

2.1.9.2 Sonstige Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller, Standort
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	10 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt
Polynukleotidkinase (PNK)	10 U/ μ l	Fermentas, St Leon-Rot
RNase A (100mg/ml)	7 U/ μ l	Qiagen, Hilden
T4 DNA Polymerase	5 U/ μ l	Fermentas, St Leon-Rot
T4 DNA Ligase	5 U/ μ l	Fermentas, St Leon-Rot

2.1.10 Antikörper und Konjugate

Primärantikörper	Beschreibung	Quelle	Verdünnung
HB1	Maus, mab, IgG; anti-HBsAg Epitop aa120-125	Bereitgestellt von Dieter Glebe, Gießen, Hergestellt von A. Zvirbliene, Riga, LV	WB 1:2000 IF 1:250

Sekundärantikörper	Beschreibung	Quelle	Verdünnung
Ziege-anti-Maus-PO	Ziege-anti-Maus, konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (PO)	DIANOVA, Hamburg	WB 1:3000
Ziege-anti-Maus-Alexa594	Ziege-anti-Maus IgG (H+L), konjugiert mit dem Fluoreszenz- farbstoff Alexa Fluor 594	Invitrogen, Darmstadt	IF 1:2000

2.1.11 Kommerzielle Kits

Kits	Hersteller, Standort
HBsAgV2 (AxSYM)	Abbott, Wiesbaden
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim
PCR Master	Roche, Mannheim
Promega PCR Master	Promega, Mannheim
Qiaquick Gel extraction Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Fisher PCR Master	Thermo Scientific, Dreieich
Transformer TM Site-Directed Mutagenesis Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Sterilisation

Flüssigmedien zur Anzucht von Bakterien und hitzestabile Lösungen wurden bei 121°C für 20 min und 1 bar Überdruck autoklaviert. Flüssigkeiten, die hitzeempfindlich waren, wurden sterilfiltriert (Sterilfilter MillexGP, 0,22 µm). Glaswaren wurden mittels Trockensterilisation bei 180°C für 3 h in einem Sterilisator keimfrei gemacht.

2.2.1.2 Kultivierung von *E. coli* Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte in Luria-Bertani-Vollmedium (LB) oder Terrific Broth (TB). Da die meisten verwendeten Plasmide das Gen für die β-Lactamase trugen, das den Bakterien eine Resistenz gegen Ampicillin ermöglichte, wurde den Medien das Antibiotikum in der Konzentration von 100 µg/ml bei Bedarf zugesetzt. Für die Anzucht des *mutS*-defizienten *E. coli* Stammes BMH 71-18 *mutS* wurde die Vorkultur mit 50 µg/µl Tetrazyclin versetzt, da dieser Stamm eine Tetrazyclin-Resistenz trug. Für Minipräparationen wurden 3 ml LB/Amp mit *E. coli* Bakterien angeimpft, für Maxipräparationen wurden 30 ml TB/Amp verwendet. Die Bakterien wurden bei 37°C mit 180 rpm ca. 19 h inkubiert.

2.2.1.3 Messung der Zelldichte

Die optische Dichte (OD) der Bakterienkulturen wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Smart SpecTM Plus, Biorad) bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt. Hierzu wurde die Kultur 1:10 mit dem verwendeten Medium in einer Einmalküvette verdünnt, um in den linearen Messbereich der optischen Dichte zu gelangen. Als Nullwert diente die OD_{578nm} des verwendeten Mediums.

2.2.1.4 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH10B

Um *E. coli* DH10B Zellen für die Aufnahme von DNA durch Elektroporation kompetent zu machen, müssen sie in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet werden. Zu diesem Zweck wurden 30 ml LB-Medium mit 2-3 µl eines bei -80°C gelagerten Bakterienliquots beimpft und über Nacht bei 180 rpm in einem 37°C warmen Bakterienschüttler inkubiert. Je 1,5 ml dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen zu 250 ml LB-Medium gegeben. Diese Kulturen wurden dann bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis sie bei einer Wellenlänge von 578 nm eine optische Dichte (OD₅₇₈) zwischen 0,6 und 1 erreicht hatten und wurden dann für 20 min auf

Eis gekühlt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 5000 rpm, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 250 ml eiskaltem H₂O resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Die beiden Schritte wurden wiederholt und das Pellet dann in 10 ml eiskaltem, 10 %-igem Glycerin aufgenommen und erneut pelletiert. Dieses Pellet wurde in 1,5 ml 10 %-igem Glycerin gelöst, in Aliquots von 55 µl aufgeteilt und die Zellen bei -80°C gelagert. Für eine Elektroporation wurden 25 µl elektrokompetente *E. coli* DH10B Zellen verwendet.

2.2.1.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* BMH 71-18 *mutS*

Die Zellen des *mutS*-defizienten *E. coli* Stammes BMH 71-18 *mutS* waren Teil des „TransformerTM Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Clontech). Die Elektrokompetenz wurde auch hier durch eine spezielle Behandlung erreicht. Da der Stamm eine Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyclin besaß, wurden 10 µl eines Bakterienaliquots auf einer LB-Agarplatte mit einer Tetrazyclinkonzentration von 50 µg/µl ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde dann eine Vorkultur von 5 ml LB-Medium mit Tetrazyclin (50 µg/µl) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. 1 ml der Übernachtskultur wurde am nächsten Tag zum Beimpfen von 150 ml LB-Medium verwendet. Da das Tetrazyclin das Wachstum der Bakterien beeinträchtigen könnte, wurde das Medium der Hauptkultur nicht damit versetzt. Dies führte nicht zu einem Verlust der Resistenz. Auf einem Bakterienrührer mit 220 rpm wurden die Kulturen bei 37°C inkubiert, bis sie eine OD₅₇₈ von 0,5 (± 0,03) erreicht hatten. Nachdem sie für 20 min auf Eis gekühlt wurden, pelletierte man die Bakterien bei 1200 g für 5 min. Die Zentrifugationsschritte wurden alle bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 100 ml 4°C-kaltem, sterilen 10 %-igem Glycerin resuspendiert und erneut für 20 min auf Eis gestellt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (1200 g, 10 min) wurden die Bakterien in 10 ml 10 %-igem Glycerin (4°C) aufgenommen und die Suspension für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden wie oben pelletiert (1200 g, 10 min), in 400 µl resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt. Diese wurden bei -80°C gelagert und pro Transformationsansatz wurde ein Aliquot verwendet.

2.2.2 Techniken zur Kultivierung der humanen Hepatomazelllinie Huh7

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ausschließlich humane Hepatomazellen (Huh7) verwendet (Nakabayashi *et al.*, 1982). Diese Zellen entstammen einem hepatozellulären Karzinom und sind nicht mit HBV infizierbar. Sie lassen sich aber durch transiente Transfektion für die Expression viraler Proteine verwenden.

2.2.2.1 Kultivierung von Huh7-Zellen

Die Kultivierung dieser in „Monolayern“ wachsenden, eukaryotischen Zelllinie erfolgte in 10 cm-Zellkulturschalen bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂. Als Zellkulturmedium wurde DMEM mit 10 % FKS und den angegebenen Zusätzen (2.1.4.2) verwendet. Bei einer Konfluenz von 80-100 % wurden die Zellen in einem Verhältnis zwischen 1:2 und 1:10 in neue 10 cm Schalen aufgeteilt. Hierzu wurde das alte Medium entfernt und die Zellen wurden mit 10 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Um die Zellen von der Kulturschale zu lösen, wurden die Zell-Zellverbindungen mit Hilfe der Protease Trypsin aufgebrochen. Dazu wurde 1 ml einer 1x Trypsinlösung (2.1.4.2) auf die Zellen gegeben, die Schale leicht geschwenkt und die Lösung verworfen. Nach 2-5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen entsprechend des gewünschten Teilungsverhältnisses in DMEM aufgenommen und auf neue Schalen mit 10 ml DMEM aufgeteilt.

2.2.2.2 Kryokonservierung und Lagerung von Huh7-Zellen

Eine längerfristige Lagerung von eukaryotischen Zellen ist in flüssigem Stickstoff möglich. Hierzu wurde von einer 100 % konfluenten 10 cm-Kulturschale das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Nachdem die Zellen wie bei der Kultivierung einem Trypsinierungsschritt unterzogen wurden, konnten sie mit 1,8 ml FKS abgespült und in ein Kryogefäß pipettiert werden. Die tropfenweise Zugabe von 10 % des Gefrierschutzmittels DMSO verhinderte die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses. In einem speziellen Einfriergefäß (Bio Freezing Vessel Bicell, Nikon Freezer Co. LTD) wurden die Zellen für 24 h bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.2.2.3 Rekultivierung von kryokonservierten Huh7-Zellen

Für die Rekultivierung von eingefrorenen Zellen, wurden die in Kryoröhrchen befindlichen Huh7 langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in Zellkulturmedium entsprechend des gewünschten Teilungsverhältnisses aufgenommen und in frische 10 cm-Schalen aufgeteilt.

2.2.2.4 Transiente Transfektion von Huh7-Zellen mit Fugene

Um das wildtypische S-Protein und die in dieser Arbeit hergestellten Mutanten in humanen Hepatomazelllinien zu exprimieren, wurden diese transient mit den entsprechenden Plasmiden (2.1.8) transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Fugene 6/HD/X-treme (Roche) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen von einer 10 cm-Schale mittels Trypsin abgelöst und je nach Zelldichte mit einem Teilungsverhältnis zwischen 1:15 und 1:20 in eine 6-well Platte aufgeteilt. Die Zellen waren am nächsten Tag ca. 80 % konfluent, was der vom Hersteller geforderten Dichte von 50-80 % entsprach. Um eine Vertiefung einer 6-well Platte zu transfizieren, wurde ein Transfektionsansatz von 50 µl angesetzt, während für eine 10 cm-Schale 100 µl verwendet wurden. Der Transfektionsansatz bestand aus Fugene und DNA in DMEM ohne Zusätze und diente der Bildung von membrangängigen Komplexen aus DNA und Fugene. Hierzu wurde zuerst das zusatzfreie DMEM in ein 1,5 ml- Reaktionsgefäß vorgelegt und die DNA zugegeben. Es wurde 1 µg DNA für die Transfektion von einem 6-well benötigt, während für die Transfektion einer 10 cm-Schale 2 µg DNA eingesetzt wurden. Wurde mehr als ein Plasmid für die Transfektion verwendet, wurde deren Anteil an der Gesamtmenge von 1 µg abhängig von ihrem Molekulargewicht berechnet. Für die Koexpression von Mutanten und Wildtyp wurden jeweils 0,5 µg DNA in die Transfektion eingesetzt, da beide Plasmide das gleiche Molekulargewicht hatten. Nach Mischen der Lösung wurden pro Ansatz 6 µl Fugene hinzugegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass das Fugene nicht unverdünnt mit der Wand des 1,5 ml-Reaktionsgefäßes in Kontakt kam. Der Ansatz wurde für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurde das alte Medium von den Zellen entfernt und jede Aussparung der 6-well Platte mit 2 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml zusatzfreiem DMEM pro Vertiefung, wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen pipettiert und leicht geschwenkt. Diese wurden dann für 6 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium mit dem Transfektionsreagenz entfernt, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und schließlich 2 ml DMEM + Zusätze in jede Vertiefung pipettiert.

2.2.2.5 Ernte von Zellkulturüberständen und Herstellung von Zellysaten

2.2.2.5.1 Zellyse mittels Detergenz

Zwei bis drei Tage nach der Transfektion wurde das Medium in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit 2 ml PBS pro Vertiefung gewaschen. Das Medium der transfizierten Zellen wurde bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert, um tote Zellen und

sonstige störende Schwebstoffe zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt ein Aliquot auf ein SDS-PAGE aufgetragen oder bei -20°C gelagert. Zur Freisetzung von intrazellulären S-Proteinen wurden zu den gewaschenen Zellen 500 µl eines detergentenhaltigen Lysispuffers (2.1.3) in jede Aussparung pipettiert und die Platte für 10 min auf Eis gelagert. Die lysierten Zellen wurden nach der 10-minütigen Inkubationszeit mit dem Lysispuffer abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Pelletieren von Membranfragmenten bei 13.000 rpm für 10 min wurde das Lysat geklärt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert oder direkt ein Aliquot elektrophoretisch aufgetrennt. Für den Nachweis von Dimeren, wurde dem Lysispuffer vor der Ernte und den Überständen vor der Zentrifugation 20 mM Iodacetamid zugesetzt.

2.2.2.5.2 Zelllyse mittels wiederholtem Einfrieren und Auftauen („freeze and thaw“)

Subvirale Partikel, die sich im Zytoplasma der Zelle befanden, wurden durch das Detergenz im Lysispuffer zerstört und konnten später nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden einige Ansätze durch schnelles, wiederholtes Auftauen und Einfrieren lysiert. Hierzu wurde das Medium wie bei der Lyse geerntet (2.2.2.5.1). Die Zellen wurden mit 2 ml PBS gewaschen und mit 500 µl PBS durch kräftiges Pipettieren abgelöst und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgenommen. Nach 10-minütiger Lagerung auf Eis wurden die Zellen für 30 min bei -80°C eingefroren und für 2 min bei 37°C aufgetaut. Danach folgten drei Zyklen von 15 min bei -80°C und 2 min bei 37°C. Zur Klärung des Zellinhalts wurden die Ansätze bei 13.000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert und die Überstände in ein neues Gefäß überführt. Lysate und Überstände wurden zur Analyse auf ein 1 %-iges natives Agarosegel aufgetragen und S-Proteine mittels Western Blot detektiert (2.2.5.6).

2.2.3 Klonierungstechniken

2.2.3.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase Ketten Reaktionen eingesetzt. In dem verwendeten kommerziellen Master Mix waren die *Taq*-Polymerase und dNTPs enthalten, so dass nur noch die Oligonukleotide und die Matrizen-DNA zugegeben werden mussten.

2.2.3.1.1 Herstellung überlappender DNA-Fragmente mit Hilfe von PCR (PCR1 und 2)

In einigen S-Mutanten sollte eine Transmembrandomäne vollständig durch eine fremde Sequenz ersetzt werden. Für die Herstellung dieser Chimären wurden je zwei spezielle Oligonukleotide konstruiert, die in ihren 5'-Regionen jeweils knapp über die Hälfte der Fremdsequenz trugen, in ihren 3'-Bereichen dagegen die an die Transmembrandomäne anschließende HBV-Sequenz. Die Fremdsequenzabschnitte überlappten in beiden Primern an 12-15 Nukleotiden (Abb. 13). Diese Oligonukleotide wurden dann in je eine PCR eingesetzt und mit passenden Gegenprimern kombiniert (PCR1 und 2). Die Gegenprimer wurden so gewählt, dass die entstehenden Fragmente passende Restriktionsschnittstellen (RS) des verwendeten Klonierungsvektors enthielten. Beide PCRs lieferten zwei überlappende chimäre DNA-Stücke, die in einer dritten PCR mit Hilfe der äußeren Gegenprimer zu einem Stück fusioniert wurden.

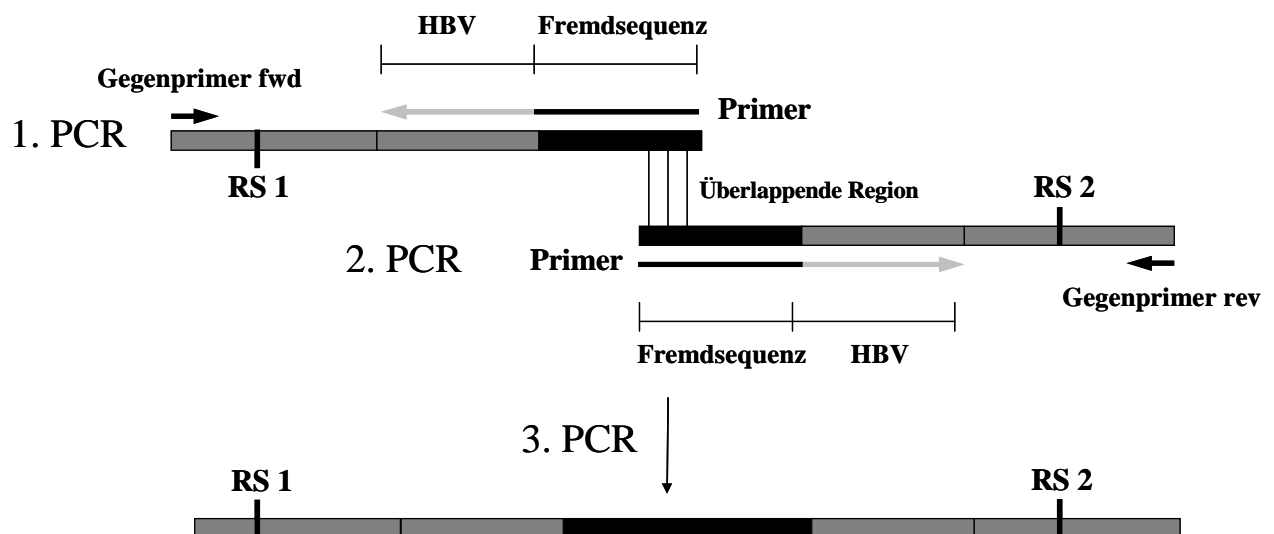


Abb. 13: Schematische Darstellung zur Herstellung überlappender DNA-Fragmente mit Hilfe von PCR. RS1 und RS2 bezeichnen die Restriktionsschnittstellen.

Das Pipettierschema sowie das PCR-Programm für die Herstellung der überlappenden Fragmente sind unten angegeben. Als Matrizen-DNA diente 1 µl einer 1:100 Verdünnung des gewünschten Klonierungsvektors. Es wurde ein 10x MasterMix der Firma Thermo Scientific verwendet, der dNTPs sowie eine *Taq*-Polymerase und Puffer mit MgCl₂ enthielt. Von den Oligonukleotiden wurden 0,5 µl einer 100 µM Lösung verwendet. Die Zeit für den 72°C

Elongationsschritt variierte zwischen 45 s und 2 min je nach Länge des synthetisierten Fragments. Welche Oligonukleotide und Vektoren für die Konstruktion der einzelnen Mutanten genau verwendet wurden, ist in Abschnitt 2.2.3.14 angegeben.

Pipettierschema PCR 1

Chimärer Rückwärtsprimer (100 µM)	0,5 µl
Gegenprimer fwd (100 µM)	0,5 µl
Matrizen-DNA 1:100	1 µl
10x Master Mix	45 µl
H ₂ O	3 µl
	50 µl

Programm

95°C	5 min	
95°C	30 s	25 Zyklen
55°C	1 min	
72°C	45 s	
72°C	7 min	
		→ 4°C

Pipettierschema PCR 2

Chimärer Vorwärtsprimer (100 µM)	0,5 µl
Gegenprimer rev (100 µM)	0,5 µl
DNA, Master Mix und H ₂ O	s. PCR 1
	50 µl

Die entstandenen DNA-Fragmente wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel bezüglich ihrer Größe kontrolliert und mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aufgereinigt (2.2.3.3). Die Fragmente aus PCR1 und 2 dienten als Matrizen-DNA in PCR 3.

2.2.3.1.2 Fusion überlappender DNA-Fragmente mit Hilfe von PCR 3

Um die beiden teilweise überlappenden PCR-Fragmente zu einem großen DNA-Stück zu fusionieren, wurde eine dritte PCR durchgeführt. In diesen Ansatz wurden als Matrizen-DNA die beiden überlappenden Fragmente aus der 1. und 2. PCR eingesetzt. Als Primer wurden die beiden Gegenprimer verwendet. Das Pipettierschema, sowie das PCR-Programm sind unten angegeben.

Pipettierschema PCR 3

Fragment 1	1 µl
Fragment 2	1 µl
Gegenprimer rev	0,5 µl
Gegenprimer fwd	0,5 µl
10x Master Mix	45 µl
H ₂ O	2 µl
	50 µl

Programm

95°C	5 min	
95°C	30 s	25 Zyklen
55°C	1 min	
72°C	1,5 min	
72°C	7 min	
		→ 4°C

Für die Weiterverwendung in Restriktionsverdau wurde das erhaltene Fragment auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ aus dem Gel isoliert.

2.2.3.1.3 Megaprimer-PCR

Waren die auszutauschenden Bereiche zu lang, um sie mittels überlappender Fragmente zu amplifizieren, wurde eine Megaprimer-PCR eingesetzt. Als Megaprimer diente ein doppelsträngiges DNA-Fragment, das an Stelle eines normalen Oligonukleotids in eine PCR eingesetzt wurde. Der Megaprimer selbst wurde ebenfalls über eine PCR amplifiziert. Da der Megaprimer in dieser Arbeit zur Einführung einer fremden Sequenz in das S-Gen verwendet werden sollte, wurden die Primer für seine Herstellung speziell konstruiert. Sie trugen Teile der Fremdsequenz, die von unveränderten HBV-Sequenzen flankiert waren, die komplementär zur Plasmidsequenz der Ziel-DNA waren und über die der Megaprimer binden konnte. Der Megaprimer war somit ein chimäres DNA-Fragment aus HBV- und Fremdsequenzen.

Pipettierschema Herstellung Megaprimer

Pipettierschema Herstellung Megaprimer		Programm		
Primer rev (100 µM)	0,5 µl	95°C	5 min	25 Zyklen
Primer fwd (100 µM)	0,5 µl	95°C	30 s	
Matrizen-DNA 1:20 (~25 ng)	1 µl	55°C	1 min	
10x Master Mix	45 µl	72°C	1 min	
H ₂ O	3 µl	72°C	7 min	
	<u>50 µl</u>	→ 4°C		

Pipettierschema Megaprimer 2

Pipettierschema Megaprimer 2		Programm		
dsMegaprimer	7 µl	96°C	7 min	35 Zyklen
Gegenprimer rev (100 µM)	1 µl	96°C	1 min	
Matrizen-DNA (~2 µg)	2 µl	60°C	2 min	
10x Master Mix	90 µl	72°C	2 min	
	<u>100 µl</u>	72°C	7 min	
		→ 4°C		

Der Megaprimer wurde mittels Gelextraktion (2.2.3.3) aus dem Gel aufgereinigt und in großer Menge in eine neue PCR eingesetzt. Da der Megaprimer doppelsträngig war und deshalb nach dem Denaturierungsschritt wieder mit sich selbst paaren konnte, anstatt an die Matrizen-DNA zu binden, wurde die Matrizen-DNA in großem Überschuss zugegeben (~2 µg). Als Matrizen-

DNA diente das Plasmid, in das die neue Sequenz eingeführt werden sollte und an das der Megaprimer über die flankierenden HBV-Sequenzen binden konnte. Das Pipettierschema und das PCR-Programm sind oben angegeben.

2.2.3.1.4 Herstellung des Plasmids pSVBX24H-DC-Terminus mit der Megaprimer-PCR

Zum Austausch des kompletten C-terminus wurde eine Megaprimer-PCR eingesetzt. Um den Megaprimer herzustellen, wurde eine PCR mit den beiden Primern C-Terminus-fwd und C-Terminus-rev auf dem Plasmid pSV17D durchgeführt, das die DHBV-S-Sequenz trägt. Die beiden Primer waren so konstruiert, dass sie in ihrem 5'-Bereich die an den C-Terminus anschließenden HBV-Sequenzen trugen und in ihrem 3'-Bereich die Enden des DHBV C-Terminus. Das resultierende 129 bp Fragment trug damit die gesamte C-Terminus Sequenz des DHBV-S-Proteins flankiert mit HBV-Sequenzen und wurde als Megaprimer verwendet. Dieser wurde in eine zweite PCR eingesetzt.

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA	Fragment PCR 1
pSVBX24H-DC-terminus	fwd C-terminus-fwd rev C-terminus-rev	pSV17D	129 bp (+ 49 bpÜberhang)
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd Megaprimer rev VBJN4	pSVBX24H	457 bp

Die eingesetzten Mengen sowie das verwendete PCR Programm sind in Absatz 2.2.3.1.3 zu finden. Das PCR-Fragment aus der Megaprimer-PCR wurde mit den Restriktionsendonuklease *SpeI* und *EcoRV* geschnitten und erneut über ein Gel aufgereinigt. Als Vektor diente das Plasmid pSVBX24H-HA, das ebenfalls mit den beiden Enzymen *SpeI* und *EcoRV* behandelt, dephosphoryliert und aus einem 1 %-igen Agarosegel mittels „Qiaquick Gel Extraction Kit“ extrahiert wurde. Die Ligation und Transformation erfolgte wie in 2.2.3.6-11 angegeben.

2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese für DNA

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA Fragmente in einer Agarosegelmatrix aufgrund ihrer negativen Ladung durch Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Länge auftrennen. Da kleinere Stücke leichter durch die Hohlräume des Gels gelangen, laufen kürzere Stücke weiter als längere.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Restriktionsverdau oder PCRs wurde die DNA auf 1 %-ige Agarosegele aufgetragen, die mit Ethidiumbromid versetzt wurden. Zur Herstellung eines 1 %-igen Gels wurde je nach Größe der verwendeten Gießkammer 1 g bzw. 0,5 g Agarose abgewogen und mit 100 ml bzw. 50 ml 1x TAE-Puffer (2.1.3) gemischt. Durch Aufkochen der Mischung für 2-3 min in einer Mikrowelle wurde die Agarose gelöst. Nach Zugabe von 5 μ l bzw. 2,5 μ l 1 %-iger Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) wurde das Gemisch in die mit einem Kamm versehene Gießkammer eingefüllt und zum Abkühlen für ca. 30 min stehen gelassen. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Laufkammer gelegt, die mit 1x TAE-Puffer befüllt war. Die DNA-Proben wurden zuerst mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x, 2.1.3) und dann in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard dienten für längere Fragmente λ -DNA (0,75 μ g/Gelspur), die durch das Restriktionsenzym *BstEII* gespalten wurde. Für kleinere DNA Stücke wurde dagegen der GeneRuler 100 bp-Marker verwendet (2.1.6.1). Mit einer Spannung von 90 V wurden die Proben für 1-2 h elektrophoretisch separiert. Die GELDokumentation erfolgte über ein Gel-Dokumentationssystem der Firma Biorad mittels UV-Licht der Wellenlänge 302 nm.

2.2.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ von Qiagen

Um Fragmente eines Restriktionsverdau oder PCR-Produkte aus Agarosegelen aufzureinigen, wurde der Ansatz vollständig auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem das Bandenmuster der DNA-Fragmente mit Hilfe der GELDokumentationsanlage fotografiert worden war, konnte das gewünschte DNA-Stück mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch ausgeschnitten werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Exposition mit dem UV-Licht so kurz wie möglich war. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben. Dazu wurde das Gelstück gewogen und pro 100 mg Gel 300 μ l QG-Puffer zu dem Gelfragment pipettiert. Um das Gel zu schmelzen, wurde dieser Ansatz für ca. 10 min in einem Thermoblock auf 50°C erwärmt und mehrmals durchmischt. Nach Zugabe von 10 μ l 5 M Na-Acetat und einem Gelvolumen Isopropanol wurde die Probe gemischt und auf eines der Säulchen mit Auffangbehälter pipettiert. Das Binden der DNA an die Säulenmatrix erfolgte durch eine Zentrifugation von 1 min bei 13.000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 μ l QG-Puffer auf die Säule gegeben, um überschüssige Agarosereste zu entfernen. Nach einer erneuten Zentrifugation (1 min bei 13.000 rpm) wurde die Säule zwei Mal mit 750 μ l PE-Puffer gewaschen und 1 min bei 13.000 rpm trocken gelegt. Die Elution der DNA erfolgte durch 30 μ l H₂O, die 1 min bei

Raumtemperatur auf der Säule inkubiert wurden und schließlich mittels Zentrifugation (1 min bei 13.000 rpm) die DNA aus der Säulenmatrix lösten. Die DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR-Produkten

Für den Verdau von Plasmiden und PCR-Produkten durch Restriktionsendonukleasen wurden je nach Art des Verdaus unterschiedliche Mengen an DNA und Enzym eingesetzt. Für einen präparativen Verdau von Plasmiden wurde in einen 50 µl-Ansatz 1,5 -2 µg DNA eingesetzt, die mit 40 U Enzym mit seinem entsprechenden Puffer verdaut wurden (2.1.9.1). Je nach Angabe des Herstellers wurde dem Ansatz auch 1x BSA beigemischt. Für den präparativen Restriktionsverdau eines PCR-Produkts wurden dagegen die gesamten 30 µl aus der Gelextraktion eingesetzt und mit 40 U des Enzyms mit seinem passenden Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl verdaut. Wurden Minipräparationen einem Kontrollverdau unterzogen, wurden je nach Größe des DNA-Pellets 3-5 µl DNA (~0,7 µg/µl) eingesetzt, die mit 10 U des geeigneten Enzyms in einem 20 µl-Ansatz verdaut wurden. Kontrollverdaus wurden bei 37°C für 1 h inkubiert und dann vollständig auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Präparative Verdaus von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgten für 2 h bei 37°C. Konnten bei einem Doppelverdau die Enzyme nicht miteinander kombiniert werden, folgte zwischen den Einzelverdaus eine Ethanol-Fällung. Nach der Inkubation wurde der gesamte Ansatz auf ein 1 %-iges Agarosegel gegeben und nach elektrophoretischer Auftrennung die gewünscht Bande mit dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“ aus dem Gel isoliert.

2.2.3.5 Dephosphorylierung

Da es häufiger vorkam, dass in der Ligation der Vektor ohne Insertion des gewünschten DNA-Stücks mit sich selbst religierte, wurde parallel zum präparativen Restriktionsverdau eine Dephosphorylierung des Vektors durchgeführt. Hierzu wurden 20 U der „Calf Intestine Phosphatase“ (CIP) von Beginn an in den Restriktionsverdau des Plasmids eingesetzt, da das Enzym mit den Puffern der Restriktionsenzyme kompatibel war.

2.2.3.6 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmiden, die durch Endonukleasen spezifisch gespalten und gegebenenfalls dephosphoryliert wurden, verwendete man die T4 DNA-Ligase. Ein 20 µl- Ligationsansatz beinhaltete 2 µl des 10x Ligase-Puffers, 5 -7 µl des spezifisch

geschnittenen DNA-Fragments, 0,5-1 µl des geschnittenen Vektors und 5 U der T4 DNA-Ligase. Die Menge der eingesetzten DNA wurde abhängig von der Stärke der Bande im Ethidiumbromidgel abgeschätzt. Als Kontrolle, ob der Vektor ohne Einbau des Inserts religieren konnte, wurde ein Ansatz ohne DNA-Fragment angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 22°C für 1 h. Danach wurde die Ligation mit Ethanol gefällt.

2.2.3.7 Ethanolfällung von DNA

Um die Ligation frei von Salzen zu bekommen, wurde nach der Inkubationszeit eine Ethanolfällung durchgeführt. 2 Volumeneinheiten 99 %-iger Ethanol sowie 1/10 Volumeneinheit 3 M Na-Acetat (pH 5,2) wurden zu dem Ligationsansatz pipettiert. Bei geringen Mengen DNA wurde dem Fällungsansatz 0,5 µl Glykogen (20 mg/ml) zugesetzt. Die Probe wurde für 30 min bei -80°C inkubiert. Alternativ konnte die Probe auch über Nacht bei -20°C gelagert werden. Die DNA aus dem gekühlten Fällungsansatz wurde dann bei 13.000 rpm für 30 min bei 4°C gefällt, das Pellet mit 3 Volumeneinheiten 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das milchig-weiße DNA-Pellet wurde dann bei Raumtemperatur getrocknet und in H₂O aufgenommen. Bei einer Ligation wurde die DNA in 10 µl H₂O gelöst.

2.2.3.8 Transformation elektrokompenter *E. coli* DH10B durch Elektroporation

E. coli Bakterien besitzen keine natürliche Kompetenz, d.h. sie nehmen nicht freiwillig DNA-Fragmente aus der Umgebung auf. Um dennoch DNA z.B. Plasmide in Zellen einzuschleusen, wurden ihre Zellmembranen mittels eines elektrischen Stromstoßes durchlässig gemacht. Diese Methode bezeichnet man als Elektroporation und die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle als Transformation.

Für die Transformation von *E. coli* DH10B wurden 25 µl der elektrokompenten Bakterien mit 5 µl des gefällten Ligationsansatzes gemischt und in eine Elektroporationsküvette (0,1 cm Spaltbreite, Biorad) gegeben. Für die Retransformation eines Plasmids wurde 1 µl einer 1:100.000 oder 1:10.000 Verdünnung zu den Bakterien pipettiert. Mit Hilfe eines Elektroporators wurden die Küvetten für 4,7-5,3 ms mit 1,8 kV einem elektrischen Feld ausgesetzt und die transformierten Zellen danach in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C auf einem Thermoschüttler bei 450 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 1 min bei 6000 rpm pelletiert, 900 µl des Überstandes verworfen und die Bakterien in den restlichen 100 µl resuspendiert. Der gesamte Ansatz wurde dann auf LB/Amp Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert.

2.2.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen analytischen Maßstab („Minipräparation“)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen analytischen Maßstab wurden 3 ml LB-Medium mit Ampicillin versetzt (Endkonzentration: 100 µg/ml). Diese Lösung wurde dann mit einer *E.coli* Einzelkolonie aus einer Ligation oder Retransformation durch Übertragung von einer Agarplatte beimpft und für 18 h bei 180 rpm in einem Bakterien-schüttler bei 37°C kultiviert. Nach 18 h wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 5 min bei 9000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Nach Lösen des Bakterienpellets in 100 µl Puffer I (2.1.3) wurden für die alkalische Lyse der Membranen 200 µl frisch angesetzter Puffer II zur Lösung gegeben, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Fällen der Proteine und der chromosomalen DNA wurde das Lysat durch Zugabe von 150 µl Puffer III neutralisiert und nach leichtem Schütteln für 5 min auf Eis gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde mit 450 µl (1 Volumeneinheit) Isopropanol versetzt, kräftig geschüttelt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nachfolgende Fällung der Plasmid-DNA wurde bei 13.000 rpm für 30 min bei 15°C durchgeführt. Das milchig-weiße DNA-Pellet wurde nach Entfernen des Isopropanols mit 70% Ethanol gewaschen (15 min, 13.000 rpm, 4°C) und getrocknet. Nach Lösen des Pellets in 30 µl H₂O wurde die DNA bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.10 Isolierung von Plasmid-DNA im großen analytischen Maßstab („Maxipräparation“)

Um größere Mengen von Plasmid-DNA für die Transfektion von eukaryotischen Zellen zu erhalten, wurde von den meisten hergestellten Konstrukten eine Maxipräparation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 30 ml TB/Amp (Endkonzentration: 100µg/ml) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 3 µl der entsprechenden „Minipräparation“ oder einer Einzelkolonie beimpft und für 18 h bei 180 rpm und 37°C in einem Bakterien-schüttler inkubiert. Diese *E.coli*-Übernachtskultur wurde bei 4000 rpm für 15 min pelletiert und das Bakterienpellet in 5 ml Puffer I resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 10 ml frisch angesetztem Puffer II und 5-10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Homolog zur Minipräparation schloss sich daran die Neutralisation der Lösung mittels Zugabe von 7,5 ml Puffer III und die Inkubation auf Eis (5 min) an. Um die ausgefallenen Proteine und die genomische DNA zu entfernen, wurde die Präparation zwei Mal bei 4000 rpm für 15 min

zentrifugiert und jeweils der Überstand in ein neues 50 ml-Falcongefäß überführt. Der erste Fällungsschritt der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,6 Volumeneinheiten Isopropanol (13,5 ml). Nachdem die Probe kräftig geschüttelt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und herabzentrifugiert wurde (15 min, 4000 rpm, 4°C), konnte das getrocknete DNA-Pellet in 3 ml TE-Puffer (2.1.3) aufgenommen werden. Um nun die RNA aus der Lösung zu entfernen, wurde diese mit 3 ml -20°C-kaltem 5 M Lithium-Chlorid gefällt (15 min, 4000 rpm, 4°C). Der DNA-haltige Überstand wurde dann in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 6 ml Isopropanol versetzt und kräftig geschüttelt. Das Pellet, das aus dem anschließenden Zentrifugationsschritt (15 min, 4000 rpm, 4°C) resultierte, wurde in 500 µl TE-Puffer gelöst. Durch Zugabe von 1 µl RNase (7 U/µl) mit anschließender 30-minütiger Ruhezeit bei Raumtemperatur wurde die restliche RNA in der Probe verdaut. Um die DNA zu pelletieren, versetzte man den RNase-Verdau mit gleichem Volumen einer 13 % PEG/1,6 M NaCl Lösung, durchmischte diesen Ansatz kräftig und zentrifugierte bei 13.000 rpm für 15 min. Das DNA-Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer gelöst und einer Phenol-Chloroform Extraktion unterzogen.

2.2.3.11 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA

Hierfür versetzte man die Probe mit dem gleichen Volumen einer Phenol/Cloroform/Isoamylalkohol Lösung (25:24:1) und durchmischte kräftig mit Hilfe eines Vortexgerätes. Um die wässrige, DNA-haltige Phase von der organischen Phase zu trennen, wurden die Proben für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die DNA enthielt, wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die proteinhaltige Interphase und die organische untere Phase wurden hingegen verworfen. Diese Extraktionsschritte wurden drei Mal wiederholt und anschließend die DNA mit Hilfe einer Ethanol-Fällung (2.2.3.7) aus der Lösung pelletiert. Das getrocknete Pellet wurde in 200-300 µl H₂O aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.12 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) besitzen, lässt sich die Konzentration von DNA-Lösungen in einer Quarzküvette mit Hilfe eines Photometers bestimmen. Hierbei entspricht eine A_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Bestimmung der DNA-Menge in Plasmid-Präparationen wurden die Proben 1:100 in Wasser verdünnt, in eine Quarzküvette gegeben und die

Absorption bei 260 nm bestimmt. Als Nullwert diente Wasser. Das Absorptionsmaximum für Proteine hingegen liegt, basierend auf der Absorption von aromatischen Aminosäureresten, bei 280 nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses von A_{260}/A_{280} kann angezeigt werden, wie stark eine DNA-Lösung noch durch Proteinreste verunreinigt ist. Eine hochreine DNA sollte Werte zwischen 1,8 und 2 erreichen. Die analytischen Präparationen von Plasmid-DNA in dieser Arbeit wiesen eine Konzentration von 1-3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,5-1,9 auf.

2.2.3.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde extern von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Für die 20 μl -Sequenzierreaktion wurden Minipräparationen 1:4 und Maxipräparationen 1:10 in Wasser verdünnt. Die Proben wurden abends von einem Kurierdienst abgeholt und die Sequenzen konnten am nächsten Tag online heruntergeladen werden (www.gatc-biotech.com). Der Abgleich der Sequenzen mit dem Ausgangsplasmid erfolgte mit dem kostenlosen Online-Werkzeug ClustlW2 des EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

2.2.3.14 Herstellung der mutierten S-Konstrukte mit Hilfe überlappender PCR-Fragmente

Um Mutationen in das S-Protein einzuführen oder die Transmembrandomänen vollständig durch eine fremde Sequenz zu ersetzen, wurde bei den im folgenden aufgeführten Mutanten die Fusion überlappender PCR-Fragmente angewandt. In den jeweiligen Tabellen sind die verwendeten Oligonukleotide für die Herstellung und Fusion der überlappenden Fragmente, sowie die Fragmentgröße und die eingesetzte Matrizen-DNA angegeben. Das PCR-Programm entsprach den Angaben in 2.2.3.1.1/2. Die Produkte aus PCR1 und PCR2 wurden auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen, mittels Gelextraktion aufgereinigt (2.2.3.3) und in PCR 3 fusioniert. Das Fusionsfragment wurde dann ebenfalls auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen, nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel extrahiert und durch Restriktionsendonukleasen geschnitten. Welche Enzyme für die Klonierung verwendet wurden, ist bei den einzelnen Mutanten angegeben. Die Ligation der Fragmente und die anschließende Transformation in *E. coli* DH10B erfolgte wie in 2.2.3.6-8 angegeben.

2.2.3.14.1 Einführung des HA-Epitops in den Vektor pSVBX24H

pSVBX24H-HA

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA 1:50	Fragment PCR 1
pSVBX24H-HA	fwd VBVS17 rev VBJN4	pSVBX24H	345 bp
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd VBJN1 rev VBVS18	pSVBX24H	324 bp
	Primer PCR 3		Fragment PCR 3
	fwd VBJN1 rev VBJN4	Fragment 1 + 2	694 bp

Das 694 bp große DNA-Fragment der PCR 3 sowie der Vektor pSVBX24H wurden mittels der Schnittstellen *EcoRV* und *SpeI* verdaut.

2.2.3.14.2 Herstellung der chimären Konstrukte der TM1 und TM2

pSVBX24H-HA-DTM1 und pSVBX24H-HA-beta

Die Konstruktion der beiden Vektoren folgte dem gleichen Verfahren und wird deshalb hier in einem Punkt behandelt.

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA	Fragment PCR 1
pSVBX24H-HA-DTM1	fwd TM1fwd rev revKlonierung2	pSVBX24H-HA	339 bp (+30 bp Überhang)
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd Klonierungfwd rev TM1rev	pSVBX24H-HA	573 bp (+33 bp Überhang)
	Primer PCR 3		Fragment PCR 3
	fwd Klonierungfwd rev Klonierungrev2	Fragment 1 + 2	960 bp

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA	Fragment PCR 1
pSVBX24H-HA-beta	fwd betalacfwd rev revKlonierung2	pSVBX24H-HA	339 bp (+30 bp Überhang)
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd Klonierungfwd rev betalacrev	pSVBX24H-HA	573 bp (+33 bp Überhang)

Plasmid	Primer PCR 3	Matrizen-DNA	Fragment PCR 3
pSVBX24H-HA-beta	fwd Klonierungfwd rev Klonierungrev2	Fragment 1 + 2	960 bp

Das 960 bp Fragment aus PCR 3 sowie der Vektor pSVBX24H-HA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Spe*I geschnitten.

pSVBX24H-HA-DTM2 und pSVBX24H-HA-Transferrin

Die Herstellung der beiden Vektoren erfolgte auf gleiche Art und Weise und wird deshalb hier in einem Punkt behandelt.

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA	Fragment PCR 1
pSVBX24H-HA-DTM2	fwd TM2fwd rev revKlonierung2	pSVBX24H-HA	348 bp (+35 bp Überhang)
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd Klonierungfwd rev TM2rev	pSVBX24H-HA	555 bp (+37 bp Überhang)
	Primer PCR 3	Matrizen-DNA	Fragment PCR 3
	fwd Klonierungfwd rev Klonierungrev2	Fragment 1 + 2	960 bp

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA	Fragment PCR 1
pSVBX24H-HA-Trans	fwd Transferrinfwd rev revKlonierung2	pSVBX24H-HA	348 bp (+35 bp Überhang)
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd Klonierungfwd rev Transferrinrev	pSVBX24H-HA	555 bp (+37 bp Überhang)
	Primer PCR 3		Fragment PCR 3
	fwd Klonierungfwd rev Klonierungrev2	Fragment 1 + 2	960 bp

Das 960 bp-Fragment aus PCR 3 sowie der Vektor pSVBX24H-HA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Spe*I geschnitten.

pSVBX24H-HA-beta/DTM2

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA	Fragment PCR 1
pSVBX24H-HA-beta/DTM2	fwd TM2fwd rev revKlonierung2	pSVBX24H-HA-beta	348 bp (+35 bp Überhang)
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd Klonierungfwd rev TM2rev	pSVBX24H-HA-beta	555 bp (+37 bp Überhang)
	Primer PCR 3		Fragment PCR 3
	fwd Klonierungfwd rev Klonierungrev2	Fragment 1 + 2	960 bp

Das Fragment aus PCR 3 sowie der Vektor pSVBX24H-HA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *SpeI* behandelt.

2.2.3.14.3 Herstellung des mCherry-S-Fusionsproteins mit dem Typ I Signal der β -Lactamase

pSVBX24HmCherry-Linker5-beta

Plasmid	Primer PCR 1	Matrizen-DNA	Fragment PCR 1
pSVBX24HmCherry-Linker5-beta	fwd KlonierNhefwd rev FusMutNheIrev	pSVBX24HmCherry-Linker5	542 bp
	Primer PCR 2		Fragment PCR 2
	fwd FusMutNheneu rev Fusionrev	pSVBX24HmCherry-Linker5	665 bp
	Primer PCR 3		Fragment PCR 3
	fwd KlonierNhefwd rev Fusionrev	Fragment 1 + 2	1173 bp
	Primer PCR	Matrizen-DNA	Fragment
Insert mit Signal I der β -Lactamase und <i>NheI</i> Schnittstelle	fwd betaFusionfwd rev Fusionrev	pSVBX24H-HA-beta	530 bp

Zur Einführung einer für die Klonierung verwendeten *NheI*-Schnittstelle wurden die drei PCRs mit überlappenden Fragmenten verwendet. Das Produkt aus PCR 3 sowie das Plasmid pSVBX24HmCherry-Linker5 wurden dann mit den Restriktionsendonuklease *PstI* und *SpeI* sequentiell verdaut und die beiden DNA-Fragmente ligiert. Die aus der Transformation entstanden Klone wurden mittels Minipräparation vermehrt und mit dem Enzym *NheI* einem Kontrollverdau unterzogen. Ein positiver Klon wurden sequenziert und eine Maxipräparation hergestellt. Dieses Konstrukt pSVBX24HmCherry-Linker5-*NheI* diene als Ausgangsplasmid,

um das Typ I Signal der β -Lactamase in das Fusionsprotein einzuführen. Das Plasmid sowie das über PCR amplifizierte Insert wurden mit *NheI* und *SpeI* verdaut, über ein Agarosegel aufgereinigt und ligiert.

2.2.4 Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe des „Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Clontech)

Um Punktmutationen oder Insertionen in die Sequenz des kleinen Hüllproteins einzuführen, wurde das „Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Clontech nach Herstellerangaben verwendet. Bei diesem kommerziellen Kit erfolgen die Einführung der Mutation und die darauffolgende Selektion über zwei unterschiedliche Oligonukleotide. Das Mutationsoligonukleotid trägt die Punktmutation oder Nukleotidinsertion an der gewünschten Stelle. Der Selektionsprimer dagegen wandelt eine vorhandene Einzelschnittstelle auf dem Plasmid in eine zuvor nicht vorhandene Einzelschnittstelle um oder deletiert diese vollständig. Nachdem die beiden Stränge des Plasmids, das die Mutation später tragen soll, durch einen Denaturierungsschritt voneinander getrennt wurden, können die beiden Primer an ihrer passenden Stelle binden. Im nachfolgenden Elongationsschritt kann die T4 DNA-Polymerase die einzelsträngigen Bereiche des Plasmids zwischen den Primern zu einem Doppelstrang vervollständigen. Das entstandene Plasmid ist nun an den Bindungsstellen der beiden Primer ein Hybrid aus alter und neuer Sequenz. Eine T4 DNA-Ligase verbindet die benachbarten 5`-Enden und 3`-Enden der Einzelfragmente über eine Phosphodiesterbindung miteinander und vervollständigt so das Hybridplasmid. Durch einen selektiven Restriktionsverdau, der die „alte“ Schnittstelle verwendet, werden die parentalen, nicht mutierten Plasmide im Gegensatz zu den neuen Hybridplasmiden linearisiert und können somit nicht in Bakterien amplifiziert werden. Die Hybridplasmide werden dann in einen speziellen *mutS*-defizienten *E. coli* Stamm, BMH 71-18 *mutS*, transformiert, der keine Fehlpaarungsreparatur durchführen kann. Dies hat zur Folge, dass die Hybridplasmide entweder in Richtung des Parentalplasmids oder des mutierten Plasmids verdoppelt werden. In einer Zelle befinden sich somit am Ende sowohl mutierte als auch parentale Plasmide. Nach der Extraktion und Präparation der Plasmide aus den *E. coli*-Zellen mit Hilfe der Minipräparation folgt ein zweiter selektiver Restriktionsverdau und eine Vermehrung der Plasmide in *E. coli* DH10B Zellen. Die endgültige Selektion der Klone erfolgt entweder über die „alte“, ausgetauschte oder die „neue“, eingeführte Restriktionsschnittstelle und wird durch Sequenzierung der Plasmide bestätigt.

2.2.4.1 5'-Phosphorylierung der Mutations- und Selektionsprimer

Da die T4 DNA-Ligase für die Phosphodiesterbindung zwischen den verlängerten Primern ein 5'-Phosphatende benötigt, mussten die Mutations- und Selektionsoligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert werden. Diese Reaktion wurde von der Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert. Der 20 µl-Ansatz enthielt 1 µg des Primers, den 10x Kinase Puffer A, ATP (Endkonzentration 1 mM) und 1 U der PNK. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 1 h. Nach 10-minütiger Inaktivierung des Enzyms bei 65°C konnten die 5'-phosphorylierten Primer mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

2.2.4.2 Denaturierungsschritt und Anlagern der Oligonukleotide

Der Denaturierungsansatz enthielt das Plasmid, das die Mutation tragen soll, die beiden phosphorylierten Selektions- und Mutationsprimer und Puffer in angegebener Menge (s. unten). Dieser Ansatz wurde für 3 min in einem Thermoblock auf 99°C erhitzt, um die DNA-Stränge des Plasmids zu trennen. Während die Probe danach für 5 min auf Eis abgekühlt wurde, konnten die Primer binden. Vor Zugabe der Ligase und Polymerase im nächsten Schritt wurde der Ansatz noch einmal kurz mit einer Tischzentrifuge an zentrifugiert.

2 µl 10x Annealing-Puffer

2 µl Plasmid-DNA (Konzentration 0,05 µg/µl)

2 µl 5'-phosphorylierter Selektionsprimer (Konzentration 0,05 µg/µl)

2 µl 5'-phosphorylierter Mutationsprimer (Konzentration 0,05 µg/µl)

12 µl H₂O

20 µl

2.2.4.3 Synthese des Hybridplasmids

Zu jedem Mutagenese-Ansatz wurden zunächst die folgenden Komponenten in angegebener Menge pipettiert: 10x Synthesis Puffer (3 µl), 10 mM ATP (1,5 µl), 10 mM dNTPs (0,6 µl), 100 mM DTT (3 µl), T4 DNA-Polymerase (1 µl) und T4 DNA-Ligase (0,6 µl). Die Probe wurde dann für 2 h bei 37°C inkubiert, so dass in dieser Zeit der Hybridstrang synthetisiert werden konnte. Wurden mehr als vier Mutationsansätze gleichzeitig pipettiert, so wurde aus Puffer, ATP, dNTPs und DTT ein „Master Mix“ hergestellt. Ligase und Polymerase wurden immer separat zugegeben.

2.2.4.4 Ethanolfällung und erster selektiver Restriktionsverdau

Nach der 2-stündigen Inkubation wurden die Proben mit Ethanol gefällt (2.2.3.7) und das Pellet in 25 µl H₂O aufgenommen. Für den ersten selektiven Restriktionsverdau zur Eliminierung der parentalen Plasmide wurden 40 U der Restriktionsendonuklease, die die „alte“ Schnittstelle erkennt, zusammen mit 2 µl des entsprechenden Puffers zugegeben und der Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Nachdem das Enzym bei 65°C für 20 min inaktiviert wurde, erfolgte eine erneute Ethanolfällung. Das Pellet wurde in 30 µl H₂O gelöst.

2.2.4.5 Transformation in den *mutS*-defizienten *E. coli* Stamm BMH 71-18 *mutS*

Die Transformation der Ansätze erfolgt in elektrokompetenten *E. coli* BMH 71-18 *mutS* Zellen. Diese Zellen sind nicht in der Lage fehlgepaarte Basen zu erkennen und zu reparieren, da das *mutS*-Reparatursystem defekt ist. Pro Transformationsansatz wurde ein Aliquot (40 µl) der Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl der gefällten Plasmid-DNA gemischt. Für die Elektroporation wurden die *E. coli*-Zellen mit der DNA gemischt, in den Spalt einer eiskalten Elektroporationsküvette pipettiert und diese in einen Elektroporator gestellt. Um die Membran der Zellen zu permeabilisieren wurde ein 1,8 kV Stromstoß erzeugt und die transformierten Zellen danach in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 60 min bei 37°C auf einem Thermoschüttler bei 450 rpm bebrütet. In dieser Zeit hatten die Bakterien Zeit, das Gene für die β-Lactamase zu exprimieren und ihre Ampicillin-Resistenz auszubilden. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen für 1 min bei 6000 rpm pelletiert, 900 µl des Überstandes verworfen und das Bakterienpellet in den restlichen 100 µl LB-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde dann auf LB/Amp Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert.

2.2.4.6 DNA-Isolierung des gemischten Plasmid-Pools

Da in den entstandenen *E. coli*-Kolonien sowohl die nicht mutierten als auch die mutierten Plasmide vorkamen, wurden die Kolonien gepoolt. Hierfür wurden alle Kolonien mit 5 ml LB/Amp abgespült und die Suspension über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm bebrütet. Am nächsten Tag erfolgte die DNA Isolation über eine DNA-Präparation im kleinen analytischen Maßstab (Minipräparation). Die DNA-Pellets wurden in 30 µl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.4.7 Zweiter selektiver Restriktionsverdau und Transformation in *E.coli* DH10B

Um erneut eine Selektion von nicht mutierten Parentalplasmiden und mutierten Plasmiden zu erreichen, wurden 5 µl der zuvor präparierten Plasmid-DNA mit 20 U Restriktionsenzym und 2 µl des dazugehörigen Puffers gemischt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden dem Ansatz erneut 20 U des Enzyms zugegeben und dieser für eine weitere Stunde bei 37°C im Thermoblock aufbewahrt. Die Restriktionsendonuklease wurde schließlich bei 65°C für 20 min inaktiviert. Nachdem der Ansatz 1:5 mit Wasser verdünnt wurde, verwendete man 1 µl der DNA für die Transformation in *E. coli* DH10B (2.2.3.8). Von dem 1 ml LB-Medium, in dem die Zellen nach der Transformation gelöst waren, wurden 70 µl auf LB/Amp Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4.8 Isolierung der Plasmid-DNA aus einzelnen Klonen

Um die Plasmid DNA aus den *E. coli* Zellen auf der Agarplatte zu isolieren, wurden 5 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium mit je einer Einzelkolonie angeimpft und in einem Bakterieninkubator bei 37°C über Nacht mit 180 rpm geschüttelt. Pro Mutageneseansatz wurden fünf Klone ausgewählt. Aus 1,5 ml der Übernachtskultur wurde im kleinen analytischen Maßstab die DNA präpariert (Minipräparation). Das DNA Pellet wurde in 30 µl H₂O aufgenommen.

2.2.4.9 Selektion der Klone

Da die positiven Klone sowohl die eingeführte Mutation als auch die „neue“ Schnittstelle tragen sollten, wurde die isolierte DNA einem selektiven Kontrollverdau mit dem entsprechenden Enzym unterzogen. Als Komponenten wurden in den Verdau 5 µl der Plasmid-DNA und 10 U des Restriktionsenzym mit seinem passenden Puffer eingesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C in einem Thermoblock wurden die gesamten Ansätze auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. War einer der Klone aufgrund seines Bandenmusters positiv, wurde das Plasmid zum Sequenzieren geschickt. Trug die Sequenz die erwartete und keine zusätzliche Mutation, wurde ein Maxipräparation des Plasmids hergestellt.

2.2.4.10 Herstellung der Punkt- und Insertionsmutanten und der verkürzten Transferrin-Konstrukte mittels zielgerichteter Mutagenese

Die folgenden Mutanten des S-Proteins wurden mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese erzeugt. Hierzu wurde das „TransformerTM Site Directed Mutagenesis Kit“ verwendet, dessen Durchführung in 2.2.4 angegeben ist. In die Sequenz des S-Proteins wurden entweder Aminosäuren inseriert oder aus der Sequenz deletiert sowie Punktmutationen eingeführt. Im folgenden Abschnitt sind die einzelnen Plasmide und ihre Klonierungsstrategie festgehalten. In den Tabellen sind die Mutations- und Selektionsprimer, die veränderte Schnittstelle sowie das verwendete Ausgangsplasmid angegeben.

2.2.4.10.1 Punktmutationen TM1

pSVBX24H-HA-F8L

pSVBX24H-HA-F19L

pSVBX24H-HA-F20L

In den Punktmutanten wurden die Phenylalanine der TM1 durch Leucine ersetzt. Als Ausgangsplasmid für die Mutagenese wurde immer der Vektor pSVBX24H-HA verwendet.

Plasmid	Mutationsprimer	Selektionsprimer	Austausch Schnittstelle
pSVBX24-HA-F8L	VBVS3	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24-HA-F19L	VBVS4	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24-HA-F20L	VBVS5	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>

pSVBX24H-HA-F8/19L

pSVBX24H-HA-F8/20L

pSVBX24H-HA-F19/20L

pSVBX24H-HA-F8/19/20L

Bei der Einführung von mehreren Punktmutationen in die TM1 wurden als Ausgangsplasmide Einzelmutanten verwendet (s. oben), die mit einem Mutationsprimer eine zusätzliche Mutation erhielten. Eine Ausnahme bildete die Mutante pSVBX24H-HA-F19/20L. Da die beiden Phenylalanine benachbart lagen, wurde in diesem Fall ein Mutationsprimer mit zwei Mutationen verwendet, die in den Ausgangsvektor pSVBX24H-HA eingeführt wurden. Die Mutante pSVBX24H-HA-F8/19/20L wurde aus dem Plasmid pSVBX24H-HA-F19/20L mit dem Mutationsprimer VBVS3 konstruiert, der die Mutation an Position 8 trug.

Plasmid	Mutations- primer	Selektions- primer	Ausgangsplasmid	Austausch Schnittstelle
pSVBX24-HA-F8/19L	VBVS4	VBJN11	pSVBX24-HA-F8L	<i>MfeI</i> → <i>EcoRI</i>
pSVBX24-HA-F8/20L	VBVS5	VBJN11	pSVBX24-HA-F8L	<i>MfeI</i> → <i>EcoRI</i>
pSVBX24-HA-F19/20L	VBVS9	VBVS10Sel	pSVBX24-HA	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24-HA-F8/19/20L	VBVS3	VBJN11	pSVBX24-HA-F19/20L	<i>MfeI</i> → <i>EcoRI</i>

2.2.4.10.2 Punktmutationen TM2

pSVBX24H-HA-F80L

pSVBX24H-HA-F83L

pSVBX24H-HA-F85L

pSVBX24H-HA-F93L

pSVBX24H-HA-F80/83L

pSVBX24H-HA-F80/85L

pSVBX24H-HA-F83/85L

pSVBX24H-HA-F80/83/85L

Die Punktmutanten der TM2 wurden in Rahmen der Masterarbeit von Jeanette Navratil und der Bachelorarbeit von Franziska Frey erzeugt. Da diese Mutanten in dieser Arbeit für Experimente verwendet wurden, ist im Folgenden ihre Klonierungsstrategie angegeben. Als Ausgangsplasmid wurde immer der Vektor pSVBX24H-HA verwendet.

Plasmid	Mutationsprimer	Selektionsprimer	Austausch Schnittstelle
pSVBX24H-HA-F80L	VBJN6	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-F83L	VBJN7	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-F85L	VBJN8	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-F93L	VBJN9	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-F80/83L	VBFF1	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-F80/85L	VBFF2	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-F83/85L	VBFF3	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-F80/83/85L	VBJN10	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>

pSVBX24H-HA-F80/83/85/93L

Das Plasmid pSVBX24H-HA-F80/83/85/93L wurde ebenfalls mittels zielgerichteter Mutagenese konstruiert. Um alle vier Phenylalanine gegen Leucine auszutauschen wurde das Plasmid pSVBX24H-HA-F85L als Ausgangsplasmid verwendet. Es wurden zwei Mutationsoligonukleotide gleichzeitig in die Mutagenese eingesetzt: der erste Primer trug die F à L Punktmutationen an den Positionen 80/83/85 (VBJN10) und der zweite Primer trug die Punktmutation an Position 93 (VBJN9). Als Selektionsprimer diente der Primer VBJN11, der die in pSVBX24H-HA-F85L vorhandene *MfeI* Schnittstelle in eine *EcoRI* Schnittstelle umwandelte.

2.2.4.10.3 Insertionsmutanten TM1**pSVBX24H-HA-TM11AlaN****pSVBX24H-HA-TM12AlaN****pSVBX24H-HA-TM11AlaMi****pSVBX24H-HA-TM12AlaMi****pSVBX24H-HA-TM11AlaC****pSVBX24H-HA-TM12AlaC**

Die Mutationsprimer trugen an der gewünschten Stelle eine Insertion von 1-2 Alaninen in der Sequenz. Als Ausgangsplasmid diente in allen Mutanten das Plasmid pSVBX24H-HA.

Plasmid	Mutationsprimer	Selektions- primer	Austausch Schnittstelle
pSVBX24H-HA-TM11AlaN	1AlaTM1N	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-TM12AlaN	2AlaTM1N	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-TM11AlaMi	TM1Ins1Ala	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-TM12AlaMi	TM1Ins2Ala	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-TM11AlaC	1ALATM1C	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-TM12AlaC	2ALATM1C	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>

2.2.4.10.4 Insertionsmutanten TM2

pSVBX24H-HA-TM21AlaN

pSVBX24H-HA-TM22AlaN

pSVBX24H-TM21AlaMi

pSVBX24H-TM22AlaMi

pSVBX24H-HA-TM21AlaC

pSVBX24H-HA-TM22AlaC

Die Mutationsprimer trugen an der gewünschten Stelle eine Insertion von 1-2 Alaninen in der Sequenz. Die Schnittstelle wurde bei allen Plasmiden durch den Selektionsprimer VBVS10Sel von *EcoRI* in *MfeI* umgewandelt.

Plasmid	Mutationsprimer	Selektionsprimer	Ausgangsplasmid
pSVBX24H-HA-TM21AlaN	1AlaTM2N	VBVS10Sel	pSVBX24H-HA
pSVBX24H-HA-TM22AlaN	22Nlänger	VBVS10Sel	pSVBX24H-HA
pSVBX24H-TM21AlaMi	VBVS15	VBVS10Sel	pSVBX24H
pSVBX24H-TM22AlaMi	VBVS16	VBVS10Sel	pSVBX24H
pSVBX24H-HA-TM21AlaC	1AlaTM2Clänger	VBVS10Sel	pSVBX24H-HA
pSVBX24H-HA-TM22AlaC	2AlaTM2C	VBVS10Sel	pSVBX24H-HA

2.2.4.10.5 Insertionsmutanten TM3

Für die Insertionsmutanten der TM3 wurde immer das Plasmid pSVBX24H-HA als Ausgangsplasmid verwendet.

Plasmid	Mutationsprimer	Selektionsprimer	Austausch Schnittstelle
pSVBX24H-HA-TM31AlaAH	1AlaNTM3	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-TM31AlaN	1AlaNTM3_2	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-TM31AlaC	1AlaCTM3	VBVS10Sel	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>

2.2.4.10.6 Verkürzte Transferrin-Konstrukte

pSVBX24H-HA-TransdelVO

pSVBX24H-HA-TransdelHI

pSVBX24H-HA-Transdel8aa

Die Verkürzung des anstelle der TM2 eingeführten Typ II Signals des humanen Transferrin-Rezeptors (HTR) um 8 Aminosäuren erfolgte über die gerichtete Mutagenese. Zuerst wurde das Signal des HTR an seinem 3'- und seinem 5'-Ende um je 4 Aminosäuren (12bp) verkürzt. Hierbei trugen die Mutationsprimer die gewünschten Deletionen. Für die Deletion von acht Aminosäuren wurde das im 5'-Bereich um vier Aminosäuren verkürzte Plasmid pSVBX24H-HA-TransdelVO als Ausgangsplasmid in der Mutagenese eingesetzt. Als Mutationsprimer wurde das Oligonukleotid mit der Deletion im 3'-Ende verwendet.

Plasmid	Mutations-primer	Selektions-primer	Ausgangs-plasmid	Austausch Schnittstelle
pSVBX24H-HA-TransdelVO	Transdelvorne	VBVS10Sel	pSVBX24H-HA-Trans	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-TransdelHI	Transdelhinten	VBVS10Sel	pSVBX24H-HA-Trans	<i>EcoRI</i> → <i>MfeI</i>
pSVBX24H-HA-Transdel8aa	Transdelhinten	VBVN11	pSVBX24H-HA-TransdelVO	<i>MfeI</i> → <i>EcoRI</i>

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe verwendet man in der Molekularbiologie denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die SDS-Polyacrylamidgele sind aus einem Sammel- und einem Trenngel aufgebaut, die sich in ihrer Acrylamidkonzentration und ihrem pH-Wert unterscheiden. Sie werden zwischen zwei dünnen Glasplatten mit einer Spaltdicke von ca. 1 mm gegossen.

Zur Herstellung eines SDS-PAGE wurden zuerst die Glasplatten und Kämmen mit 2 %-igem SDS und 99 %-igem Ethanol gereinigt. Das Gelkammersystem stammte von der Firma Biometra und beinhaltete Gele der Größe 11 x 7 cm (Multigel) und 17 x 18 cm (Maxigel). Für die meisten Versuche wurden Multigele verwendet. Die gereinigten Glasplatten wurden dann mit einem 1 mm dicken Siliconplatthalter versehen und mit Klammern an den Rändern fixiert. Das Trenngel wurde je nach Länge der Taschen des Kammes ca. 2 cm unter den oberen

Glasplattenrand gegossen und mit 2 ml 99 %-igem Ethanol (EtOH) überschichtet, um eine luftblasenfrei Polymerisierung zu ermöglichen. Nach 30 min wurde das EtOH abgeschüttet und Reste mit einem Whatman-Papier abgesaugt. Das Trenngel wurde dann mit einem 5 %-igen Sammelgel überschichtet und der Kamm luftblasenfrei in die vorgesehene Aussparung zwischen die Glasplatten geschoben. Die Rezepte für ein Multigel und ein Maxigel mit einem 12 %-igen bzw. 10 %-igen Trenngel und einem 5 %-igen Sammelgel sind unten angegeben. Die 30 %-ige Bisacrylamidlösung bestand aus 30 % Acrylamid und 0,1 % Biacrylamide Stock-Lösung (w/v, 37:5:1).

Komponenten	12 % Trenngel 15 ml	12 % Trenngel 40 ml	Komponenten	5 % Sammelgel 6 ml
H ₂ O	4,9 ml	13,2 ml	H ₂ O	4,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	3,8 ml	10 ml	1,0 M Tris pH 6,8	750 µl
30 % Bisacrylamid	6,0 ml	16 ml	30 % Bisacrylamid	1 ml
10 % SDS	150 µl	400 µl	10 % SDS	60 µl
10 % APS	150 µl	400 µl	10 % APS	60 µl
TEMED	6 µl	16 µl	TEMED	6 µl

Nachdem das Sammelgel ebenfalls 30 min bei RT auspolymerisieren konnte, wurde unter laufendem Wasser der Kamm gezogen und die Taschen zwei Mal mit Wasser gespült. Vor dem Einspannen in die Laufkammer wurden die Klammern und der Siliconplatzhalter entfernt und die Platten trocken gewischt. Das obere und die unteren Reservoirs der Laufkammer wurden mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt (2.1.3) und mit Hilfe einer Spritze Luftblasen zwischen den Glasplatten entfernt. Wurde die Kammer nur für ein Gel genutzt, verwendete man eine Glasplatte auf der gegenüberliegenden Seite. Auch die Geltaschen wurden mit 1x Laufpuffer unter Verwendung einer Spritze gespült, um überschüssige Gelreste zu entfernen.

2.2.5.2 Aufbereitung der Proben für die reduzierende und nicht reduzierende SDS-PAGE

Zur Probenvorbereitung eine reduzierende SDS-PAGE wurde zuerst der 5x SDS-Ladepuffer mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) versetzt. Dazu wurden jeweils frisch 0,125 g DTT (25 %, w/v) abgewogen und zu 500 µl 5x SDS-Ladepuffer (2.1.3) gegeben und durch Vortexen gelöst. Das Reduktionsmittel sorgte dafür, dass intramolekulare oder intermolekulare Disulfidbrücken aufgebrochen wurden. Für eine nicht reduzierende SDS-PAGE wurde dem Ladepuffer kein DTT zugeführt, die Proben ansonsten aber gleich behandelt.

Für die SDS-PAGEs zum getrennten Nachweis der S-Proteine in Lysat und Medium wurden in je einem Multigel 30 µl der Lysate oder 38 µl der Zellkulturüberstände verwendet. Für ein Maxigel, bei dem die Lysate direkt neben den entsprechenden Zellkulturüberständen aufgetragen wurden, verwendete man 19 µl Lysat (versetzt mit 51 µl DMEM ohne FKS und 7 µl FKS) und 70 µl Überstand. Dieselbe Menge an Lysat und Medium wurde auch für das nicht-reduzierende Gel zur Detektion von Dimeren verwendet.

Die Proben wurden mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und direkt nach Zugabe des Puffers für 7 min bei 99°C erhitzt, um räumliche Strukturen der Proteine aufzubrechen. Nach 5-minütigem Abkühlen der Proben auf Eis wurden sie kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. Als Proteingrößenstandard wurden 10 µl des PAGERuler (Plus) mit auf das Gel aufgetragen (2.1.6.2). Die Elektrophorese erfolgte für Multigele ca. 4 h bei 150 V, für Maxigele ca. 6 h bei 180 V.

2.2.5.3 Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Elektrobplot

Die Proteine konnten aufgrund ihrer negativen SDS-Ladung aus dem Gel mittels Elektrobplot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden.

Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel der Laufkammer entnommen, die beiden Glasplatten voneinander getrennt und das Sammelgel verworfen. Das Trenngel, sowie die Nitrozellulosemembran wurden für 10 min in Transferpuffer (2.1.3) geschwenkt. Für den Elektrobplot wurde die Fastbplot-Apparatur von Biometra verwendet. Darauf wurden zuerst vier Whatman-Saugpapiere gelegt, die mit Transferpuffer getränkt waren. Durch Abrollen mit einer Einmalpipette wurden Luftblasen zwischen den Saugpapieren entfernt. Es folgten die Membran und das Trenngel sowie vier weitere Whatman-Papiere, die in Kathodentransferpuffer eingelegt worden waren. Danach wurde der Stapel noch einmal mit einer Pipette abgerollt und schließlich der Deckel (Kathode) auf die Apparatur aufgesetzt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 30 min bei 350 mA in Richtung der Anode (Boden).

2.2.5.4 Native Agarosegele zum Nachweis von HBs-positiven Partikeln

Um mögliche intrazelluläre subvirale Partikel oder andere zelluläre Vesikel mit membranständigem, unlöslichen S-Protein zu erhalten, wurden einige Zelllysate über mehrfaches Auftauen und Einfrieren gewonnen (2.2.2.5.2). Diese Partikel sollten auch während ihrer elektrophoretischen Auftrennung nicht denaturiert werden und in ihrer Form und Größe erhalten bleiben. Deshalb wurden sie auf native, 1 %-ige Agarosegele aufgetragen, die

kein Ethidiumbromid enthielten. Je 30 µl der Lysate, sowie der Überstände wurden mit 6x Auftragspuffer für native Gele (2.1.3) versetzt und in die Taschen eines 12er Kammes pipettiert. Die

Auftrennung erfolgt für 4 h bei 70V bis die untere Markerbande ca. 1,5 cm von der unteren Gelkante entfernt war. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Kapillarblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

2.2.5.5 Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Kapillarblot

Weil Proteine aus einem Agarosegel ihre natürliche Ladung behalten, lassen sie sich nicht durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen. Durch Ausnutzen der Kapillarkräfte in einem Kapillarblot konnte dieses Problem umgangen werden. Dabei wurde zuerst ein ca. 35 cm langes Whatman-Papier mit 10x SSC getränkt und über eine Glasplatte gelegt, so dass beide Enden in eine mit 10 x SSC gefüllte Plastikschaale hingen. Diese Schale diente als Pufferreservoir für die Übertragung der Proteine. Fünf weitere Whatman-Papiere, die in der Größe des Gels geschnitten und mit 10x SSC befeuchtet worden waren, wurden auf dem langen Whatman-Papier platziert. Durch Abrollen mit einer Plastikpipette wurden Luftblasen entfernt. Das Agarosegel wurde dann mit der Unterseite nach oben auf die Whatman-Papiere gelegt und mit der Nitrozellulosemembran bedeckt. Zur Äquilibration wurde diese vorher für 5 min in destilliertem Wasser inkubiert. Zum Abschluss des Blotaufbaus folgten fünf weitere, in 10 x SSC getränkte Whatman-Papiere. Um den gesamten Blot luftblasenfrei zu bekommen, wurde noch einmal mit einer Pipette über den gesamten Aufbau gerollt. Damit sich der Flüssigkeitsstrom ausschließlich durch das Gel bewegte, wurden an den Blotaufbau Parafilmstreifen in Form eines „Pas-par-tout“ angelegt. Zur Erzeugung der Kapillarkräfte wurden mehrere Lagen Saugpapier oben aufgelegt und mit einem Gewicht beschwert. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Blot, wie unter 2.2.5.6 beschrieben, entwickelt.

2.2.5.6 Nachweis von HBsAg auf der Membran mittels Western Blot

Um die S-Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde ein S-spezifischer Immunoblot durchgeführt. Zum Abblocken von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran für 1h in Milchpuffer auf einer Wippe bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Als Primärantikörper gegen das S-Protein von HBV wurde der monoklonale Antikörper HB1 (2.1.10) in einer Verdünnung von 1:2000 in Milchpuffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgte drehend in Glasröhren in einem Hybridisierungssofen für 2 h bei RT. Um ungebundene Antikörper zu

entfernen, wurde die Membran danach drei Mal für 10 min mit PBS + 0,1% Tween20 (PBS-T) gewaschen. Für die Erzeugung des Chemolumineszenz-Signals wurde als Sekundärantikörper ein Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet, der an die Meerrettich-Peroxidase (PO) gekoppelt war. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:3000 in Milchpuffer verwendet. Die Membran wurde für 1,5 h mit dem Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Nachdem der Immunoblot erneut drei Mal für 10 min in PBS-T und einmal für 5 min in PBS geschwenkt wurde, erfolgte das Entwickeln. Hierzu wurde das Zwei-Komponenten-System des Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) verwendet. Je nach Größe der Membran wurden je 500-800 µl der stabilen Peroxid-Lösung („Stable peroxide solution“) und der „Luminol/Enhancer“ Lösung gemischt. Die Membran wurde zwischen zwei Plastikfolien gelegt, mit dem Gemisch beträufelt und die Luftblasen zwischen den Folien entfernt. Nach 1- minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Membran in neue Folien transferiert und in eine Filmkassette geklebt. Das Entwickeln des Films erfolgte mit einer Entwicklermaschine (Entwicklermaschine Curix 60, Agfa) und Filmen von GE Healthcare je nach Stärke des Signals.

2.2.5.7 Intrazellulärer Nachweis von HBsAg mittels Immunfluoreszenz

Um zu überprüfen, wo Wildtyp-S (WT-S) und die mutierten S-Proteine in der Zelle lokalisiert waren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an fixierten Huh7-Zellen durchgeführt.

Die Zellen mussten zuerst auf runde Deckgläschen übertragen werden, auf denen sie später fixiert wurden. Dazu wurde eine 100% konfluente 10 cm-Schale in 4 ml Medium aufgenommen und je 150 µl der Zellsuspension in eine Aussparung einer 6 well-Platte pipettiert. Diese Platte wurde für ca. 19 h bei 37°C in einem Inkubatorschrank bebrütet. Damit die Zellen die mutierten S-Konstrukte exprimierten, wurden sie nach 19 h mit den gewünschten Plasmiden transfiziert. Als Positivkontrolle diente das Wildtyp-S-Plasmid pSVBX24H (-HA) und als Negativkontrolle nicht transfizierte Zellen. Nach erneuter Inkubation für ca. 19 h wurden die Zellen in jeder Vertiefung einer 6-well Platte 1:3 geteilt und je 1 ml der Suspension in eine Aussparung einer neuen 6-well Platte gegeben, die ein steriles Deckgläschen enthielt. Die Zellen konnten sich nun für weitere 19 h auf den Deckgläschen festsetzen. Danach folgte die intrazelluläre Färbung der S-Proteine mittels Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Für die Detektion der mCherry-S Fusionsproteine wurden die Zellen wie oben behandelt, aber nicht auf Plättchen ausgesät, sondern direkt in der Platte gefärbt.

Die mit Huh7-Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden mit Hilfe einer Feinpinzette in die Vertiefungen einer 12-well-Platte überführt. Hierbei war es wichtig, dass die bewachsene Seite

des Gläschens nach oben zeigte. Durch Zugabe von 500 µl PBS wurden die Glasplättchen gewaschen und der Überstand abgenommen. Falls nicht anders angegeben, wurden immer 500 µl Flüssigkeit pro Aussparung eingesetzt. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch die reversible Vernetzung der Proteine durch eine 2 %-ige Paraformaldehydlösung. Dazu wurden 500 µl der Lösung in jede Aussparung der 12-well-Platte pipettiert und die Plättchen darin für 15 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen der PFA-Lösung wurden die Zellen für 5 min mit 50 mM Ammoniumchlorid (in PBS) behandelt, das dann ebenfalls verworfen wurde. Um die Zellmembran zu permeabilisieren, wurden die Zellen dann mit PBS+0,5 % Saponin für 10 min auf einer Wippe inkubiert und die Lösung wieder entfernt. Das Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch 1 h Inkubation mit Blockierlösung. Diese bestand aus PBS mit 0,1 % Saponin und 10 % Serum. Hierbei wurde das Serum aus dem Tier verwendet, aus dem der Sekundärantikörper stammte. Im Falle der Färbung von S handelte es sich um Ziegenserum. Als Primärantikörper wurde für die Färbung eine in Blockierlösung angesetzte 1:250 Verdünnung des monoklonalen Maus-Antikörpers HB1 verwendet. Die Bindung des Antikörpers erfolgte über Nacht in einer Feuchtkammer. Dazu wurde auf den Boden einer Glasschale mit Deckel ein Parafilmstreifen gelegt und die Ränder der Schale mit feuchten Tüchern abgedeckt. Pro Deckgläschen wurden 30 µl der Antikörperverdünnung auf den Parafilm pipettiert und das Gläschen mit der bewachsenen Seite nach unten aufgelegt. Als Kontrolle wurde auch eine Färbung ohne den ersten Antikörper durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Plättchen wieder mit der bewachsenen Seite nach oben in die Vertiefungen einer 12-well Platte übertragen und drei Mal für 10 min mit PBS + 0,1 % Saponin gewaschen. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa594 gekoppelt war. Er wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS + 0,1 % Saponin eingesetzt und für 2 h auf den Proben belassen. Nach 1,5 h wurde der Kernfarbstoff DAPI in einer 1:1000 Verdünnung zu jeder Vertiefung gegeben und die Proben für weitere 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 min wurden die Plättchen auf einem Saugpapier abgetropft und mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen mit 1,5 µl „Mounting Media“ versehenen Objektträger gelegt. Die Versiegelung erfolgte mit Nagellack.

Für die Färbung der mCherry-S-Proben wurde nur die Fixierung und Permeabilisierung durchgeführt und die Proben später mit DAPI gefärbt. Da mCherry ein fluoreszierendes Protein ist, bedurfte es keiner Färbung durch Antikörper. Die Auswertung der Proben erfolgte entweder mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Olympus Fluoview 10i oder dem inversen Olympus IX81. Der verwendete Farbstoff Alexa594 hat ein Absorptionsmaximum von 590 nm

im roten Bereich, während mCherry bei 587 nm liegt. Aus diesem Grund wurde am Mikroskop für beide der TRITC-Filter (Absorptionsmaximum ~ 550 nm) verwendet.

2.2.5.8 Messung von HBsAg mit Hilfe von ELISA

Die Messung des HBsAg in den Zellkulturüberständen und Lysaten von transfizierten Huh7 Zellen erfolgte mit Hilfe des AxSYM HBsAg (V2) Kits der Firma Abbott. Die Messungen wurden von Theresa Asen, Andrea Weicht oder Raindy Tedjokusumo (Institut für Virologie) durchgeführt. Die Proben wurden 1:50 in PBS verdünnt und nach Herstellerangaben behandelt. Die Ergebnisse wurden als S/CO (Sample/Cut off) Werte angegeben. Als Cut off rate wurde die „Index Calibrator Mean Rate“ x2 definiert. Die im Ergebnisteil angegebenen Werte entsprechen nicht den S/CO Werten, sondern stellen den prozentualen Anteil der S/CO-Werte im Vergleich zu WT- und mock-Proben dar. Für jede Transfektion wurden 1-2 Wildtypproben und eine Negativkontrolle zusammen mit den Mutanten transfiziert. Von den Werten der ELISA-Messungen der WT-Proben wurde der Wert der Negativkontrolle abgezogen und die Ergebnisse der Wildtypproben für jede Transfektion gemittelt. Der Mittelwert wurde für jede Transfektion separat als 100 % festgelegt und trägt deshalb keine Standardabweichung. Von den ELISA-Werten der Mutanten wurde ebenfalls jeweils der Wert für die Negativkontrolle abgezogen und dann der prozentuale Anteil im Vergleich zum WT berechnet ($[(S/CO \text{ Probe} - S/CO \text{ mock}) * 100] / (S/CO \text{ WT} - S/CO \text{ mock})$). Ergaben die ELISA-Werte einiger Mutanten so niedrige Werte, dass sie nach Subtraktion der Negativkontrolle kleiner als 0 wurde, so wurden sie für die weitere Berechnung als 0 definiert. Die Ergebnisse aus mindestens drei Transfektionen für jede Mutante wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse zur Charakterisierung der Rolle der vier HBV S Transmembrandomänen für die Bildung von subviralen Partikeln

Das kleine Hüllprotein S des HBV ist ein integrales Membranprotein mit vier Transmembrandomänen. Im Laufe des viralen Zyklus können die S-Proteine durch Knospung an einer intrazellulären Membran in lösliche Partikel eingebaut werden, die als subvirale Partikel bezeichnet werden. In Abb. 6 ist das gegenwärtige Modell für deren Sekretionsweg dargestellt, der mit der Insertion der Proteinkette in die ER-Membran beginnt und über die Dimerisierung bis zur Knospung und Sekretion der Partikel führt.

Durch eine umfangreiche Mutationsanalyse mit Punktmutationen, Insertionen und Substitutionen sollte in dieser Arbeit die Rolle der vier Transmembrandomänen in den frühen Schritten der Partikelbildung geklärt werden. Hierzu gehören die Stabilität des Proteins, der Aufbau einer korrekten Transmembrantopologie, die N-Glykosylierung, die Dimerisierung und schließlich die Sekretion der Proteine in Form von subviralen Partikeln.

3.2 Strategie zur Charakterisierung der unterschiedlichen Mutanten

In Abb. 14 ist die kodierende Sequenz des 24 kDa großen S-Proteins dargestellt, die den unterschiedlichen Mutanten zu Grunde lag. Durch Nutzung der Glykosylierungsstelle an Asn146 entsteht zudem die glykosylierte Form des Proteins mit einer molekularen Größe von 27 kDa. Sowohl für TM1 als auch für TM2 wurden Punktmutanten erzeugt und zusätzliche Alanine in die Sequenz inseriert. Zudem wurden beide Transmembrandomänen durch funktionell ähnliche Signale anderer Proteine sowie durch homologe Bereiche des DHBV vollständig ersetzt. Für TM3 wurden Insertionsmutanten erzeugt und der gesamte C-Terminus durch das C-terminale Ende von DHBV-S ausgetauscht. Alle Mutanten wurden in verschiedenen Versuchen auf ihre Stabilität, Membrantopologie, Lokalisation und (Ko-) Sekretion mit dem Wildtyp S getestet.

1	Met	Glu	Asn	Ile	Thr	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Phe	Phe	20
	ATG	GAG	AAC	ATC	ACA	TCA	GGA	TTC	CTA	GGA	CCC	CTG	CTC	GTG	TTA	CAG	GCG	GGG	TTT	TTC	
	TAC	CTC	TTG	TAG	TGT	AGT	CCT	AAG	GAT	CCT	GGG	GAC	GAG	CAC	AAT	GTC	CGC	CCC	AAA	AAG	
21	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	40
	TTG	TTG	ACA	AGA	ATC	CTC	ACA	ATA	CCG	CAG	AGT	CTA	GAC	TCG	TGG	TGG	ACT	TCT	CTC	AAT	
	AAC	AAC	TGT	TCT	TAG	GAG	TGT	TAT	GGC	GTC	TCA	GAT	CTG	AGC	ACC	ACC	TGA	AGA	GAG	TTA	
41	Phe	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Val	Cys	Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr	Ser	Asn	His	60
	TTT	CTA	GGG	GGA	TCT	CCC	GTG	TGT	CTT	GGC	CAA	AAT	TCG	CAG	TCC	CCA	ACC	TCC	AAT	CAC	
	AAA	GAT	CCC	CCT	AGA	GGG	CAC	ACA	GAA	CCG	GTT	TTA	AGC	GTC	AGG	GGT	TGG	AGG	TTA	GTG	
61	Ser	Pro	Thr	Ser	Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe	80
	TCA	CCA	ACC	TCC	TGT	CCT	CCA	ATT	TGT	CCT	GGT	TAT	CGC	TGG	ATG	TGT	CTG	CGG	CGT	TTT	
	AGT	GGT	TGG	AGG	ACA	GGA	GGT	TAA	ACA	GGA	CCA	ATA	GCG	ACC	TAC	ACA	GAC	GCC	GCA	AAA	
81	Ile	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Asp	Tyr	100
	ATC	ATA	TTC	CTC	TTC	ATC	CTG	CTG	CTA	TGC	CTC	ATC	TTC	TTA	TTG	GTT	CTT	CTG	GAT	TAT	
	TAG	TAT	AAG	GAG	AAG	TAG	GAC	GAC	GAT	ACG	GAG	TAG	AAG	AAT	AAC	CAA	GAA	GAC	CTA	ATA	
101	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	120
	CAA	GGT	ATG	TTG	CCC	GTT	TGT	CCT	CTA	ATT	CCA	GGA	TCA	ACA	ACA	ACC	AGT	ACG	GGA	CCA	
	GTT	CCA	TAC	AAC	GGG	CAA	ACA	GGA	GAT	TAA	GGT	CCT	AGT	TGT	TGT	TGG	TCA	TGC	CCT	GGT	
121	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Asn	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	140
	TGC	AAA	ACC	TGC	ACG	ACT	CCT	GCT	CAA	GGC	AAC	TCT	ATG	TTT	CCC	TCA	TGT	TGC	TGT	ACA	
	ACG	TTT	TGG	ACG	TGC	TGA	GGA	CGA	GTT	CCG	TTG	AGA	TAC	AAA	GGG	AGT	ACA	ACG	ACA	TGT	
141	Lys	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Ala	Lys	160
	AAA	CCT	ACG	GAT	GGA	AAT	TGC	ACC	TGT	ATT	CCC	ATC	CCA	TCG	TCC	TGG	GCT	TTC	GCA	AAA	
	TTT	GGA	TGC	CTA	CCT	TTA	ACG	TGG	ACA	TAA	GGG	TAG	GGT	AGC	AGG	ACC	CGA	AAG	CGT	TTT	
161	Tyr	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Val	180
	TAC	CTA	TGG	GAG	TGG	GCC	TCA	GTC	CGT	TTC	TCT	TGG	CTC	AGT	TTA	CTA	GTG	CCA	TTT	GTT	
	ATG	GAT	ACC	CTC	ACC	CGG	AGT	CAG	GCA	AAG	AGA	ACC	GAG	TCA	AAT	GAT	CAC	GGT	AAA	CAA	
181	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Ala	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	200
	CAG	TGG	TTC	GTA	GGG	CTT	TCC	CCC	ACT	GTT	TGG	CTT	TCA	GCT	ATA	TGG	ATG	ATG	TGG	TAT	
	GTC	ACC	AAG	CAT	CCC	GAA	AGG	GGG	TGA	CAA	ACC	GAA	AGT	CGA	TAT	ACC	TAC	TAC	ACC	ATA	
201	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Ser	Pro	Phe	Ile	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	220
	TGG	GGG	CCA	AGT	CTG	TAC	AGC	ATC	GTG	AGT	CCC	TTT	ATA	CCG	CTG	TTA	CCA	ATT	TTC	TTT	
	ACC	CCC	GGT	TCA	GAC	ATG	TCG	TAG	CAC	TCA	GGG	AAA	TAT	GGC	GAC	AAT	GGT	TAA	AAG	AAA	
221	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Leu	Val	Asp	Ser	240
	TGT	CTC	TGG	GTA	TAC	ATT	TAT	CCG	TAT	GAT	GTG	CCG	GAT	TAT	GCG	AGC	CTG	GTC	GAC	AGT	
	ACA	GAG	ACC	CAT	ATG	TAA	ATA	GGC	ATA	CTA	CAC	GGC	CTA	ATA	CGC	TCG	GAC	CAG	CTG	TCA	
241	Trp	Term																			242
	TGG	TAA-																			5`
	ACC	ATT-																			3`

- TM1
- TM2
- F→L
- amphipathische Helix
- C-Terminus
- HA-tag
- ▼ Alanin Insertion
- N-Glycosylierung Asn146

Abb. 14: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens für das kleine Hüllprotein S des Hepatitis B Virus mit HA-Epitop. In rot und blau sind die Transmembrandomänen 1 und 2 markiert. Die in den Punktmutanten durch Leucine ersetzten Phenylalanine sind in grau hinterlegt. Positionen der Alanin-Insertionen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die N-Glykosylierung an Asn146 ist schwarz hervorgehoben. Die mögliche amphipathische Helix (persönliche Mitteilung C. Sureau) ist in gelb, der C-Terminus in grün und das HA-Epitop in rosa markiert. Hinter den HA-Tag wurden 12 zusätzliche Nukleotide (GTCGACAGTTGG) eingeführt, die eine *SaI* Schnittstelle erzeugen.

3.2.1 Analyse der Mutanten auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Die alleinige Expression des HBV S-Proteins in Zellen genügt, um subvirale Partikel zu produzieren und zu sekretieren. In dieser Arbeit wurden deshalb für die Expression von Wildtyp-S und den veränderten Varianten humane Hepatomazellen (Huh7) mit den verschiedenen S-Konstrukten transfiziert und für 48 oder 72 h inkubiert. In dieser Zeit konnten S-Proteine in der Zelle produziert und subvirale Partikel in das Medium abgegeben werden. Die Analyse der intrazellulären S-Proteine lieferte eine Aussage, ob die eingeführten Mutationen die Bildung von stabilen, topologisch korrekten Proteinen weiterhin zuließen. Aus diesem Grund wurden die Proteine durch Zellyse freigesetzt und mittels Western Blot und ELISA detektiert. Da die Expression aller mutierten S-Proteine unter der Kontrolle des SV40-Promotors lag und die gleiche Menge an DNA für die Transfektion eingesetzt wurde, sollten alle Mutanten gleichermaßen stark exprimiert werden. War das Signal von ELISA und Western Blot im Lysat dennoch schwächer als das des Wildtyps, lag die Vermutung nahe, dass die Stabilität des Proteins zum Beispiel durch Fehlfaltung als Folge der Mutation vermindert war, was zu einem Abbau der Proteine in der Zelle führte. Neben Proteinstabilität konnte im Western Blot für die intrazellulären S-Proteine auch die N-Glykosylierung am Asn146 überprüft werden, die im ER stattfindet. Wurde diese Glykosylierungsstelle in der luminalen Schleife des Proteins genutzt, so befand sich die TM2 in korrekter Orientierung in der ER-Membran. War somit die glykosylierte Form des Proteins mit einer Größe von 27 kDa vorhanden (gp27), so konnte von einer korrekten Topologie der TM2 ausgegangen werden (Abb. 15, L). Ob die TM1 bei den unterschiedlichen Mutanten korrekt in die Membran inserierte, ließ sich dagegen nur über eine zusätzliche N-terminale N-Glykosylierungsstelle an Asn4 in der präS2 Region des mittleren Hüllproteins M detektieren. Bei einigen Mutanten wurde die Mutation deshalb ebenfalls in das M-Protein eingeführt. Die genaue Durchführung ist bei den jeweiligen Mutanten angegeben (3.3.5 und 3.3.10).

Der Nachweis von extrazellulären S-Proteinen im Zellkulturüberstand mittels Western Blot und ELISA lieferte hingegen Informationen über die Fähigkeit der Mutanten zur Partikelbildung, da S nur als Bestandteil subviraler Partikel von der Zelle abgegeben wird (Abb. 15, M). Hatten die extrazellulären S-Proteine auf ihrem sekretorischen Weg den Golgi-Apparat passiert, so trugen sie komplexe Zuckerketten im Gegensatz zu S-Proteinen, die den Golgi noch nicht passiert hatten und mannosereiche Zuckerreste trugen. Das Anhängen der komplexen Zucker führte zu einer Vergrößerung der glykosylierten S-Proteine um ca. 1 kDa (Werr und Prange, 1998), was im Western Blot detektiert werden konnte (gpGolgi27).

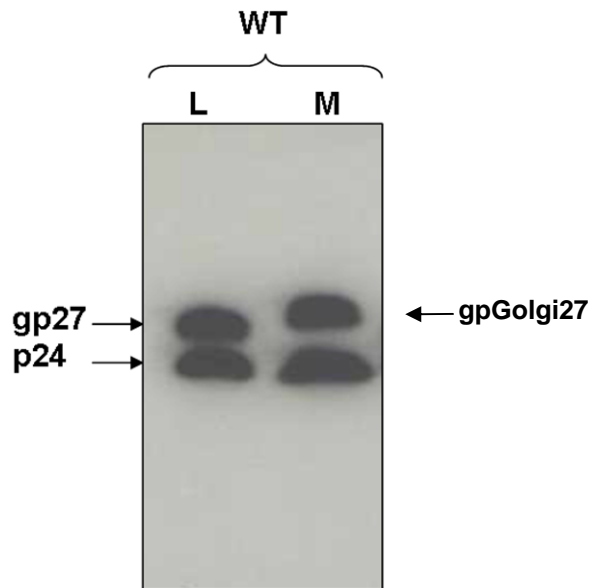


Abb. 15: Bandenmuster des wildtypischen S-Proteins im Western Blot in Lysat (L) und Medium (M). Huh7-Zellen wurden mit dem WT-Konstrukt pSVBX24H transfiziert, nach 72 h die Überstände geerntet und die Zellen lysiert. P24 ist die unglykosylierte Form des Proteins und gp27 die glykosylierte Form. Hatten die S-Proteine den Golgi passiert und trugen die zusätzlichen, komplexen Zuckerketten, so wurden sie als gpGolgi27 bezeichnet.

3.2.2 Intrazelluläre Lokalisation der Mutanten mittels Immunfluoreszenz

Die Visualisierung der kleinen Hüllproteine innerhalb der Zelle kann Auskunft darüber geben, wo sekretionsdefiziente Mutanten intrazellulär lokalisiert sind und wie im Vergleich dazu die Verteilung des wildtypischen S ist. Deshalb wurden von den meisten Mutanten Immunfluoreszenzanalysen mit einem S-spezifischen Antikörper durchgeführt. Da unterschiedliche Mikroskope und Färbungen verwendet wurden, bestanden zwischen einzelnen Proben farbliche Unterschiede. Als Referenz diente deshalb immer die jeweilige WT-Probe. Zur Etablierung der Immunfluoreszenz mussten die Antikörper zuerst auf mögliche unspezifische Bindungen getestet werden. Als Kontrolle, ob der S-spezifische Primärantikörper zusätzlich mit zellulären Proteinen interagieren konnte, wurden mock-transfizierte Zellen sowohl mit dem Primär- als auch dem Alexa594-markierten Sekundärantikörper gefärbt. Da bei der optischen Auswertung im roten Kanal kein Fluoreszenzsignal sichtbar war, konnte von einer S-spezifischen Bindung ausgegangen werden (Abb. 16, A). Zusätzlich wurden Wildtyp S-transfizierte Zellen nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt, um auszuschließen, dass der zweite Antikörper eine unspezifische Bindung einging. Ebenso wie für den ersten Antikörper konnte auch hier kein Fluoreszenzsignal und damit keine unspezifische Bindung gezeigt werden (Abb. 16, B).

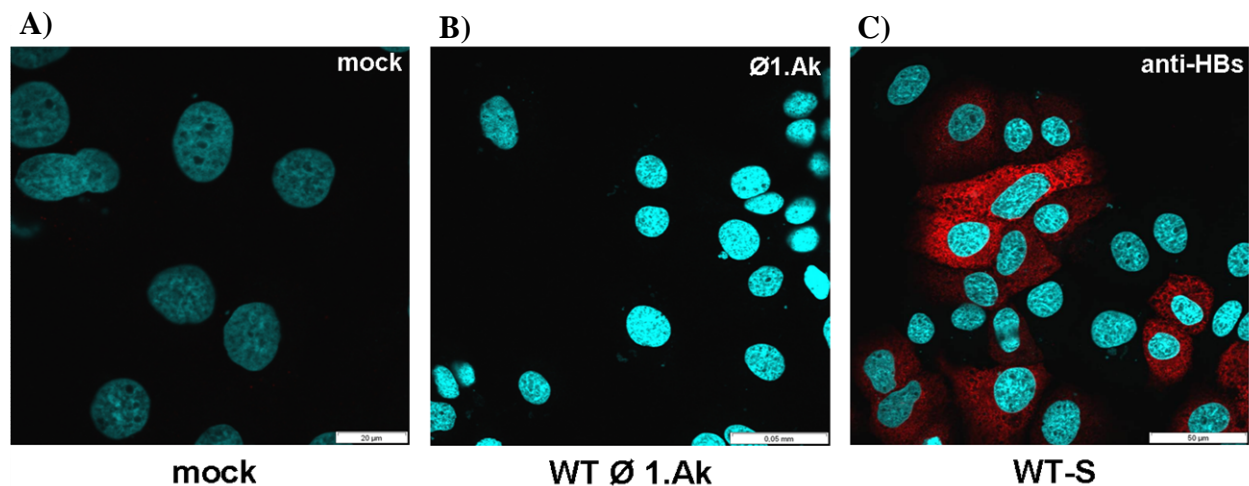


Abb. 16: Überprüfung des Primär- und Sekundärantikörpers auf unspezifische Bindung. (A) Mock transfizierte Huh7-Zellen wurden mit dem S-spezifischen Maus-Primärantikörper HB1 (1. Ak) gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa594 markiert war. Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Als Filter wurde ein TRITC-Filter (~ 550 nm) verwendet. Der Messbalken entspricht 20 µm. (B) Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pSVBX24H (WT-S) transfiziert und nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt. (C) Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pSVBX24H (WT-S) transfiziert und mit beiden Antikörpern gefärbt. Der Messbalken für B und C entspricht 50 µm.

3.2.3 Fusion des Hämagglutinin-Epitops an den C-Terminus von S zur Unterscheidung von Mutante und Wildtyp in Koexpressionsexperimenten

Da S-Proteine bei der Bildung subviraler Partikel miteinander interagieren, sollte der Einfluss der S-Mutanten auf das Verhalten des WT-S-Proteins untersucht werden. Um bei der Koexpression die mutierte S-Variante vom WT-S im Western Blot unterscheiden zu können, trugen die Mutanten am C-Terminus das Hämagglutinin-Epitop (HA) des Influenza Virus (YPYDVPDYASL). Der Einbau des HA-Tags erfolgte mittels Fusion überlappender PCR-Fragmente und hatte zur Folge, dass sowohl die unglykosylierte als auch die N-glykosylierte Form der mutierten S-Proteine um ca. 2 kDa größer waren, als die des Wildtyps. Bei einer Koexpression mit dem unmarkierten WT wurden somit vier Banden im Western Blot detektiert: 24 kDa (unglykosylierter WT), 26 kDa (unglykosylierte Mutante), 27 kDa (glykosylierter WT) und 29 kDa (glykosylierte Mutante) (Abb. 17 B). Ein ebenfalls mit dem HA-Epitop versehener Wildtyp (WTHA) diente als Kontrolle. Seine Expression und Sekretionsfähigkeit unterschied sich nicht von der des WT (Abb. 17, C). Da im ELISA die mutierten und wildtypischen S-Proteine nicht unterschieden werden konnten, wurden für die Koexpressionen keine ELISA-Werte bestimmt. Diese Markierung hatte zudem den Vorteil, dass für den Nachweis der Mutanten auch ein anti-Hämagglutinin Antikörper verwendet werden konnte.

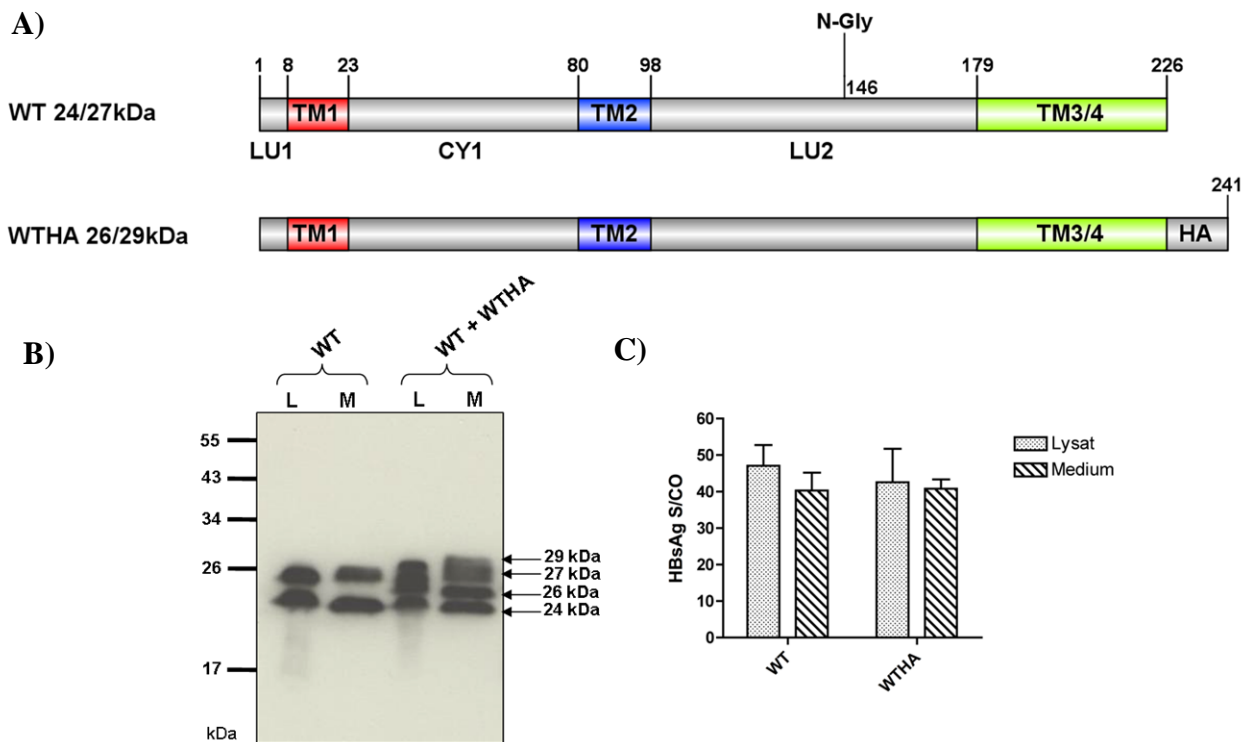


Abb. 17: Charakterisierung des HA-markierten Wildtyp S-Protein. (A) Schematische Darstellung des Wildtyps und des HA-markierten Wildtyps. (B) Anti-S Western Blot der Koexpression des markiert und unmarkierten Wildtyps (WT + WTHA). (C) HBsAg-ELISA-Messungen (S/CO) im Lysat und Medium von WT und WTHA. Die Balkendiagramme wurden mit dem Programm DOG 1.0 (Ren *et al.*, 2009) erstellt.

3.3 Generierung von Mutanten der ersten Transmembrandomäne (TM1)

Die erste Transmembrandomäne des kleinen Hüllproteins dient als Typ I Sekretionssignal, das nicht durch Signal-Peptidasen entfernt wird und am N-terminalen Ende des Proteins liegt (Eble *et al.*, 1987). Es bildet vermutlich eine α -Helix in der Membran. Die Position dieser Transmembranhelix lässt sich aufgrund der Hydrophobizität der Aminosäuren vorhersagen und liegt zwischen Aminosäure 8 und 28. Durch Nutzung von Online-Werkzeugen wie z.B. <http://biophysics.biol.uoa.gr/HMM-TM/> wurde für diese Arbeit der Bereich von Aminosäure 8 bis 23 als TM1 ausgewählt, da an Position 24 ein positiv geladenes Arginin steht. Die topologische Aufgabe dieser Domäne ist der Transfer des N-Terminus in das Lumen des ER.

Um herauszufinden, ob die TM1 - neben ihrer Signalfunktion - eine weitere Rolle für die Bildung der subviralen Partikel spielt, wurden unterschiedliche Mutationen in den hydrophoben Bereich eingeführt.

3.3.1 Substitution der Phenylalanine in TM1 durch Leucine

Drei der insgesamt 16 Aminosäuren der TM1 sind Phenylalanine. Aufgrund seines aromatischen Rings ist Phenylalanin eine relativ große und hydrophobe Aminosäure. Um die Bedeutung der Phenylalanine und der exakten Primärsequenz der ersten Transmembrandomäne für die Stabilität des Proteins und seine Fähigkeit zur Sekretion zu erforschen, wurden alle drei Phenylalanine an Position 8, 19 und 20 durch die kleinere, ebenfalls hydrophobe Aminosäure Leucin ersetzt (Abb. 18). Es wurden zudem alle möglichen Kombinationen als Mehrfachmutationen in die Sequenz eingeführt. Leucin wurde gewählt, um die Gesamthydrophobizität der Domäne nicht zu zerstören, aber dennoch eine Veränderung in der Primärsequenz zu erzeugen. Methodisch wurde dafür die zielgerichtete Mutagenese mit dem „TransformerTM Site-Directed-Mutagenesis-Kit“ angewandt. Die Selektion der positiven Mutanten erfolgte dabei über die Elimination einer vorhandenen und die Einführung einer neuen, einzelnen Restriktionsschnittstelle mit Hilfe eines Selektionsprimers. Die Punktmutationen wurden durch unterschiedliche Mutationsprimer eingeführt, die das Basentriplett für Phenylalanin in das für Leucin umwandelten.

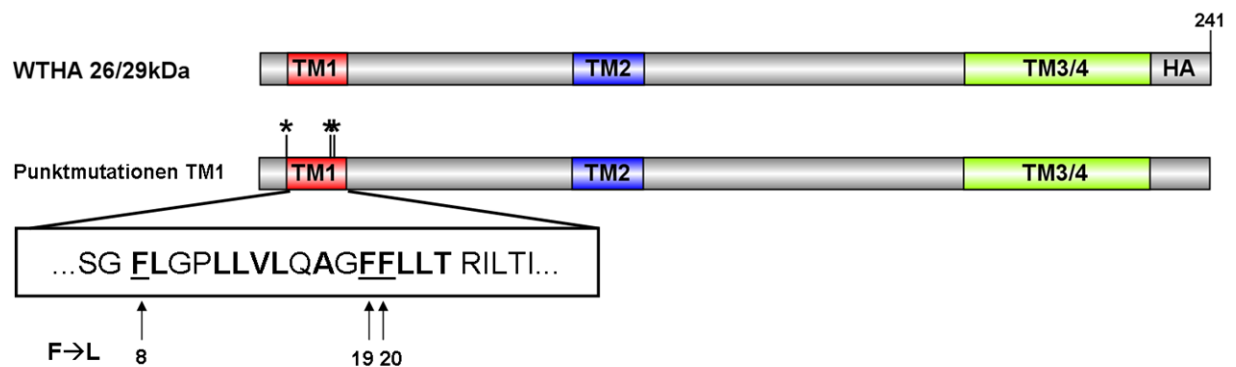


Abb. 18: Schematische Darstellung der Punktmutanten der TM1. Die durch Leucine ausgetauschten Phenylalanine sind in der Sequenz unterstrichen.

3.3.2 Analyse der F à L Punktmutanten der TM1 auf ihre Stabilität, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Die Konstrukte zur Expression der Punktmutanten wurden in Huh7-Zellen transfiziert. Der Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein erfolgte über Western Blots und wurde durch ELISA-Messungen überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass für die TM1 ein Austausch dieser drei Aminosäuren keinen negativen Effekt auf die Stabilität und Sekretionsfähigkeit der Proteine hatte. Die intra- und extrazellulären Signale der einzelnen Mutanten im Western Blot entsprachen in ihrer Stärke denen des Wildtyps (WTHA) (Abb. 19, A+B, oben). Dieses Ergebnis konnte durch die Bestimmung des HBsAg in Lysat und Medium

mit Hilfe von ELISA-Messungen bestätigt werden (Abb. 19, A+B, unten). Da auch die Sekretion der subviralen Partikel nicht gestört war, wurde zudem von einer korrekten Membrantopologie der Punktmutanten ausgegangen. Die Anwesenheit der 26 kDa Bande des unglykosylierten Proteins sowie der 29 kDa Bande der N-glykosylierten Form ließ zudem auf eine korrekte N-Glykosylierung im ER schließen. Die exakte Primärsequenz an den veränderten Positionen ist somit für die Funktionalität der TM1 nicht essentiell und kleinere Variationen werden bei der Partikelbildung toleriert. Es ist allerdings zu bemerken, dass die gegeneinander ausgetauschten Aminosäuren (Leu und Phe) beide hydrophob waren und deshalb die Hydrophobizität, die für eine Transmembranhelix wichtig ist, nicht drastisch veränderten. Ein Austausch durch eine nicht hydrophobe Aminosäure wie z.B. Serin könnte einen stärkeren negativen Effekt haben.

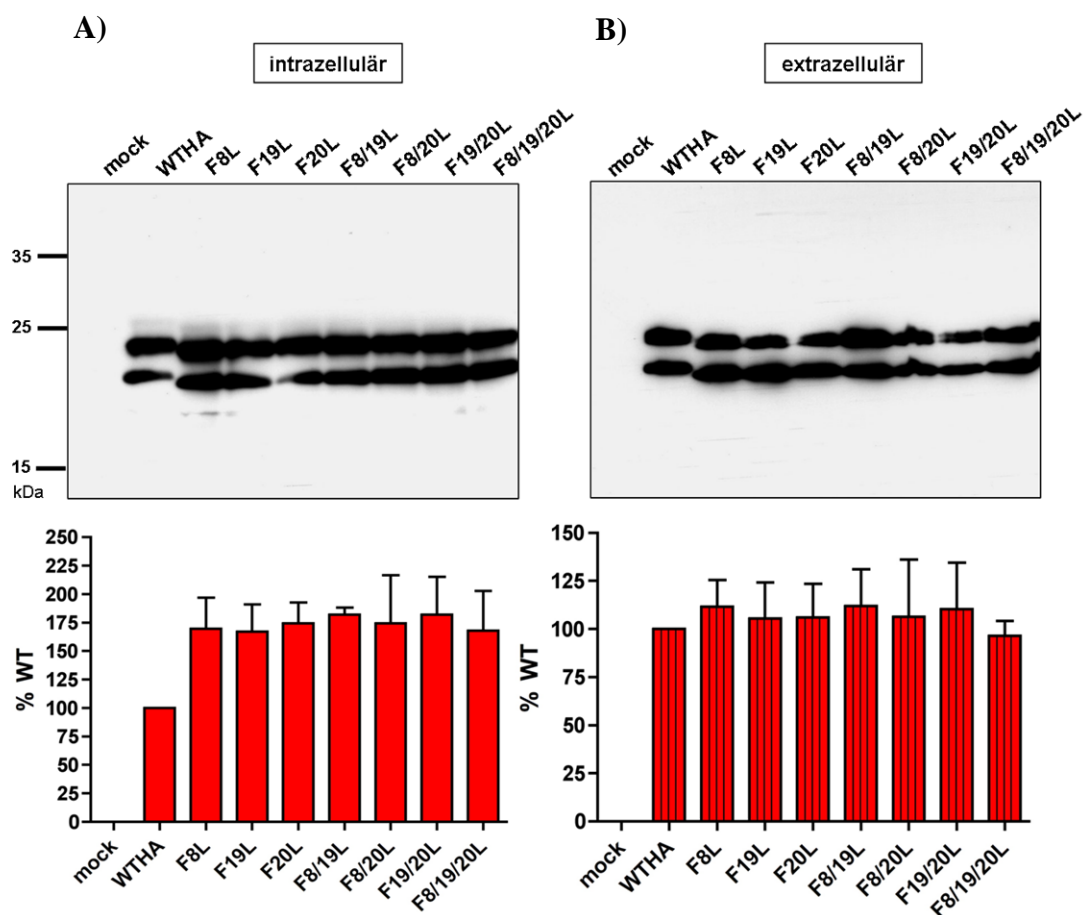


Abb. 19: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein von F à L Punktmutanten der TM1 mittels Western Blot und ELISA. Huh7-Zellen wurden mit Plasmid-DNA für die Expression der Konstrukte transfiziert, für 48 oder 72 h inkubiert, der Überstand geerntet und die Zellen lysiert. In der Abbildung sind anti-S Western Blots und ELISA-Messungen von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) der einzelnen Mutanten dargestellt. Der Blot wurde mit dem anti-S Antikörper HB1 entwickelt und stellt repräsentativ eine ELISA-Messung dar. Für die ELISA-Messung wurden die Lysate und Überstände 1:50 in PBS verdünnt. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der Menge des Wildtyps angegeben. Die Standardabweichungen wurden aus der Analyse von mindestens drei unterschiedlichen Transfektionen berechnet.

3.3.3 Einführung von Alanin-Insertionen in den N-terminalen, zentralen und C-terminalen Abschnitt der TM1

Neben der exakten Abfolge der Aminosäuren in einer TM-Helix können auch Anzahl und Position der Reste eine entscheidende Rolle für eine korrekte Topologie und mögliche transmembrane Interaktionen zwischen den Domänen spielen. In der Struktur einer α -Helix mit 3,6 Aminosäuren pro Umdrehung ist die Position jedes Restes und der Winkel der Aminosäuren zueinander festgelegt. Durch Insertion einer zusätzlichen Aminosäure in die Helix lässt sich ihre Länge und damit auch die Orientierung aller nachfolgenden Reste verändern. Da in dieser Arbeit geklärt werden sollte, ob und wie die Transmembrandomänen neben ihrer topologischen Funktion auf die Bildung von subviralen Partikeln wirken, wurde durch Insertion von Alaninen die Länge und Orientierung der Helix verändert. Dadurch könnten zum Beispiel potentielle Wechselwirkungen zwischen den Domänen unterbunden werden, die von der Position bestimmter Reste abhängig waren. Es wurde die Auswirkung von Insertionen im N-terminalen, zentralen und C-terminalen Bereich der TM1 untersucht (Abb. 20). Es wurden sowohl Insertionen mit einem Alanin (1Ala) und mit zwei Alaninen (2Ala) hergestellt. Da die Mutanten mit der Einführung von zwei Alaninen meist den gleichen Phänotyp zeigten wie die mit einem Alanin, sind in der Regel nur die Ergebnisse für die Insertionen eines Alanins dargestellt.

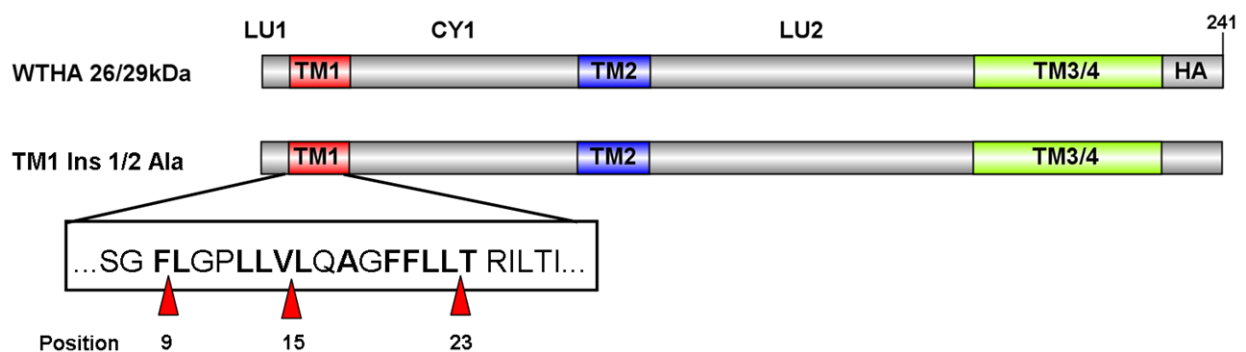


Abb. 20: Schematische Darstellung der Insertionsmutanten von TM1. Die Positionen, an denen die zusätzlichen Alanine in der Sequenz liegen, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.3.4 Untersuchung der TM1-Insertionsmutanten auf ihre Stabilität, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels ELISA und Western Blot

Wie auch bei den Punktmutanten wurden die Lysate und Überstände von transfizierten Huh7 Zellen auf Anwesenheit von S überprüft. Sowohl die Ergebnisse der ELISA-Messungen als auch die des Western Blots zeigten unabhängig von der Position der Insertion intrazellulär fast keine verminderte Stabilität und eine korrekte N-Glykosylierung der Proteine. Die ELISA-HBsAg-Menge im Lysat umfasste bei den Mutanten 70 – 120 % der WT-Kontrolle (Abb. 21, A). Die N-terminal eingeführte Aminosäure hatte darüber hinaus nur einen schwach negativen Einfluss auf die Sekretionsfähigkeit des Proteins. Im Vergleich zur sekretierten Menge des Wildtyps kam die Mutante noch immer auf 80 %, was zusätzlich auf eine korrekte Membrantopologie schließen ließ (Abb. 21, B).

Wurde die Aminosäure dagegen am C-terminalen Ende in die Helix inseriert, war die Sekretion stark reduziert. Die veränderte Helixstruktur erschwerte offensichtlich die Partikelbildung, weshalb nur noch ein geringer Teil der intrazellulär stabilen Proteine in das Medium gelangte, während der Rest in der Zelle akkumulierte. Die Position der zusätzlichen Aminosäure beeinflusste die Sekretionskompetenz somit unterschiedlich

Noch stärker war der negative Effekt, wenn die Insertion zentral in der Mitte der Transmembrandomäne lag: Die Sekretion wurde vollständig blockiert, obwohl das Protein in der Zelle deutlich detektierbar war. Die intrazelluläre Detektion war allerdings nur ein Beweis dafür, dass das Protein stabil war und nicht von der zellulären Maschinerie abgebaut wurde, nicht aber dafür, dass die TM1 korrekt in die Membran inseriert wurde. Eine fehlerfreie Membrantopologie könnte aber - unabhängig von der Stabilität - essentiell für die Formation von Partikeln sein. Um deshalb zu prüfen, ob die Sekretionsdefizienz der zentralen Insertionsmutante von einer fehlerhaften Topologie verursacht wurde, war die Untersuchung der Membrantopologie der nächste Schritt.

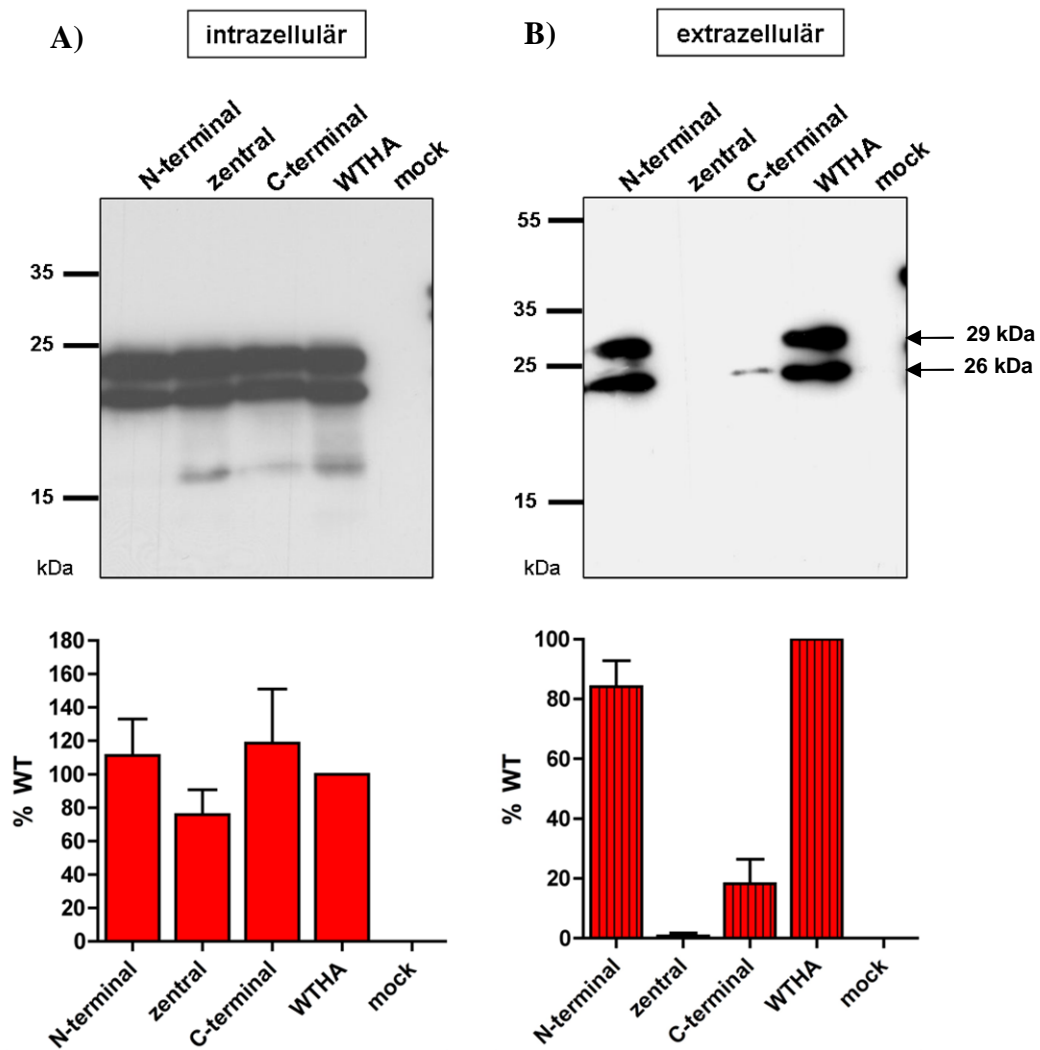


Abb. 21: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein von TM1-Insertionsmutanten mittels Western Blot und ELISA. Abgebildet sind anti-S Western Blots und ELISA-Messungen von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) der N-terminalen, zentralen und C-terminalen Insertionsmutanten. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit der HA-markierte WT-Variante (WTHA) oder mit PBS (mock) transfiziert wurden.

3.3.5 Überprüfung der Membrantopologie der zentralen Insertionsmutante von TM1 mit Hilfe des mittleren Hüllproteins M

Um zu testen, ob die zentrale Insertionsmutante der TM1 ein funktionelles Typ I Signal besaß, wurde die Mutation zusätzlich in die Sequenz des mittleren Hüllproteins eingeführt. Das M-Protein trägt neben der Glykosylierungsstelle in der S-Domäne in seiner N-terminalen präS2-Region eine zusätzliche Glykosylierungsstelle an Position Asn4, die nur verwendet werden kann, wenn der N-Terminus in das Lumen des ER zeigt. Die Translokation von präS2 erfolgt dabei durch TM1 (Eble *et al.*, 1990). Eine N-Glykosylierung der präS2 zeigt also eine Signalfunktion von TM1 an. Durch das Bandenmuster auf dem Western Blot kann überprüft werden, ob dies der Fall ist. Dort muss bei korrekter Topologie sowohl die nicht glykosylierte

30 kDa-Bande, die einfach glykosylierte 33 kDa-Bande und die doppelt glykosylierte 36 kDa-Bande des M-Proteins im Zelllysatz zu sehen sein. Zur Konstruktion der Mutante wurde die mutierte TM1 aus dem Plasmid pSVBX24H-HA-TM11AlaMi über die Enzyme *PstI* und *SpeI* herausgeschnitten und in das Plasmid pSV33H kloniert. Dieses Plasmid trägt neben dem offenen Leserahmen für S auch die präS2 Region, deren Startkodon für die Expression des mittleren Hüllproteins genutzt wird. Bei der Expression des Plasmids wurden somit S- und M-Proteine erzeugt, die beide eine zusätzliche Aminosäure an Position 15 in der TM1 trugen. Durch diesen Ansatz konnte allerdings nur die Topologie der TM1 im M-Protein getestet werden. Ob sich die TM1 im S-Protein gleich verhielt oder zum Beispiel im Zytosol lokalisiert war, konnte somit nicht gezeigt werden, wird aber in der Diskussion berücksichtigt.

Das Konstrukt wurde in Huh7-Zellen transfiziert und die S-Domäne beider Oberflächenproteine (S+M) im Lysatz und Überstand durch Western Blot und ELISA nachgewiesen. Die Anwesenheit der drei Banden des M-Proteins im Lysatz sowohl beim Wildtyp (pSV33H) als auch bei der Insertionsmutante (M TM1 1Ala), lieferte den Beweis, dass die N-Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 4 (Asn4) genutzt und somit der N-Terminus über die ER-Membran transferiert wurde (Abb. 22, A). Zudem ließ sich offensichtlich die Sekretionsdefizienz der Mutante durch Anwesenheit der präS2-Domäne des M-Proteins im ER-Lumen teilweise komplementieren, da die Insertionsmutante zusammen mit dem M-Protein im Medium ein Signal erzeugte. Dieses könnte deshalb im Western Blot stärker wirken als in der ELISA-Messung, weil der Blot mit einer langen Expositionszeit von 30 min belichtet wurde. Die Komplementation war nicht mehr gegeben, wenn zwei Alanine in den zentralen Bereich des S- und M-Proteins integriert wurden (M TM1 2Ala) (Abb. 22, B). Im Medium ließen sich beim Wildtyp nur die beiden glykosylierten Formen erkennen, was mit der Beobachtung anderer Gruppen übereinstimmt (Werr und Prange, 1998). Im Gegensatz dazu bildeten die nicht glykosylierten (30 kDa) und einfach glykosylierten Proteine (33 kDa) die dominante, sekretierte Form der Mutante. Dies ließ darauf schließen, dass die doppelt glykosylierte Form zwar gebildet wurde, präferentiell aber nicht in die Partikel integriert wurde. Da somit von einer korrekten Transmembrantopologie der Mutanten im M-Hintergrund ausgegangen werden kann, das Protein aber nicht mit wildtypischer Effizienz sekretiert wurde, musste die TM1 noch eine zusätzliche Funktion für die Bildung von Partikeln haben.

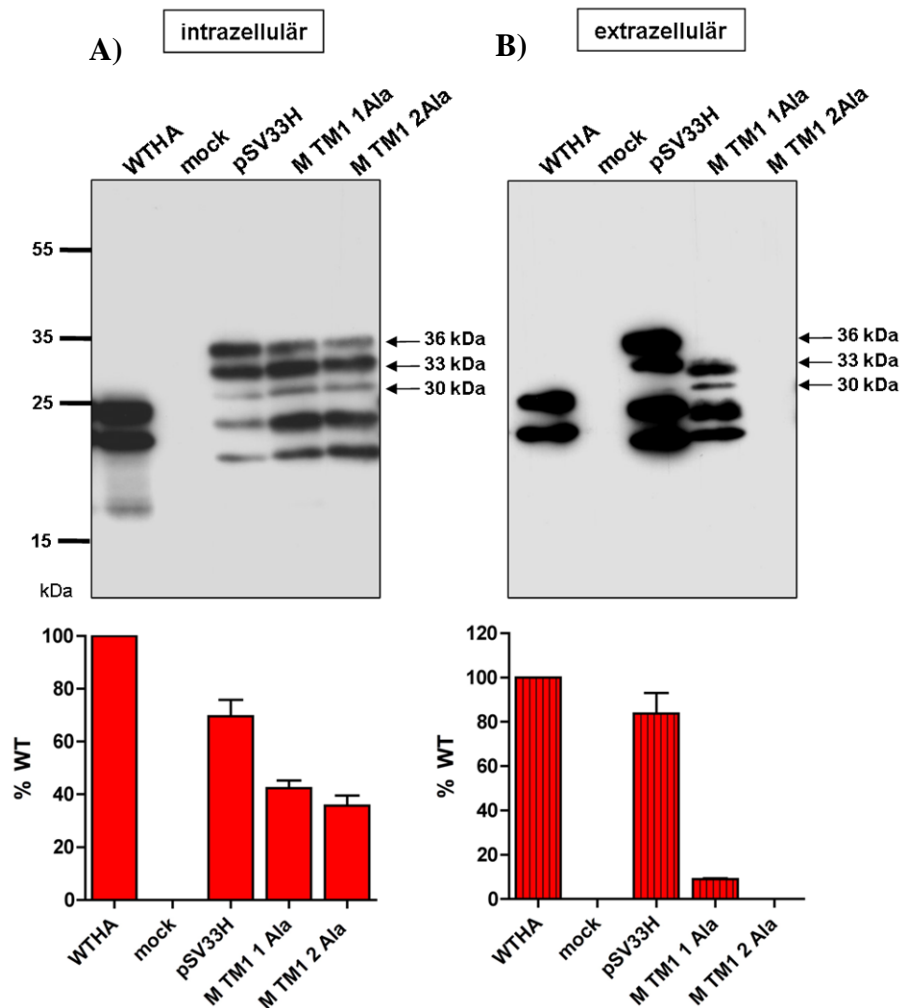


Abb. 22: Nachweis der korrekten Transmembrantopologie der zentralen Insertionsmutante der TM1. Anti-S Western Blot und ELISA-Messungen von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B). WTHA (WT-S), pSV33H (WT-S + WT-M), M TM1 1Ala (S und M mit Insertion von einem Alanin in TM1), M TM1 2Ala (S und M mit Insertion von zwei Alaninen in TM1).

3.3.6 Intrazelluläre Lokalisation der TM1-Insertionsmutanten durch Immunfluoreszenzfärbung

Da zwei der drei Insertionsmutanten einen sekretionsdefizienten Phänotyp zeigten, sollte als nächstes der Aufenthaltsort der Proteine in der Zelle näher charakterisiert werden. Dies geschah mittels Immunfluoreszenzfärbung. Als Vergleich diente der Wildtyp, der eine gleichmäßige, leicht granuläre Verteilung über das gesamte Zytoplasma zeigte (Abb. 23, A+C). Da das S-Protein aus dem Zytoplasma über den sekretorischen Weg aus der Zelle ausgeschleust wird und viele Kompartimente durchläuft, passt die beobachtete, ubiquitäre Verteilung des Wildtyps hierzu. Phänotypisch ähnlich wie der Wildtyp verhielten sich die beiden Mutanten, die die Alanin-Insertion im N- bzw. C-terminalen Bereich der TM1 trugen. Sie waren ebenfalls über das gesamte Zytoplasma verteilt und aggregierten nicht in speziellen Kompartimenten (Abb. 23, B+E). Da beide Mutanten subvirale Partikel in das Medium

abgeben konnten, lag nahe, dass die S-Proteine den gleichen Weg durch die Zelle nahmen wie der WT. Zu bemerken ist allerdings, dass die C-terminale Mutante ein stärkeres intrazelluläres Signal erzeugte als die N-terminale Mutante. Dabei könnte es sich um akkumulierte S-Proteine handeln, da die C-terminale Mutante sowohl im Western Blot als auch im ELISA eine stark gehemmte Sekretion zeigte. Wurde die Sekretion durch die zentrale Aminosäureinsertion dagegen vollständig blockiert, so aggregierten die Hüllproteine in großen Vesikeln (Abb. 23, D). Ob diese Vesikel von der ER-Membran stammen oder Golgi/ERGIC-Zisternen mit akkumuliertem S darstellen, muss zukünftig durch Kofärbungen geklärt werden.

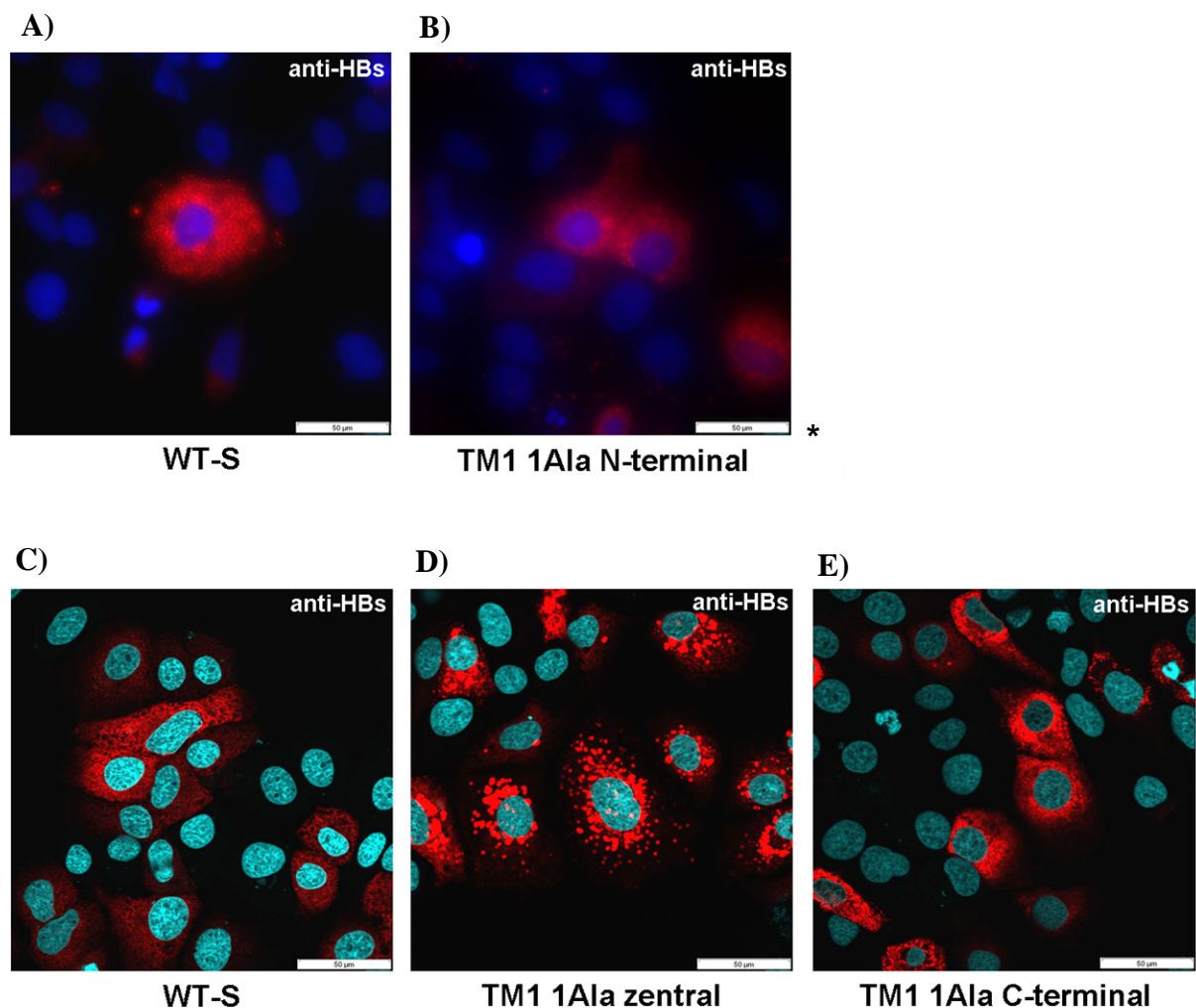


Abb. 23: Intrazelluläre Lokalisation der TM1-Insertionsmutanten. Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pSVBX24H (WT-S, A und C) und den Insertions-Konstrukten (B, D, E) transfiziert, fixiert und mit dem S-spezifischen Antikörper HB1 gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit Alexa594 gekoppelt war. In A ist der korrespondierende Wildtyp für B dargestellt, während in C die Wildtyp-Färbung für D und E abgebildet ist. * Aufgrund von Problemen mit der Skalierungssoftware ist der Größenbalken in A und B auf 50 µm abgeschätzt. Der Messbalken von C-E entspricht 50 µm.

3.3.7 Untersuchung der Koexpression und -sekretion der TM1-Insertionsmutanten mit dem WT-S

Ob die in der Immunfluoreszenz beobachtete intrazelluläre Akkumulation der zentralen und C-terminalen Insertionsmutante auch die Sekretion des Wildtyps negativ beeinflussen konnte, wurde mit Hilfe von Koexpressionsexperimenten analysiert. In den Lysaten aller drei Insertionsmutanten waren sowohl die Banden des Wildtyps (24 kDa und 27 kDa) als auch die der Mutanten (26 kDa und 29 kDa) deutlich zu sehen, was auf eine unveränderte Proteinstabilität der beiden Formen hindeutete (Abb. 24, A). Mit Blick auf die sekretierten, extrazellulären S-Proteine konnten sowohl die sekretionskompetente N-terminale Insertionsmutante als auch der WT im Medium detektiert werden (Abb. 24, B, N-terminal). Wie die N-terminale Insertionsmutante verhielt sich auch die C-terminale Mutante: obwohl sie alleine nur schwach sekretiert wurde, hatte dieser inhibitorische Phänotyp offensichtlich keinen negativen Einfluss auf die Sekretion des Wildtyps und die Mutante wurde nun so effektiv kosekretiert wie der WT. Möglicherweise konnte deren Sekretionsdefizienz durch die Anwesenheit von einigen wildtypischen Domänen komplementiert werden. Ob die beiden Formen wirklich gemischte Partikel bildeten oder separat voneinander sekretiert wurden, müsste allerdings zum Beispiel mittels anti-HA-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Das Auftreten von Doppelbanden anstelle einer Einfachbande bei der glykosylierten Form des S-Proteins im Medium lässt sich vermutlich entweder auf einen teilweisen Abbau der Golgi-Zuckerreste im Medium zurückführen oder auf die Sekretion von nicht vollständig glykosylierten S-Proteinen. Leider konnte dieser Effekt auch durch den Einsatz neuer Zellen und veränderte Medienzusätze nicht eliminiert werden.

Die zentrale Insertionsmutante zeigte darüber hinaus einen ausgeprägten Phänotyp. Sie konnte weder alleine, noch zusammen mit dem WT aus der Zelle ausgeschleust werden und blockierte zudem fast vollständig die Sekretion des Wildtyps, was als negative Transdominanz bezeichnet wird (Abb. 24, B, zentral). Dieses Phänomen konnte schon für mutierte große Hüllproteine (L) beobachtet werden, die die Sekretion wildtypischer L-Proteine hemmten (Bruss, 1997). Offensichtlich schien die Orientierung der Helix und damit ihre Fähigkeit zur Partikelbildung durch die zentrale Insertion so stark verändert zu sein, dass auch die Anwesenheit von korrekten Helices diesen Fehler nicht ausgleichen konnte.

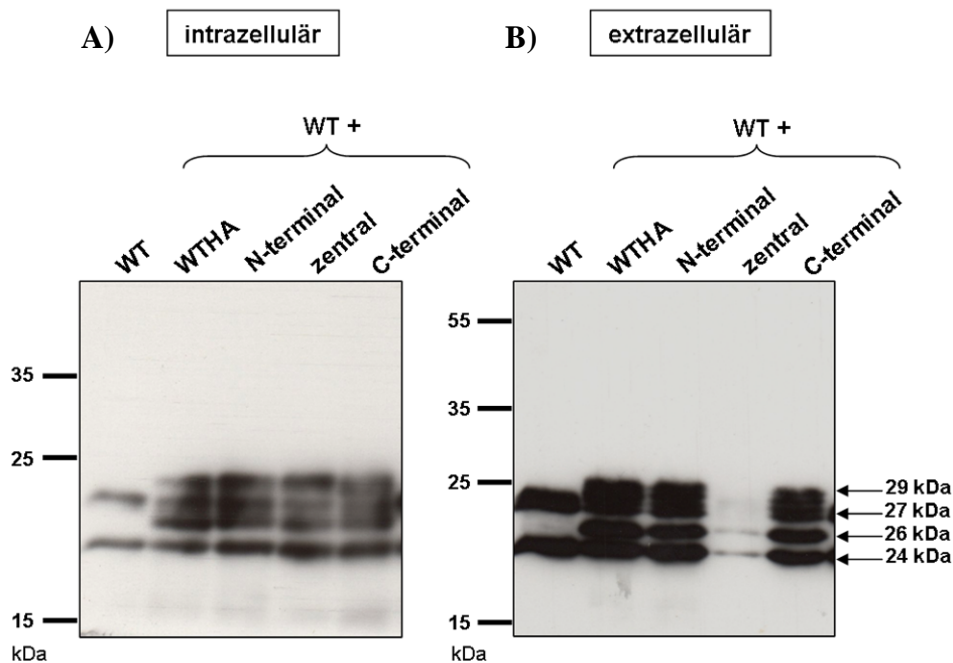


Abb. 24: Analyse der Koexpression und –sekretion von TM1-Insertionsmutanten und WT mittels Western Blot. Huh7-Zellen wurden mit je 0,5 µg des WT-Vektors und der Konstrukte zur Expression der Insertionsmutanten kotransfiziert, für 48 oder 72h inkubiert, die Überstände geerntet und die Zellen lysiert. (A) Anti-S Western Blot der Zelllysate. (B) Anti-S Western Blot der Zellkulturüberstände. 24 kDa (WT), 26 kDa (Mutante), 27 kDa (WT glykosyliert), 29 kDa (Mutante glykosyliert).

3.3.8 Austausch der TM1 durch das Typ I Signal der β -Lactamase

In die TM1 inserierte Alanine verhinderten zwar teilweise die Sekretion der Proteine, störten aber weder deren Topologie noch Stabilität, was für zwei voneinander entkoppelte Funktionen der TM1 spricht. Um dies weiter zu prüfen, sollte die Domäne durch ein fremdes Typ I Signal ersetzt werden, das möglicherweise nur noch die topologische Funktion komplementieren kann. Andere Funktionen wie zum Beispiel sequenzspezifische Interaktionen könnten dagegen durch dieses Signal nicht oder nur eingeschränkt erfüllt werden. Anstelle der TM1 wurde in dieser Arbeit das Typ I Signal der β -Lactamase in die Sequenz inseriert (Koshland *et al.*, 1982). Die exakte Sequenz ist in Abb. 25 angegeben. Sie umfasste die Aminosäuren 8 bis 23 der β -Lactamase und entsprach in ihrer Länge von 16 Aminosäuren genau der Länge der TM1. Der Einbau der Fremdsequenz in den HBV-Hintergrund erfolgte über die Fusion zweier überlappender PCR-Fragmente, die sowohl Teile der Fremd- als auch Teile der HBV-Sequenz trugen. Das fertige Konstrukt enthielt anstelle der TM1 das Typ I Signal der β -Lactamase, entsprach ansonsten aber dem wildtypischen S-Protein und wurde im Folgenden als „beta“ bezeichnet.

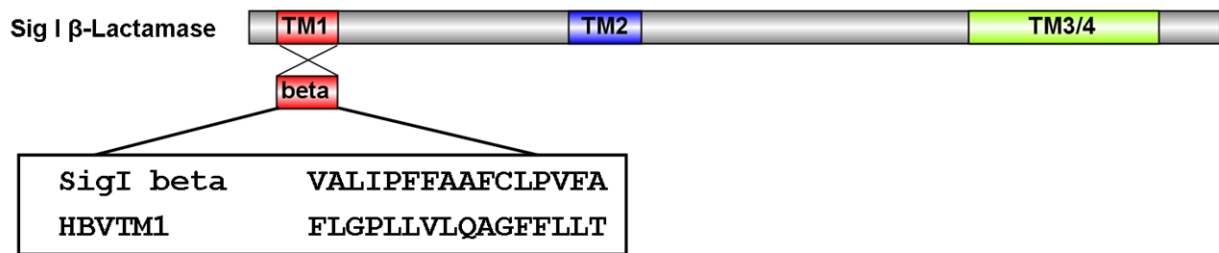


Abb. 25: Schematische Darstellung der β -Lactamase-Chimäre der TM1. Im Kasten ist die Aminosäuresequenz der TM1 von HBV und des Typ I Signals der β -Lactamase angegeben.

3.3.9 Untersuchung der β -Lactamase-Chimäre auf ihre Stabilität, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels ELISA und Western Blot

Durch die verwendeten Assays sollte nun untersucht werden, ob das fremde Typ I Signal im Hintergrund der HBV-Sequenz Funktionen der ursprünglichen TM1 komplementieren konnte. Hierzu wurde das chimäre Konstrukt in Huh7-Zellen transfiziert und das S-Protein in Lysat und Medium nachgewiesen. Passend zu den Ergebnissen der Punkt- und Insertionsmutanten hatte der Austausch der TM1 nur einen schwach negativen Effekt auf die Stabilität des Proteins, da die HBsAg-Werte im Lysat 70-80 % des Wildtyps entsprachen (Abb. 26, B). Es konnte somit gezeigt werden, dass das fremde Signal nicht zu einer Destabilisierung des Proteins führte. Ob das Typ I Signal topologisch korrekt wirkte und den N-Terminus in das ER-Lumen transferierte, musste noch untersucht werden. Allerdings schien das Typ I Signal der β -Lactamase die Funktion der TM1 für die Sekretion nicht zu ersetzen, da kein S-Protein in das Medium abgegeben wurde, was sowohl durch die ELISA-Ergebnisse als auch durch das fehlende Signal im Western Blot gezeigt wurde (Abb. 26, A+B). Um den Grund für diese Sekretionsblockade zu finden, sollte nun zunächst die Topologie der Chimäre überprüft werden.

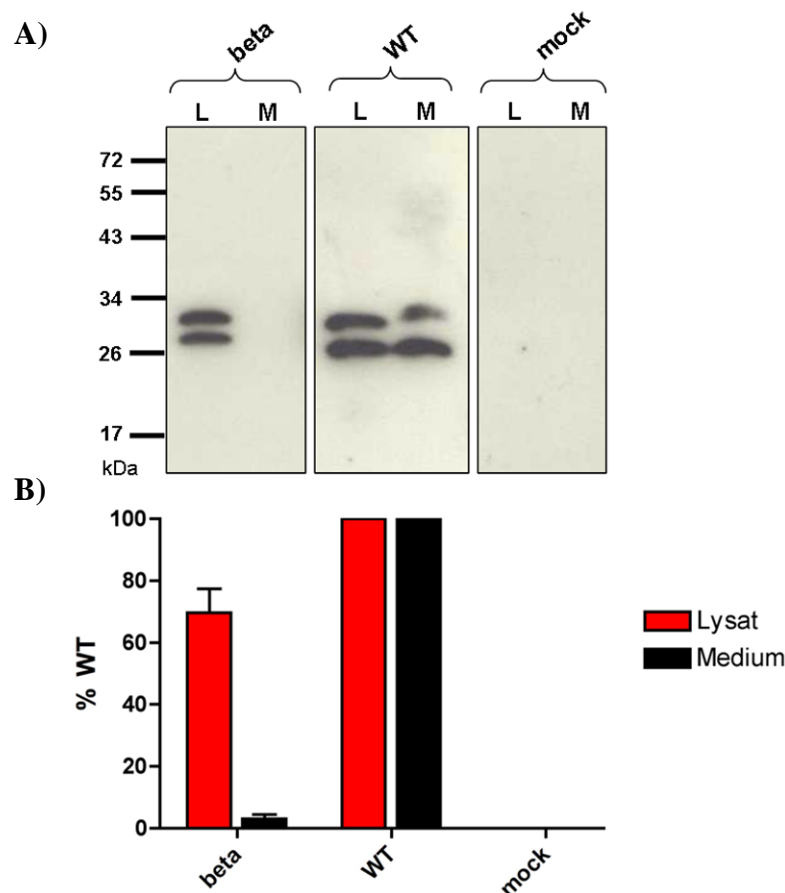


Abb. 26: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein der β -Lactamase-Chimäre mittels Western Blot und ELISA. (A) Anti-S Western Blot von Lysaten (L) und Zellkulturüberständen (M). Die Konstrukte wurden in Huh7-Zellen transfiziert und nach 48 oder 72h die Zellkulturüberstände geerntet und die Zellen lysiert. Die aufgetragenen Mengen von Lysat und Medium entsprechen in etwa demselben Volumenanteil. Der Western Blot wurde mit dem S-spezifischen HB1 Antikörper entwickelt. (B) Nachweis von von intra- und extrazellulärem S-Protein mittels HBsAg-ELISA.

3.3.10 Überprüfung der Membrantopologie der β -Lactamase-Chimäre mit Hilfe des mittleren Hüllproteins M

Bei den vorherigen Ergebnissen blieb zu klären, ob das fremde Typ I Signal topologisch korrekt wirkte. Wie für die zentrale Insertionsmutante wurde das fremde Typ I Signal deshalb auch in das mittlere Hüllprotein eingeführt. Hierzu wurde mit den Restriktionsschnittstellen *PstI* und *SpeI* die fremde TM1 aus dem Vektor pSVBX24H-HA-beta herausgeschnitten und in den Vektor pSV33H eingebracht. Wurde das Konstrukt (betaM) anschließend in Huh7-Zellen exprimiert, entstanden sowohl S- als auch M-Proteine mit dem fremden Typ I Signal. Als Vergleich wurde in Abb. 27 noch einmal das beta-Konstrukt ohne M mit auf das Gel geladen. Mit Hilfe des mittleren Hüllproteins konnte gezeigt werden, dass die topologische Funktion der TM1 durch das fremde Typ I Signal im M-Protein weiterhin gegeben war, da die Glykosylierungsstelle an Asn4 des M-Proteins genutzt wurde, sichtbar durch die drei Banden (30, 33 und 36 kDa) im Lysat der Chimäre (betaM) und des Wildtyps (pSV33H, Abb.27, A).

Überraschenderweise konnten auch im Medium beim betaM-Konstrukt im Blot Signale des S- und M-Proteins mit wildtypischem Bandenmuster detektiert werden, obwohl das mutierte S-Proteins alleine nicht sekretionskompetent war (beta, Abb.27, B). Der ELISA bestätigte die Ergebnisse des Blots. Dies ließ darauf schließen, dass die Anwesenheit der wildtypischen präS2-Domäne im mutierten M-Protein die Sekretionsdefizienz der S- und M-Chimäre teilweise komplementieren konnte. Das betaM-Konstrukt zeigte damit den gleichen Phänotyp, den auch die Mutante mit der zentralen Insertion im M-Hintergrund aufwies. Da im Vergleich zum Wildtyp bei der Mutante ein geringerer Teil der veränderten S- und M-Proteine in das Medium abgegeben wurden, könnten die hohen ELISA-Werte im Lysat der Chimäre (~150 %) auf eine intrazelluläre Akkumulation der Proteine hinweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Typ I Signal der β -Lactamase die topologische Funktion der TM1 im M- Hintergrund komplementieren, die Sekretion von Partikeln aber nicht vollständig wiederherstellen kann. Diese Tatsache liefert einen Hinweis darauf, dass die TM1 von HBV eine weitere Funktion für die Knospung oder die Bildung der Partikel erfüllt, die sequenzspezifisch ist. Diese könnte eine Interaktion mit benachbarten Transmembrandomänen oder mit einem zellulären Protein sein.

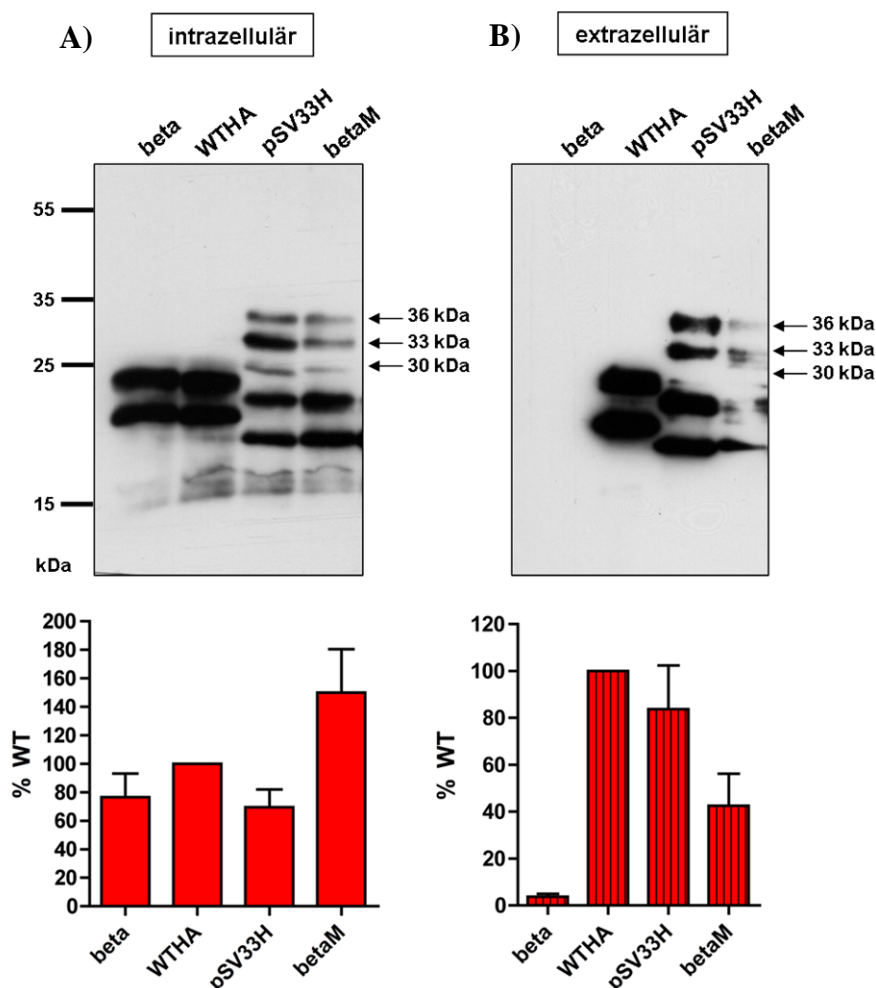


Abb. 27: Überprüfung der Membrantopologie der β -Lactamase-Chimäre mittels Western Blot und ELISA. Anti-S Western Blot und ELISA-Messung von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B). beta (S mit β -Lactamase Signal) WTHA (WT-S), pSV33H (WT-S + WT-M), betaM (S und M mit β -Lactamase Signal).

3.3.11 Analyse der Koexpression und -sekretion der β -Lactamase-Chimäre mit WT-S

Ob die durch das fremde Typ I Signal verursachte Sekretionsblockade der S-Proteine auch einen hemmenden Einfluss auf die Sekretion des Wildtyps haben könnte, sollte durch Koexpressionsexperimente geklärt werden. Die Stabilität der Chimäre war auch bei der Expression mit dem WT weiterhin gegeben, was durch das Erscheinen aller vier S-Banden im Lysat gekennzeichnet war. Im Medium dagegen konnten die Banden des unglykosylierten (24 kDa) und glykosylierten Wildtyps (27 kDa) nur schwach detektiert werden, was auf einen inhibitorischen Effekt der Mutante auf die Sekretion des Wildtyps schließen ließ. Dieser könnte zum Beispiel hervorgerufen worden sein, weil das β -Lactamase Typ I Signal nicht in der Lage war, sequenzspezifischen Interaktionen mit anderen S-Proteinen einzugehen. Allerdings war auch schwach die 27 kDa Bande der unglykosylierten Chimäre im Medium zu sehen. Dies könnte auf dem Einbau weniger chimärer S-Proteine in einen Partikel beruhen, der hauptsächlich aus wildtypischen Proteinen bestand und in den Überstand sekretiert wurde.

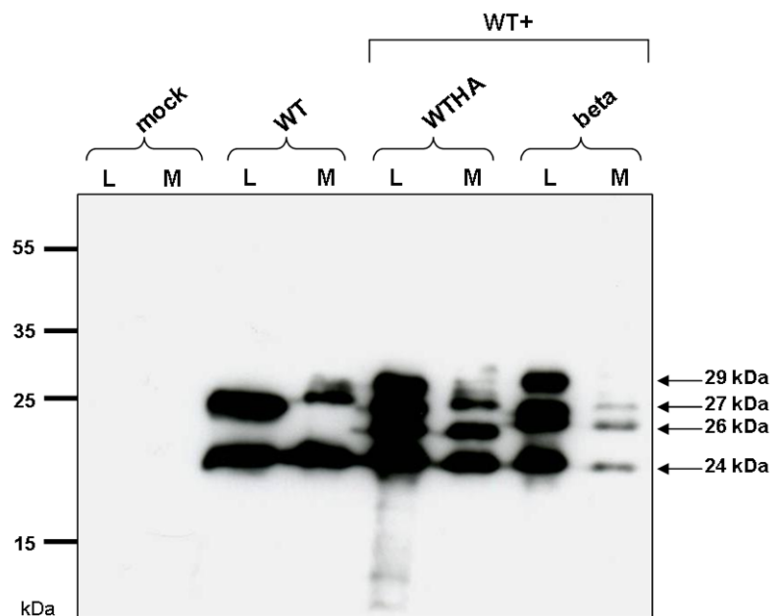


Abb. 28: Kontrolle der Koexpression und -sekretion der β -Lactamase-Chimäre mittels Western Blot. Huh7 Zellen wurden mit je 0,5 μ g des WT-Vektors und des β -Lactamase-Konstrukts kotransfiziert, für 48 h inkubiert, der Überstand geerntet und die Zellen lysiert. Die Mengen entsprechen in etwa demselben Volumenanteil. Als Kontrolle diente die Kotransfektion des HA-markierten mit dem unmarkierten WT (WTHA+ WT). L = Lysat, M = Medium

3.3.12 Intrazelluläre Lokalisation der β -Lactamase-Chimäre mit Hilfe von Immunfluoreszenz

Einen Hinweis darauf, wo in der Zelle die Blockade im sekretorischen Weg der S-Proteine mit der β -Lactamase-Domäne stattfinden könnte, sollte die Immunfluoreszenzfärbung liefern. Im Fall der beta-Chimäre war das Signal um den Zellkern herum am stärksten (Abb. 29, B) und nicht wie bei der WT-Färbung gleichmäßig über die Zelle verteilt (Abb. 29, A). Dies könnte für eine Anhäufung der sekretionsdefizienten S-Proteine in der ER-Membran sprechen. Da die Knospung in das ER-Lumen als der kritische Schritt der Partikelbildung angesehen wird, könnte dieser durch den Signalaustausch gestört worden sein. Der Phänotyp unterschied sich damit auch von dem der sekretionsdefizienten, zentralen Insertionsmutante, was auf eine Blockade in unterschiedlichen Kompartimenten hindeuten könnte.

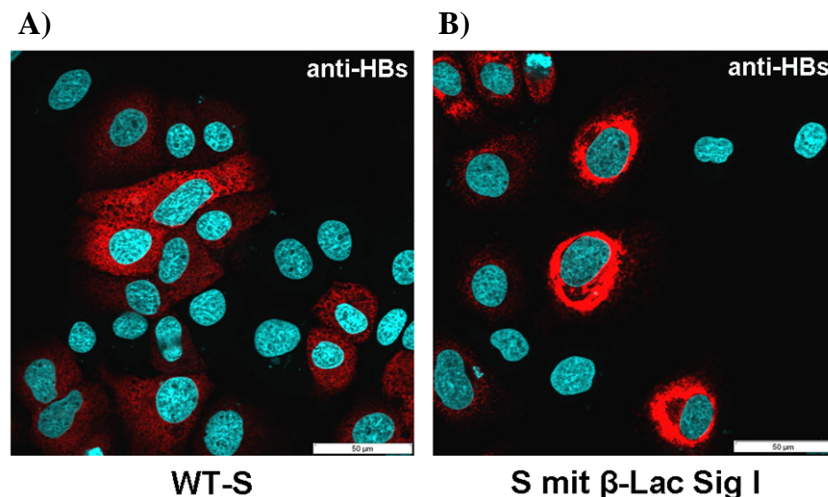


Abb. 29: Intrazelluläre Lokalisation der β -Lactamase-Chimäre. Huh7-Zellen wurden mit dem WT-Konstrukt (WT-S) und dem Konstrukt für die Expression der β -Lactamase-Chimäre transfiziert, fixiert und mit dem S-spezifischen HB1 Antikörper (1:250) gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit Alexa594 gekoppelt war. Der Messbalken entspricht 50 μ m.

3.3.13 Nachweis des mCherry-S-beta-Konstrukts mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie

Im Rahmen einer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe Bruss wurde ein sekretionskompetentes Fusionskonstrukt aus dem fluoreszierenden mCherry-Protein und dem kleinen HBV-Hüllprotein erzeugt (mCherry-S), das nicht über Antikörper gefärbt werden muss. Durch Einführung des β -Lactamase-Signals anstelle der TM1 in das Fusionsprotein (mCherry-S-beta)

sollte überprüft werden, ob sich das Konstrukt für die optische Analyse von Mutanten eignete. Das WT-S-Protein, sowie das mCherry-S und die mCherry-S-beta-Mutante wurden in Huh7-Zellen transfiziert und die Zellen nach 24 h direkt in der Zellkulturschale fixiert. Während die WT-S-Kontrolle mit den angegebenen Antikörpern gefärbt wurde, konnten die beiden Fusionskonstrukte direkt mikroskopiert werden.

Es zeigte sich, dass WT-S den gleichen Phänotyp aufwies wie in den vorherigen Messungen: die Signale waren leicht granulär und über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abb. 30, A). Auch das mCherry-S-Konstrukt war ubiquitär in der Zelle verteilt (Abb. 30, B). Im Vergleich mit dem beta-Fusionskonstrukt (mCherry-S-beta) konnte allerdings kein Unterschied beobachtet werden (Abb. 30, C). Die ringförmige Akkumulation der Proteine um den Zellkern, die bei der S-Mutante ohne das mCherry-Protein durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden konnte, war im Fusionskonstrukt nicht mehr detektierbar. Es sollte deshalb als nächstes mittels Western Blot und ELISA getestet werden, ob eventuell das zusätzliche Sekretionssignal des Rabies-Virus, das vor dem mCherry-S-Fusionsprotein lag, die Sekretionskompetenz der Mutante wiederherstellen konnte und sie deshalb einen wildtypischen Phänotyp zeigte. Dies würde gegen die Verwendung des Fusionskonstrukts für die Analyse von S-Mutanten sprechen.

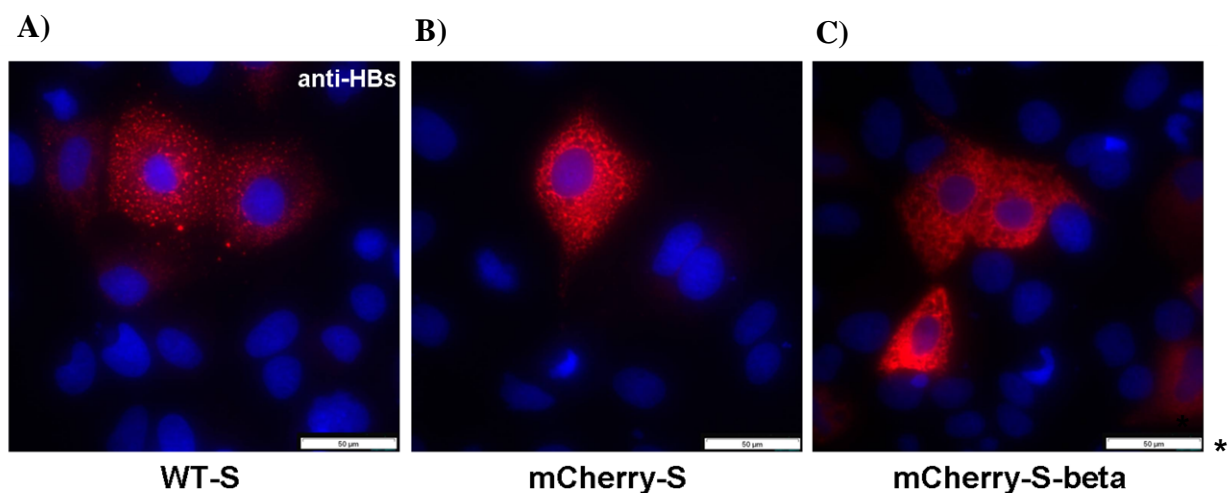


Abb. 30: Nachweis des mCherry-S-beta-Konstrukts mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Die Konstrukte wurden in Huh7-Zellen transfiziert, nach 24 h fixiert und mittels Mikroskopie ausgewertet. Die WT-S-Kontrolle (A) wurde wie in Abb. 29 angegeben mit Antikörpern gefärbt. (B) mCherry-S (Fusionsprotein aus mCherry und S), (C) mCherry-S-beta (Fusionsprotein aus mCherry-S mit dem Typ I Signal der β -Lactamase). *Aufgrund von Problemen mit der Skalierungssoftware ist der Größenbalken in A, B und C auf 50 μ m abgeschätzt.

3.3.14 Intra- und extrazellulärer Nachweis des mCherry-S-beta-Konstrukts mittels Western Blot und ELISA

Die Kontrollen zeigten im ELISA und Western Blot das erwartete Ergebnis. Sowohl das WT-S-Protein wie auch das Fusionskonstrukt mCherry-S wurden stabil in der Zelle gebildet und in das Medium sekretiert (Abb. 31, A+B). Dass die ELISA-Werte des Fusionsproteins im Medium nur etwa 25 % der Höhe des WT-S annahmen, wurde schon früher festgestellt (Masterarbeit Maria Patra, 2010) und hier bestätigt. Beide Kontrollen zeigten im Western Blot glykosylierte Formen und nicht glykosylierte Formen, sowohl für das S-Protein alleine als auch für das Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 58 kDa. Wie auch schon bei anderen Blots beobachtet, erzeugten die Konstrukte zwei zusätzliche Banden, die mögliche unvollständig glykosylierte Produkte darstellen. Diese wurden auch in vorherigen Arbeiten beobachtet (Masterarbeit Maria Patra, 2010).

Das mCherry-S-beta-Konstrukt konnte im Lysat als stabiles Protein detektiert werden und zeigte dasselbe Bandenmuster wie das mCherry-S. Das fremde Signal schien die Stabilität des Konstrukts nur wenig zu verringern. Im Medium konnten dagegen mittels ELISA-Messungen nur sehr niedrige Werte (~ 4%) detektiert werden (Abb. 31, B). Die Menge reichte aber aus, um im Western Blot ein schwaches Signal zu erzeugen. Die Banden der glykosylierten Formen von WT-S und mCherry-S zeigten im Vergleich zu den Banden im Lysat eine leichte Verschiebung nach oben, was auf die Passage des Golgi-Apparats schließen ließ. Bei mCherry-S-beta konnte aufgrund des schwachen Signals keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Mutante wirklich den Golgi passiert hatte und sekretiert wurde, was zum Phänotyp in der Immunfluoreszenz passen würde. Alternativ könnte eine geringe Menge des Proteins auch aus sterbenden Zellen ausgetreten sein. Zusammenfassend ist zu bemerken, dass mehrere andere Mutanten z.B. die zentrale Insertionsmutante der TM1 im mCherry-S-Fusionshintergrund getestet werden müssten, um eine klare Aussage über die Verlässlichkeit des Assays zu erhalten.

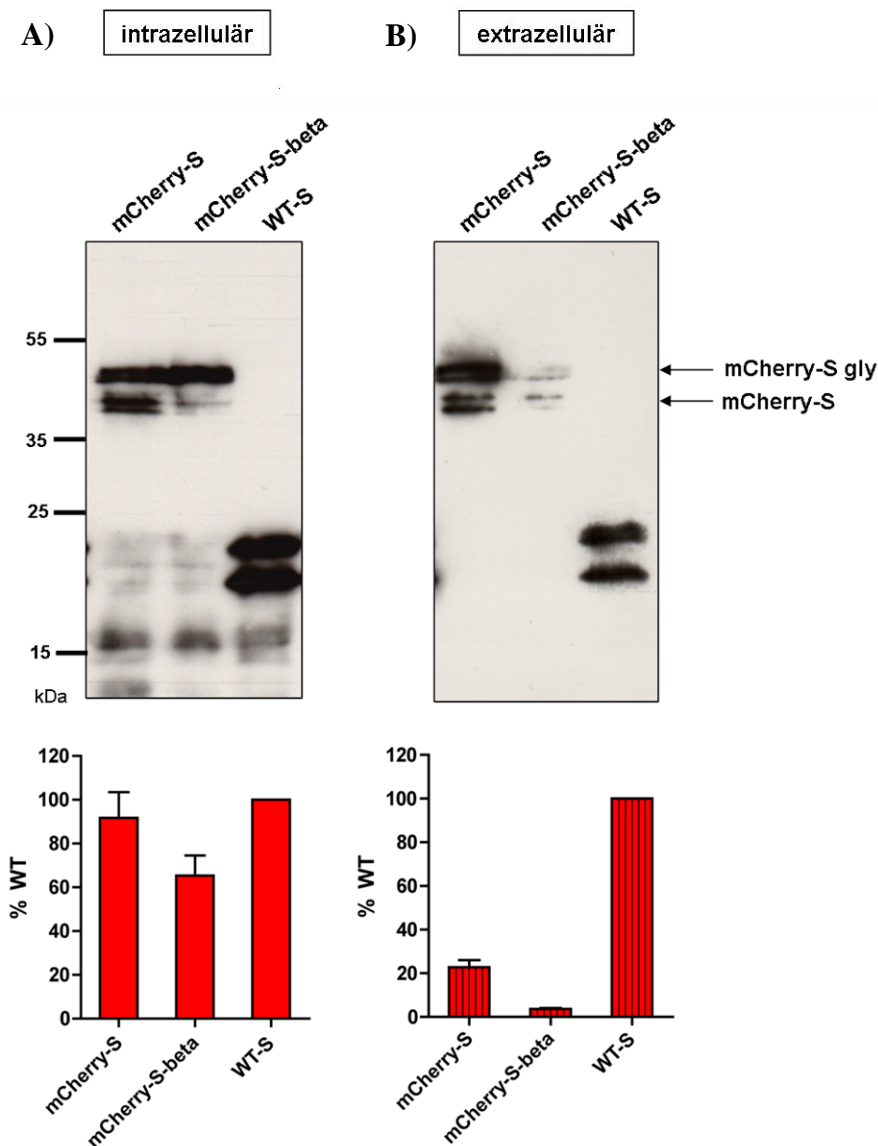


Abb. 31: Intra- und extrazellulärer Nachweis des mCherry-S-Fusionsproteins mit dem Typ I Signal der β -Lactamase. Anti-S-Western Blot und ELISA-Messungen von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B).

3.3.15 Austausch der TM1 durch die homologe Sequenz des DHBV (DTM1)

Nachdem ein vollständig fremdes Typ I Signal wie das der β -Lactamase immer noch eine korrekte Membrantopologie gewährleistete, nicht aber die Sekretion von subviralen Partikeln zuließ, wäre es interessant zu wissen, wie sich die Domäne eines verwandten Virus in dieser Position verhalten würde. Es wurde deshalb die TM1 des DHBV für diesen Versuch gewählt.

Das DHBV besitzt genauso wie das entfernt verwandte HBV die Fähigkeit, subvirale Partikel bestehend aus Lipiden und dem kleinen DHBV-Hüllprotein zu sekretieren (Marion *et al.*, 1983). Gerhardt und Bruss (1995) konnten allerdings zeigen, dass S und DHBV-S nicht gemeinsam in einen Partikel eingebaut und aus der Zelle ausgeschleust werden konnten, wenn

sie koexprimiert wurden. Dies lässt auf eine relativ präzise, sequenzspezifische Interaktion innerhalb der Hüllproteine einer Gattung schließen, die nicht zwischen Orthohepadnaviren und Avihepadnaviren konserviert ist (Gerhardt und Bruss, 1995). Es sollte nun getestet werden, ob zumindest die erste Transmembrandomäne von DHBV (DTM1) unabhängig von den übrigen Domänen eine homologe Funktion in HBV erfüllen und die TM1 von HBV komplementieren könnte. Hierzu wurde mittels überlappender PCR-Fragmente die HBV TM1 durch die homologe Sequenz des DHBV ersetzt (Abb. 32) und das Konstrukt auf seine Expression und Sekretionsfähigkeit untersucht.

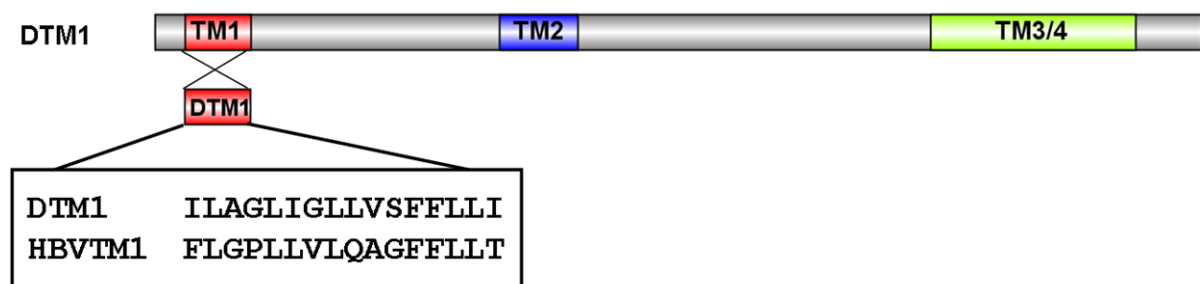


Abb. 32: Schematische Darstellung der DTM1-Chimäre. Die Aminosäuresequenz der TM1 von HBV und der TM1 von DHBV sind im Kasten dargestellt.

3.3.16 Untersuchung der DTM1-Chimäre auf ihre Stabilität, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels ELISA und Western Blot

Über die Rolle der DTM1 des DHBV ist bisher nur bekannt, dass sie für die Translokation des N-Terminus des L-Proteins über die ER-Membran notwendig ist (Grgacic, 2002). Es ist somit davon auszugehen, dass auch sie eine Typ I Signalfunktion übernimmt und deshalb im HBV-Hintergrund ein stabiles Protein erzeugen kann. Der Nachweis der DTM1-Mutante in Western Blot und ELISA in dieser Arbeit führte dagegen zu einem gegenteiligen Ergebnis: das chimäre S-Konstrukt war weder im Lysat noch im Medium detektierbar (Abb. 33, A+B). Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das eingebaute DTM1-Signal unvollständig und nicht funktional war und die Mutante mit der fremden TM1 aufgrund fehlerhafter Faltung im ER abgebaut wurde. Ein Defekt in der Expression des Proteins durch zusätzliche Mutationen im Promotor oder im ORF konnte durch Sequenzierung ausgeschlossen werden. Unwahrscheinlich war auch, dass die Mutante von den Antikörpern nicht detektiert werden konnte, da sie in der Immunfluoreszenz durch denselben Antikörper schwach nachgewiesen werden konnte (3.3.17).

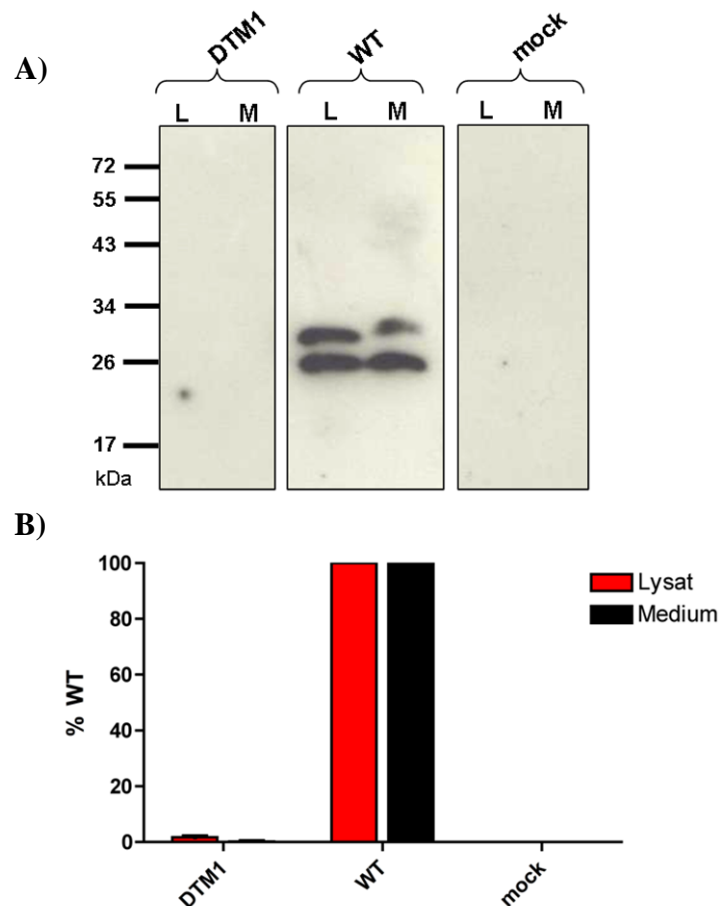


Abb. 33: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein der DTM1-Chimäre mittels Western Blot und ELISA. (A) Anti-S Western Blot von Lysaten (L) und Zellkulturüberständen (M). (B) Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein mittels HBsAg-ELISA.

3.3.17 Intrazelluläre Lokalisation der DTM1-Chimäre mittels Immunfluoreszenz

Obwohl die DTM1-Chimäre weder im Western Blot noch im ELISA nachweisbar war, konnte mit markierten Antikörpern in der Zelle ein schwaches Signal detektiert werden, das in seiner Verteilung dem Wildtyp gleich und keine Akkumulation in bestimmten Kompartimenten zeigte (Abb. 34, B). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei der Lyse der Zellen und der nachfolgenden Behandlung der Proben für den Western Blot die geringe intrazelluläre Menge des Proteins abgebaut wurde und deshalb nicht detektierbar war. Bei der Immunfluoreszenzfärbung dagegen wurden die lebenden Zellen fixiert, und die Proteine wurden durch Kreuzvernetzung in ihrem momentanen Zustand festgehalten. Die so fixierte Menge könnte ausgereicht haben, um sie mit einem spezifischen Antikörper zu färben.

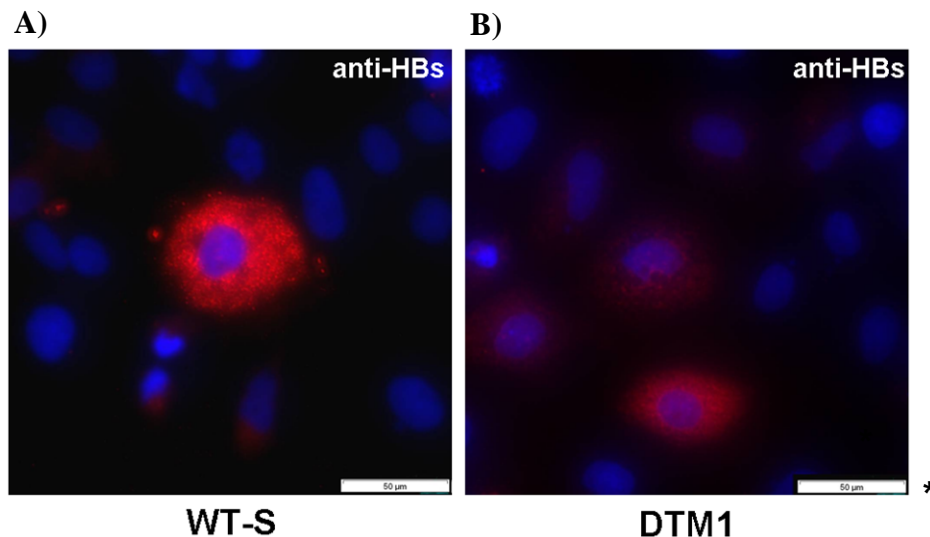


Abb. 34: Intrazelluläre Lokalisation der DTM1-Chimäre mittels Immunfluoreszenz. Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pSVBX24H (WT-S, A) und dem DTM1-Konstrukt (B) transfiziert, fixiert und mit dem S-spezifischen HB1 Antikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit Alexa594 gekoppelt war. *Aufgrund von irreversiblen Problemen mit der Skalierungssoftware ist der Größenbalken in A und B auf 50 µm abgeschätzt.

3.4 Generierung von Mutanten der zweiten Transmembrandomäne (TM2)

Homolog zu den Mutationen in der TM1 wurden in dieser Arbeit auch Insertionen, Punktmutationen und Substitutionen in die TM2 eingeführt. Die zweite Transmembrandomäne des Hepatitis B Virus ist eine interne Signalsequenz, die auch als „Stop-Transfer-Signal“ fungiert. Die Position wird aufgrund ihres stark hydrophoben Charakters zwischen Aminosäure 80 und 98 angenommen. Sie dient als Typ II Signal und liegt somit im Vergleich zur TM1 in umgekehrter Richtung in der ER-Membran: Ihr N-Terminus zeigt in Richtung des Zytosols, während der C-Terminus an das Lumen des ER grenzt. Durch diese Topologie ermöglicht sie die komplexe Struktur des kleinen Hüllproteins und verankert die Peptidkette in korrekter Orientierung in der Membran. Somit entsteht zwischen der TM1 und der TM2 eine zytosolische Schleife und zwischen der TM2 und dem hydrophoben C-Terminus die antigentragende, luminale Schleife (Eble *et al.*, 1987; Eble *et al.*, 1986).

3.4.1 Einführung von F à L Punktmutationen in die TM2

Wie auch für TM1 sollte die Rolle der exakten Primärsequenz und damit der Einfluss von Punktmutationen auf die Funktion der TM2 genauer betrachtet werden. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden die Phenylalanine an Position 80, 83, 85 und 93 sowohl einzeln als auch in Kombination durch Leucine ersetzt (Abb. 35). Dadurch wurde der hydrophobe Charakter der Domäne nicht zerstört, aber zum Beispiel mögliche Wechselwirkungen zwischen

Phenylalaninen unterbunden. Die Mutanten wurden im Rahmen einer Masterarbeit (Jeanette Navratil) und einer Bachelorarbeit (Franziska Frey) erzeugt und in der vorliegenden Arbeit auf ihre Expression und Sekretion getestet.

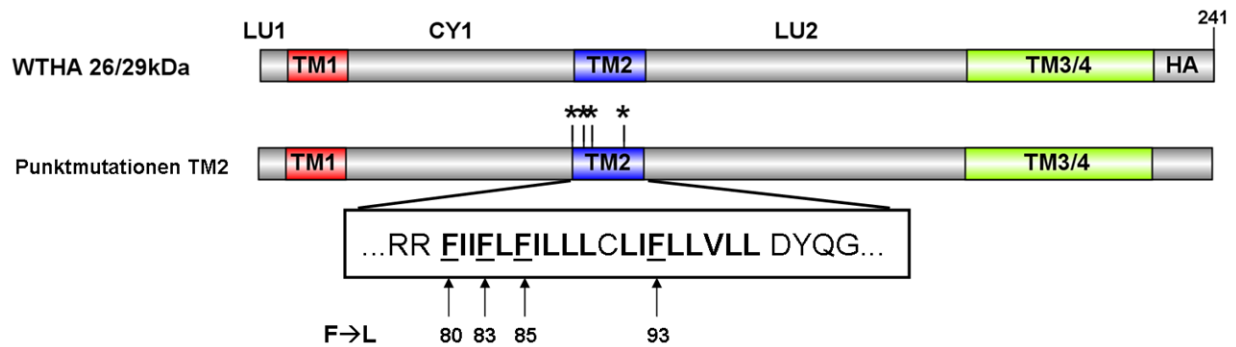


Abb. 35: Schematische Darstellung der Punktmutanten der TM2.

3.4.2 Analyse der TM2-Punktmutanten auf ihre Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Für die Punktmutanten der TM2 ließ sich sagen, dass ihre Stabilität im Vergleich zum WT unverändert war, da die Menge des HBsAg im Lysat zwischen 80 und 160 % des Wildtyps lag (Abb. 36, A, unten). Es war aber zu beobachten, dass die intrazellulären ELISA-Werte mit bis zu 160 % sehr hoch lagen und starke Schwankungen aufwiesen. Bei den Mehrfachmutanten könnten diese hohen Werte (125 – 150 %) auf die verminderte Sekretionsfähigkeit und einer daraus resultierende intrazellulären Akkumulation zurückzuführen sein (Abb. 36, B, unten). Allerdings hatten auch einige der Einzelmутanten (F80L, F83L) sehr hohe Werte für die Lysat-Messungen, obwohl sie nicht in ihrer Sekretion gestört waren. Dies erforderte eine kritischere Betrachtungsweise der Messungen. Zudem konnte der Western Blot die Ergebnisse des ELISAs nicht vollständig bestätigen, da die Mutanten F93L, F80/83L, F80/85L und F83/85L im Lysat ein schwächeres Signal als der WT aufwiesen (Abb. 36, A, oben). Ob dies durch Probleme beim Blotten hervorgerufen wurde, ließ sich auch nach Wiederholung nicht endgültig klären. Deutlich zu erkennen war dagegen, dass alle Mutanten eine korrekte Topologie der TM2 hatten, was durch die vorhandene N-Glykosylierung an Asn146 gekennzeichnet war. Auch bezüglich der Sekretionsfähigkeit der Punktmutanten war das Ergebnis nicht eindeutig. Tendenziell konnte von einem negativen additiven Effekt der Punktmutationen gesprochen werden, d.h. je mehr Mutationen eingeführt wurden, umso schlechter war die Fähigkeit zur Bildung subviraler Partikel. Eine vollständige Blockade der

Partikelabgabe konnte aber nicht beobachtet werden (Abb. 36, B). Da die Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten nur um die 10-15 % ausmachten, konnte auch der Western Blot keine starke Abnahme des Signals von Einzelmutanten zu Mehrfachmutanten abbilden (Abb. 36, B, oben).

Im Allgemeinen ließ sich feststellen, dass sowohl die ELISA-Werte als auch die Western Blot Signale im Vergleich mit den TM1-Punktmutanten eine erhöhte Schwankung in Höhe bzw. Stärke zeigten. Dies könnte darauf beruhen, dass die für die Transfektion verwendeten Plasmidpräparationen unterschiedlich durchgeführt wurden (Qiagen Maxiprep Kit und alkalische Lyse s. Material und Methoden) und deshalb unterschiedliche Qualität hatten. Die Konzentration der Proben wurde allerdings für jede Transfektion neu ermittelt und die Mengen entsprechend angeglichen. Im Falle der Punktmutanten der TM2 wäre eine Neupräparation der Plasmide und eine Quantifizierung der Western Blot Signale ein Lösungsvorschlag, um die beobachteten Tendenzen zu verifizieren.

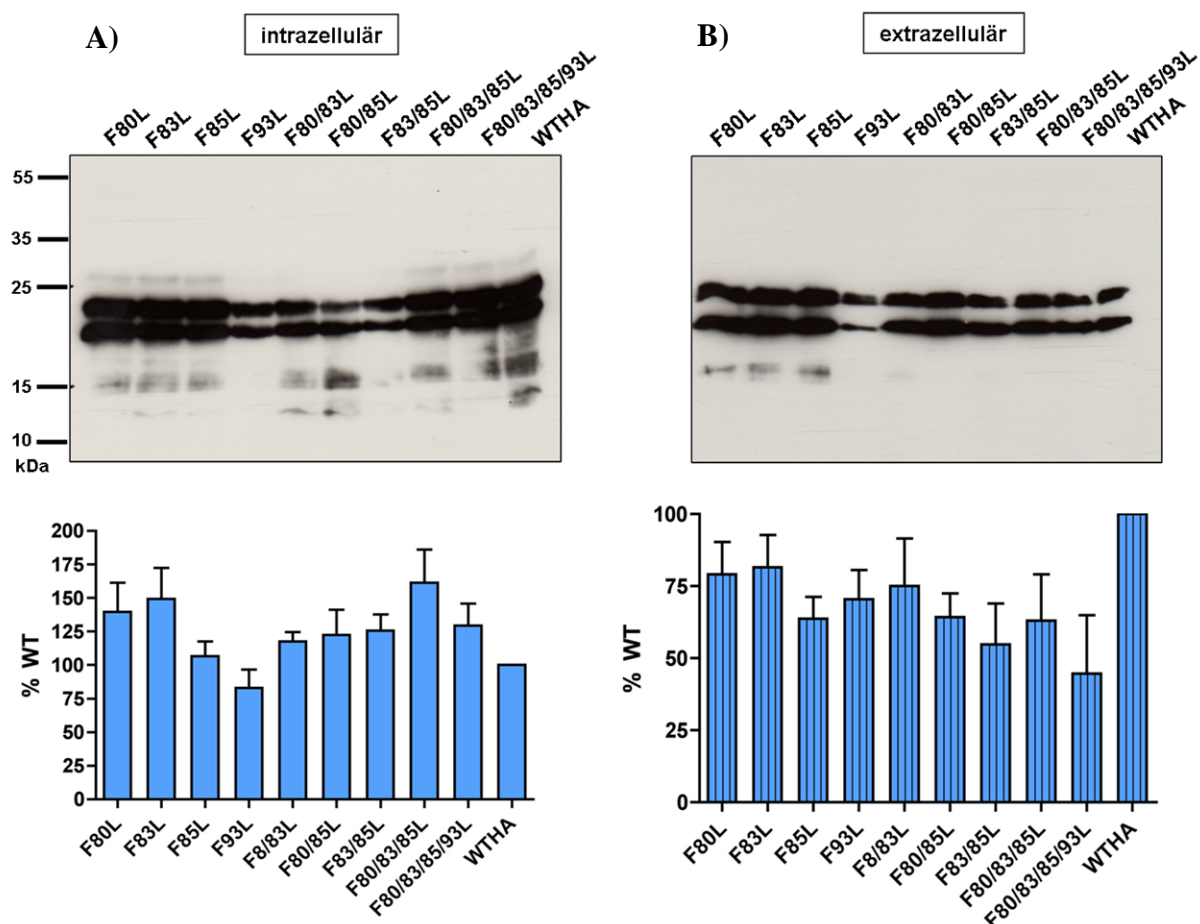


Abb. 36: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein von F à L Punktmutanten in der TM2 mittels anti-S Western Blot und ELISA-Messungen von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) der einzelnen Mutanten. Die Blots stellen repräsentativ das Ergebnis einer ELISA-Messung dar.

3.4.3 Einführung von Alanin-Insertionen in den N-terminalen, zentralen und C-terminalen Abschnitt der TM2

Da das TM2-Signal Punktmutationen in der Primärsequenz tendenziell weniger effektiv tolerieren konnte als die TM1, sollte nun auch ein Vergleich hinsichtlich Veränderungen in der Helixorientierung gezogen werden. Wie in TM1 wurde ein zusätzliches Alanin an die N-terminale (AS 81) und C-terminale Grenze (AS 98) der zweiten Transmembrandomäne, sowie in den zentralen Abschnitt (AS 86) eingeführt (Abb. 37). Um ein Expressions- und Sekretionsprofil der Konstrukte zu erhalten, wurden die Plasmide in Huh7-Zellen transfiziert und wie für TM1 beschrieben behandelt.

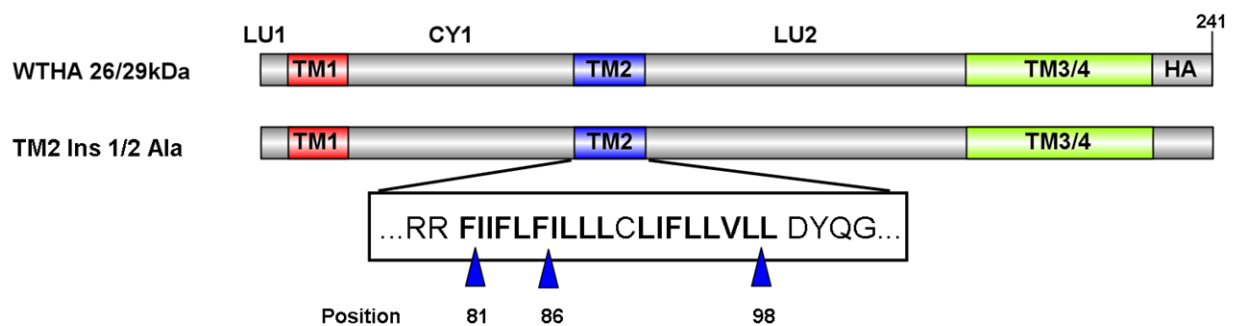


Abb. 37: Schematische Darstellung der Insertionsmutanten der TM2.

3.4.4 Analyse der TM2-Insertionsmutanten auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Trotz zusätzlicher Aminosäuren in TM2 war die Topologie aller drei Mutanten korrekt, da im Lysat die glykosylierte 29 kDa Form auf dem Blot sichtbar war (Abb. 38, A). Weil der zentralen Insertionsmutante das HA-Epitop fehlte, war hier die Bande bei 27 kDa.

Bezüglich ihrer Stabilität unterschieden sich die einzelnen Insertionsmutanten allerdings deutlich. Während die N-terminale dem Zytoplasma zugewandte Insertion nur eine schwache Verminderung des intrazellulären ELISA-Signals um ca. 40 % im Vergleich zum Wildtyp verursachte, waren die zentralen und C-terminalen Insertionsmutanten instabiler. Die intrazelluläre S-Menge betrug hier nur noch zwischen 20 und 40 % des Wildtyps (Abb. 38, A). Eine korrekte Topologie der TM2 schien somit nicht die einzige Voraussetzung für ein stabiles Protein zu sein. Andere Faktoren wie zum Beispiel spezifische Interaktionen könnten für die Stabilisierung ebenfalls eine Rolle spielen.

Unabhängig von ihrem Einfluss auf die Stabilität, verhinderten alle drei Insertionen die Sekretion von subviralen Partikeln vollständig. Es konnten weder durch ELISA noch durch Western Blots Hüllproteine im Medium nachgewiesen werden (Abb. 38, B). Im Gegensatz zu TM1 beeinflusste die Position der Insertion nicht nur die Sekretionsfähigkeit, sondern auch die Stabilität des Proteins.

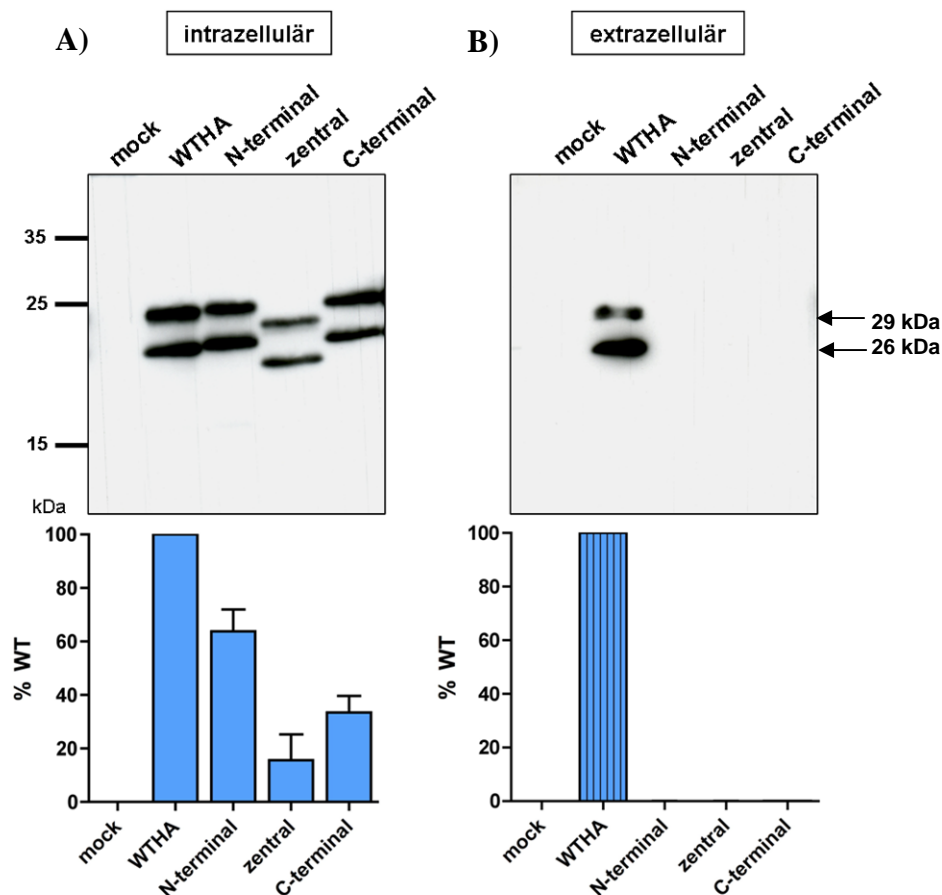


Abb. 38: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein von TM2-Insertionsmutanten mittels Western Blot und ELISA. Anti-S Western Blot und ELISA-Messungen von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) der N-terminalen, zentralen und C-terminalen Insertionsmutante. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit der HA-markierten WT-Variante oder mit PBS (mock) transfiziert wurden.

3.4.5 Intrazelluläre Lokalisation der TM2-Insertionsmutanten mittels Immunfluoreszenz

Weil jede der Insertionsmutanten einen negativen Sekretionsphänotyp aufwies, sollte geklärt werden, ob die mutierten S-Proteine in bestimmten Kompartimenten aggregierten. Dies konnte schon für die zentrale Insertion bei TM1 mittels Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden. Auch für die Insertionsmutanten der TM2 war eine Akkumulation zu beobachten. Im Vergleich zum gleichmäßig über das Zytoplasma verteilten WT-S (Abb. 39, A) war das S-spezifische, rote

Signal bei den Mutanten eher auf größere Granulae konzentriert. Besonders für die N- und C-terminale Insertionsmutante war dieser Effekt deutlich zu sehen, während die zentrale Mutante in ihrer Ausprägung eher dem WT glich (Abb. 39, B/C/D). Um zu klären, wo genau sich die Proteine ansammelten, müssten noch Kofärbungen mit Kompartiment-spezifischen Antikörpern durchgeführt werden.

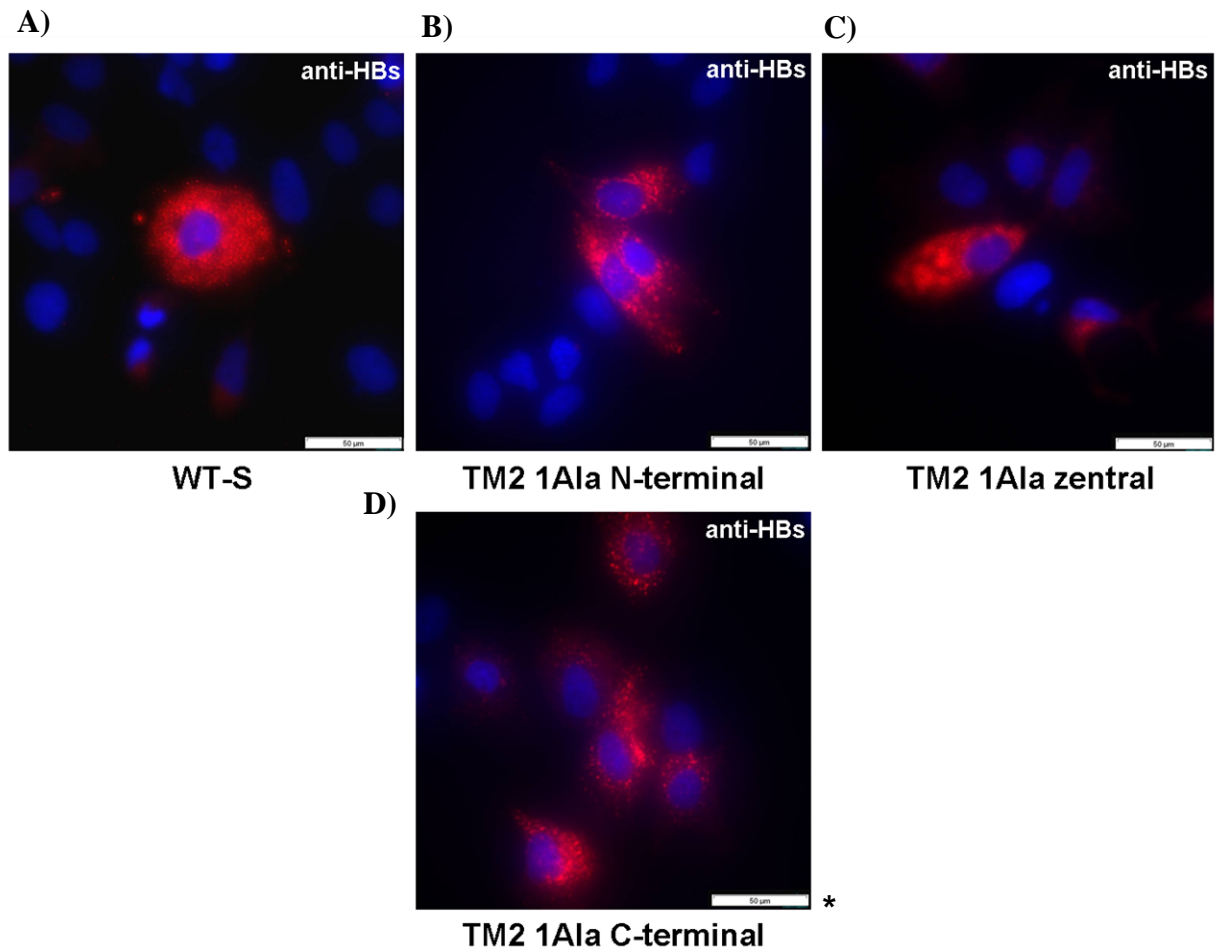


Abb. 39: Intrazelluläre Lokalisation der TM2-Insertionsmutanten mittels Immunfluoreszenz. Huh7-Zellen wurden mit pSVBX24H (WT-S, A) und den Konstrukten für die Expression der TM2-Insertionsmutanten (N-terminal (B), zentral (C) und C-terminal (D)) transfiziert, fixiert und mit dem S-spezifischen HB1 Antikörper gefärbt. Als Sekundäntikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit Alexa594 gekoppelt war. *Aufgrund von Problemen mit der Skalierungssoftware ist der Größenbalken in A - D auf 50 µm abgeschätzt.

3.4.6 Untersuchung der Koexpression und -sekretion der TM2-Insertionsmutanten mit WT-S mittels Western Blot

Die Beobachtung für TM1, dass sekretionsdefiziente Mutanten auch die Sekretion des Wildtyps blockieren oder hemmen konnten, bestätigte sich auch für die Insertionsmutanten der TM2. Diese waren, wie oben gezeigt, unabhängig von der Position der zusätzlichen Alanine nicht mehr in der Lage, subvirale Partikel in den Zellkulturüberstand abzugeben. Wurde nun

wildtypisches S-Protein zusammen mit dem mutierten S-Protein in der Zelle exprimiert, waren beide Proteinformen ähnlich stark detektierbar (WT: 24 und 27 kDa, Mutante: 26 und 29 kDa), was möglicherweise auf eine Stabilisierung der Mutante durch den Wildtyp hindeuten könnte. Da, wie oben erwähnt, die zentrale Insertionsmutante nicht das zusätzliche Hämagglutinin-Epitop trug, wurde sie mit dem HA-markierten Wildtyp (WTHA) koexprimiert (Abb. 40, A). Die Anwesenheit der sekretionsdefizienten Mutanten innerhalb der Zelle hatte zur Folge, dass sowohl die Sekretion der Mutante als auch die des Wildtyps stark inhibiert war (Abb. 40, B). Die veränderte Helixorientierung, die bei alleiniger Expression der Mutante die Bildung von subviralen Partikeln unterbunden hatte, ließ sich scheinbar auch nicht durch die Bereitstellung wildtypischer Helices komplementieren.

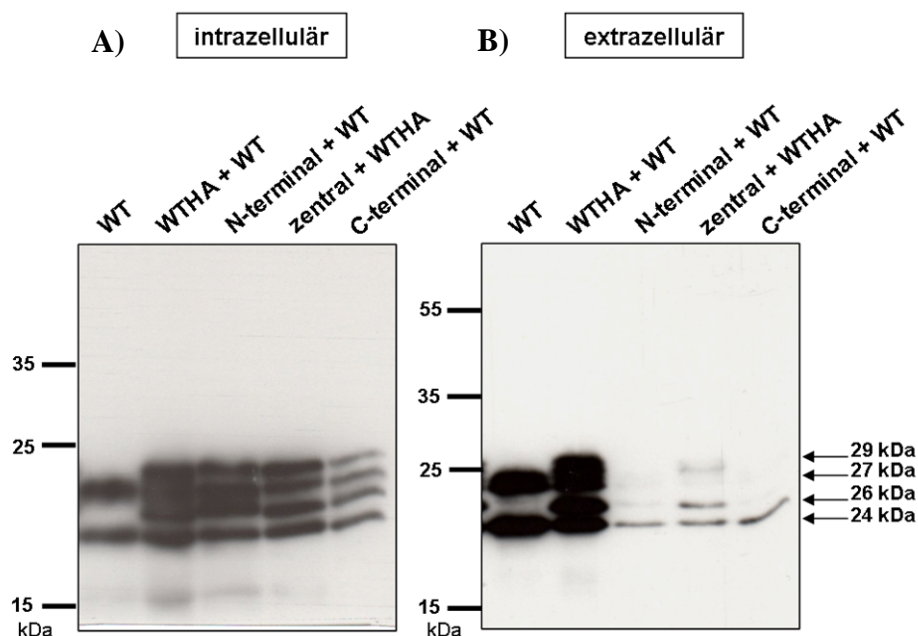


Abb. 40: Untersuchung der Koexpression und –sekretion der TM2-Insertionsmutanten mittels Western Blot. Huh7 Zellen wurden mit je 0,5 µg des WT-Vektors und der Konstrukte für die Expression der Insertionsmutanten kotransfiziert, für 48 oder 72h inkubiert, der Überstand geerntet und die Zellen lysiert. Dargestellt sind die anti-S Western Blots der Zelllysate (A) und der Zellkulturüberstände (B).

3.4.7 Austausch der TM2 durch das Typ II Signal des humanen Transferrin-Rezeptors

Für die TM1 konnte gezeigt werden, dass ein Austausch durch ein funktionell homologes Signal die ursprüngliche Topologie und Stabilität des Proteins bewahren konnte. Die Frage war deshalb, ob auch das komplexere zweite Transmembransignal topologisch durch ein fremdes Signal ersetzt werden könnte. Da es sich um ein Typ II Signal handelt, wurde das bekannte Typ II Signal des humanen Transferrin-Rezeptors (HTR) als Austauschsequenz gewählt (Abb.

41). Dieser Rezeptor liegt in der Zytoplasmamembran und ist für die Aufnahme von Eisen aus dem Blut über das sekretierte Protein Transferrin zuständig. Ein hydrophober Bereich von Aminosäure 62 bis 89 dient als transmembranes Typ II Signal (Mc Clelland *et al.*, 1984, Zerial *et al.*, 1986). Diese Region mit Ausnahme des Cysteins an Position 89 wurde mittels überlappender PCR Fragmente anstelle der TM2 in die Sequenz des kleinen HBV Hüllproteins eingeführt. Verglichen mit der TM2 war das Typ II Signal des HTR aber mit 27 Aminosäuren um acht Aminosäuren länger als die ursprüngliche HBV-Sequenz (19 Aminosäuren). Da die Länge einer Transmembrandomäne für seine Position und Orientierung eine wichtige Rolle spielt, sollte das inserierte Signal auf 19 Aminosäuren verkürzt werden. Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese wurden jeweils vier Aminosäuren im N-terminalen und im C-terminalen Bereich deletiert. Das Endprodukt „Transdel8aa“ hatte eine Länge von 19 Aminosäuren.

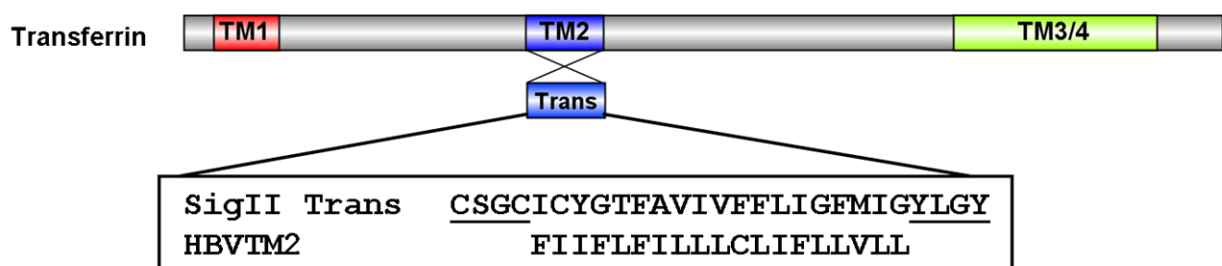


Abb. 41: Schematische Darstellung der Transferrin-Chimäre. Im Vergleich zu der von McClelland *et al.* (1984) veröffentlichten Sequenz wurde das Cystein an Position 89 nicht zur Domäne hinzugezählt. Die Aminosäuren, die mittels Mutagenese deletiert wurden, um die Domäne auf die Länge der TM2 zu kürzen, sind unterstrichen.

3.4.8 Analyse der Transferrin-Chimären auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Sowohl das Konstrukt mit dem gesamten HTR Typ II Signal als auch die verkürzten Varianten wurden intrazellulär auf ihre korrekte Topologie und Stabilität und extrazellulär auf ihre Sekretion geprüft. Keine der Chimären bildete ein Protein, das im ELISA deutlich nachweisbar war. Die intrazelluläre HBsAg-Menge der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp lag bei weniger als 10 % (Abb. 42, B). Diese Beobachtung konnten auch Bruss und Ganem (1991b) machen, die schon einmal die TM2 durch das unverkürzte Typ II Signal des HTR ersetzt hatten und in ihren „pulse-chase“-Experimenten kein stabiles Protein nachweisen konnten. Dass die geringe Menge an S-Protein, die nachweisbar war, eine korrekte Topologie aufwies, ließ sich durch das Erscheinen der nicht glykosylierten und glykosylierten Form im Lysat-Western Blot

der unverkürzten und N-terminal verkürzten Variante (Trans und TransdelVO), sowie der Transdel8aa-Mutante nachweisen (Abb. 42, A). Eine Ausnahme bildete die Chimäre, die am C-terminalen Ende um vier Aminosäuren verkürzt wurde (TransdelHI). Bei ihr war die glykosylierte Bande sehr schwach, was neben ihrer Instabilität auf eine fehlerhafte Topologie schließen ließ. Das stärkste Signal im Western Blot mit der geringsten Standardabweichung im ELISA lieferte die auf TM2-Länge verkürzte Mutante (Transdel8aa). Die exakte Anzahl der Aminosäuren hatte möglicherweise einen leicht positiven Effekt auf die Insertion der Transmembranhelix und somit auf die Stabilität des Proteins. Deshalb wurde für die weiteren Analysen nur diese Mutante verwendet. In keinem der Zellkulturüberstände konnte S-Protein detektiert werden, was entweder auf eine defiziente Sekretion schließen ließ oder dass die Proteine aufgrund ihrer geringen Stabilität keine Partikel bilden konnten. Eine vollständige Komplementation der TM2 war weder für die Stabilität noch für die Sekretion durch das Typ II Signal des HTR möglich.

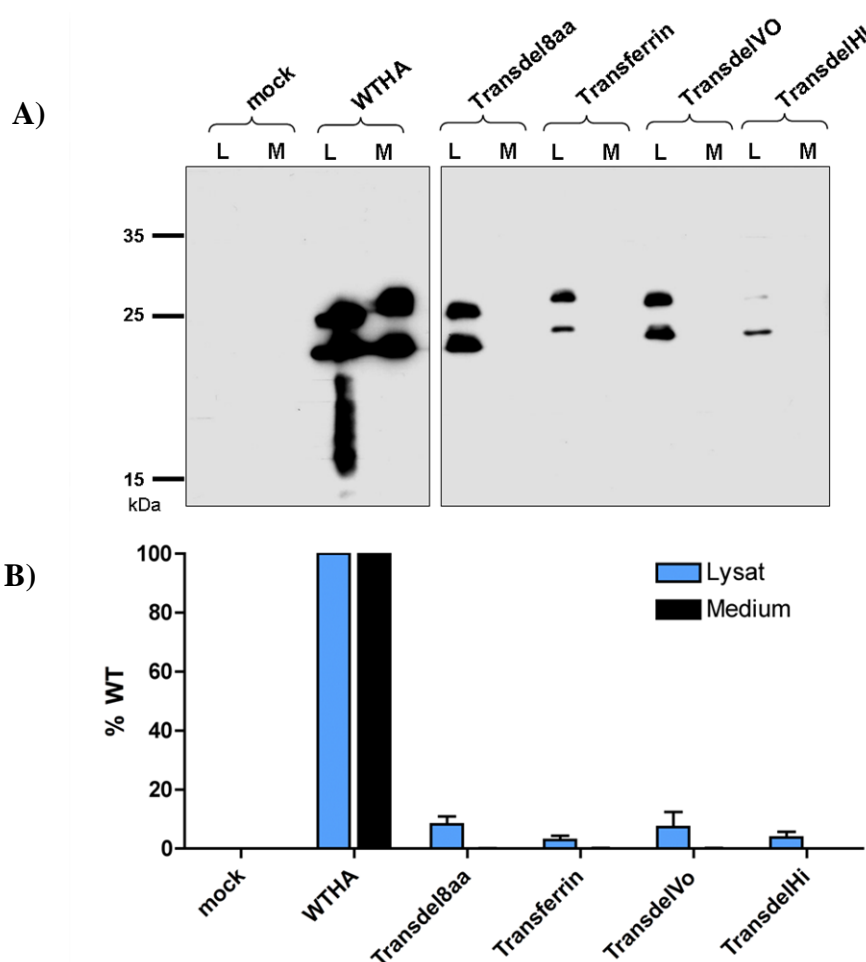


Abb. 42: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein der Transferrin-Chimären mittels Western Blot und ELISA. (A) Anti-S Western Blot von Lysaten (L) und Zellkulturüberständen (M) der einzelnen Mutanten. (B) Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein mittels HBsAg-ELISA. Transferrin (vollständiges Typ II Signal des HTR), Transdel8aa (um 8 AS verkürztes Typ II Signal des HTR), TransdelVO (N-terminal um 4 AS verkürztes Typ II Signal des HTR), TransdelHI (C-terminal um 4 AS verkürztes Typ II Signal des HTR).

3.4.9 Intrazelluläre Lokalisation des Transdel8aa-Konstrukts mittels Immunfluoreszenz

Der intrazelluläre Nachweis der Mutante mit dem verkürzten HTR-Transmembransignal mittels Immunfluoreszenz war aufgrund ihrer Instabilität schwierig. Im Vergleich zum starken Signal des Wildtyp S-Proteins im gesamten Zytoplasma, war das Signal der Transdel8aa-Mutante schwach detektierbar. In einigen Zellen konnten schwache, partikuläre Signale lokalisiert werden, die kleinen Vesikeln glichen und auch über das Zytoplasma verteilt waren (Abb. 43, B). Diese Strukturen waren auch in einigen Wildtyp-Färbungen erkennbar, weshalb es sich auch neben echten zellulären Strukturen um Antikörper-Artefakte handeln könnte.

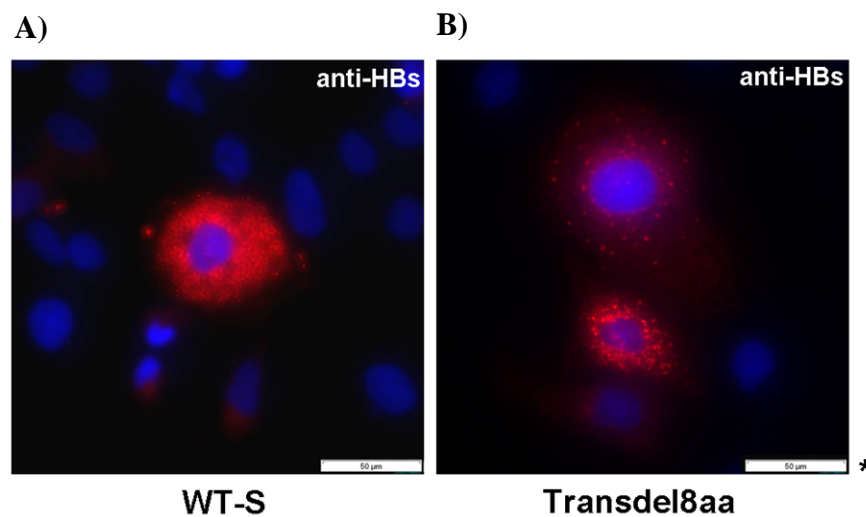


Abb. 43: Intrazelluläre Lokalisation der Transdel8aa-Chimäre mittels Immunfluoreszenz. Nach Transfektion von Huh7-Zellen mit dem Plasmid pSVBX24H (WT-S, A) und dem Transdel8aa-Konstrukt (B) wurden die Zellen fixiert und mit dem S-spezifischen HB1 Antikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit Alexa594 gekoppelt war. Transdel8aa (um 8 Aminosäuren verkürztes Typ II Signal des HTR). *Aufgrund von Problemen mit der Skalierungssoftware ist der Größenbalken in A und B auf 50 µm abgeschätzt.

3.4.10 Untersuchung der Koexpression und -sekretion des Transdel8aa-Konstrukts mit WT-S

Obwohl die Mutante mit dem verkürzten Transferrin-Rezeptor-Signal nur in sehr geringer Menge im Inneren der Zelle detektiert werden konnte, sollte ihr Einfluss auf den Wildtyp untersucht werden. Die beiden Konstrukte wurden gleichzeitig in Huh7-Zellen transfiziert und die Menge des S-Proteins in Lysat und Medium mittels Western Blot detektiert. Verglichen mit der Positivkontrolle (WT+WTHA) war die intrazelluläre Menge des Wildtyps bei der Koexpression mit der Mutante (Transdel8aa) etwas vermindert, aber dennoch deutlich zu erkennen. Die beiden Banden (26 kDa und 29 kDa) der Mutante waren schwächer als die des

Wildtyps, was sich durch die oben gezeigte geringe Stabilität des chimären Proteins erklären ließe (Abb. 44, L). Die Anwesenheit von wildtypischen Helices in der Membran konnte somit die Chimäre nicht stabilisieren und auch ihre Sekretionsfähigkeit nicht wiederherstellen. Die Sekretion des Wildtyps wurde dagegen durch die instabilen, chimären S-Proteine im Inneren der Zelle nur wenig beeinflusst. Eine starke negative Transdominanz wie sie zum Beispiel für die TM2-Insertionsmutanten gezeigt werden konnte, verursachte das fremde Typ II Signal somit nicht.

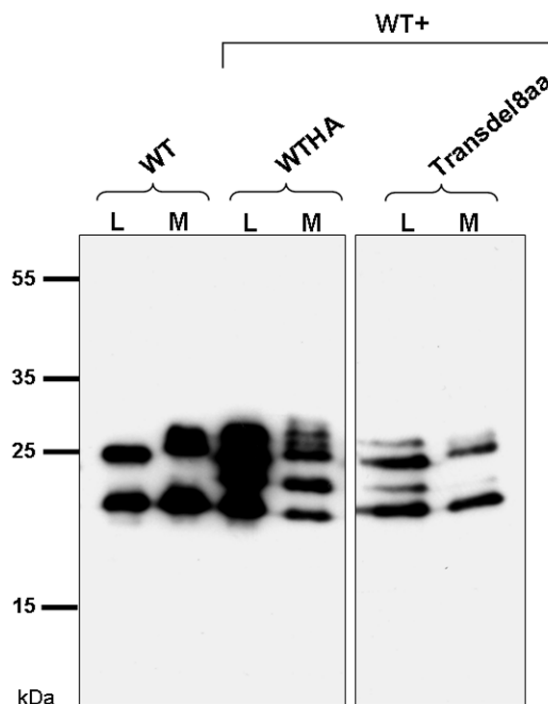


Abb. 44: Untersuchung der Koexpression und –sekretion der verkürzten Transdel8aa-Mutante mit WT-S. Der Western Blot wurde mit dem S-spezifischen HB1 Antikörper entwickelt. (L) Lysat, (M) Medium, (WTHA) WT mit HA-tag.

3.4.11 Austausch der TM2 durch die homologe Sequenz des DHBV (DTM2)

Ein fremdes Signal wie die Transmembrandomäne von HTR konnte TM2 topologisch nicht komplementieren und führte zu einer Destabilisierung des Proteins. Deshalb sollte nun wie auch für die TM1 die Funktion der homologen TM2 von DHBV im HBV-Hintergrund getestet werden (Abb. 45). Wie auch bei HBV ist die DTM2 durch starke Hydrophobizität gekennzeichnet und wirkt vermutlich ebenfalls als ein Typ II Signal. Neben der auffälligen Sequenzhomologie im N-terminalen Bereich, machten diese Aspekte eine mögliche Komplementation der beiden Domänen wahrscheinlich. Der Austausch erfolgte durch die Fusion überlappender PCR-Fragmente und das Konstrukt wurde analog zu den anderen Mutanten getestet.

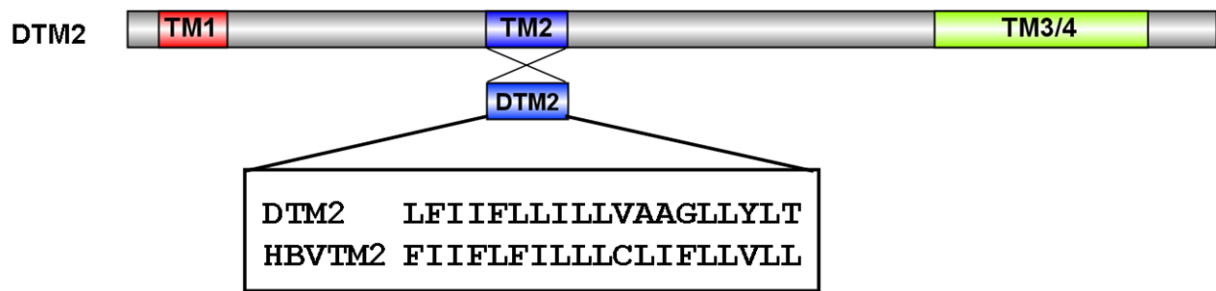


Abb. 45: Schematische Darstellung der DTM2-Chimäre. Aminosäuresequenzvergleich des TM2 von HBV und der TM2 von DHBV.

3.4.12 Analyse der DTM2-Chimäre auf Stabilität, Topologie, N-Glykosylierung und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Entgegen der Erwartungen lieferte die Mutante mit der homologen Domäne des DHBV kein stabiles Protein. Das ELISA-Signal, das im Zellysate detektiert werden konnte, entsprach in seiner Stärke nur etwa 10 % des Wildtypsignals und das chimäre Protein war eventuell durch seine Instabilität in seiner Sekretion blockiert (Abb. 46, B). Da das N-Glykosylierungsprofil der Chimäre auf dem Western Blot dem des Wildtyps entsprach, nahm zumindest ein kleiner nachweisbarer Teil der Proteine für kurze Zeit die korrekte Topologie an (Abb. 46, A). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein komplexes internes Signal wie die TM2 des HBV sowohl topologisch als auch funktionell zusätzliche Aufgaben übernehmen muss, die die eines einfachen Typ II Signals übersteigen.

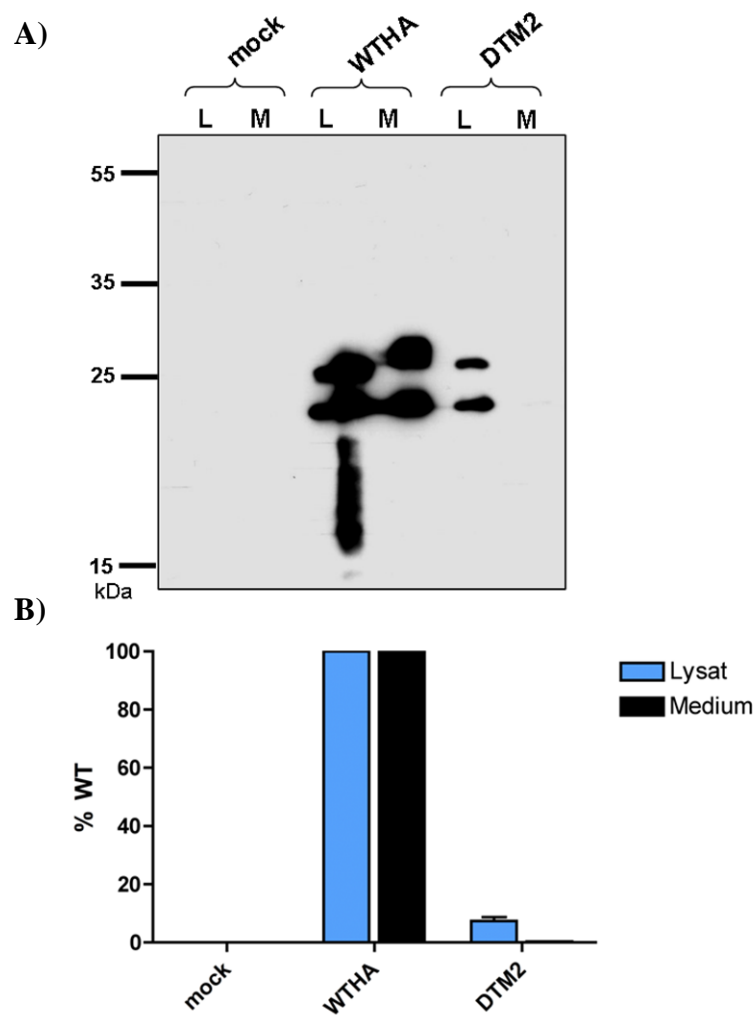


Abb. 46: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein der DTM2-Chimäre mittels Western Blot und ELISA. (A) Anti-S Western Blot von Lysaten (L) und Zellkulturüberständen (M). (B) Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein mittels HBsAg-ELISA.

3.4.13 Intrazelluläre Lokalisation der DTM2-Chimäre mit Hilfe der Immunfluoreszenz

Die intrazelluläre Detektion der DTM2-Mutante ergab ein ähnliches Bild wie die Färbung des Wildtyps. Beide S-Proteine waren gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt und wiesen keine Aggregationen in speziellen Kompartimenten auf. Zudem war das Signal sowohl beim WT als auch bei der Mutante deutlich detektierbar (Abb. 47, A+B). Dies widersprach teilweise den Ergebnissen aus ELISA und Western Blot, in denen das Mutanten-Signal deutlich schwächer war als das der WT-Kontrolle. Eine Erklärung könnte sein, dass die Fixierung und Kreuzvernetzung der Proteine in der Zelle durch PFA zu einer Verstärkung des Signals führte, wie auch für die DTM1 beobachtet.

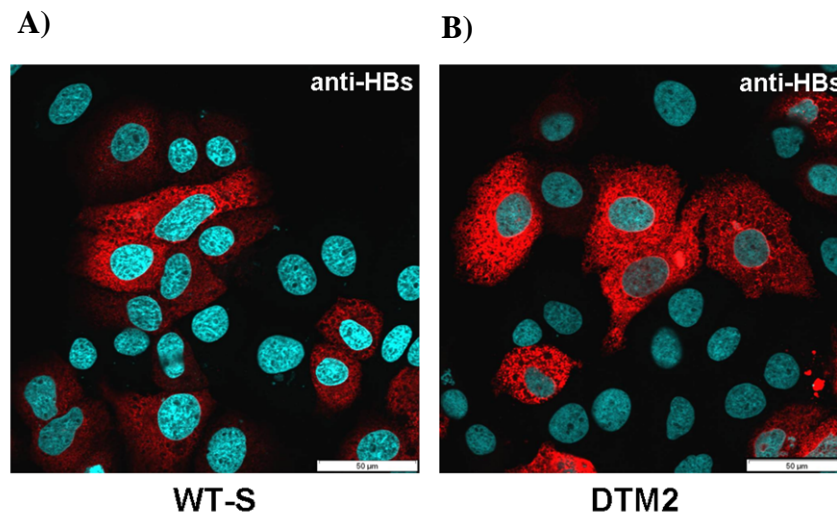


Abb. 47: Intrazelluläre Lokalisation der Chimäre mit der TM2 von DHBV mittels Immunfluoreszenz. Vor der Färbung wurden Huh7-Zellen mit dem WT-S-Konstrukt (WT-S, A) und dem DTM2-Konstrukt (B) transfiziert, fixiert und mit dem S-spezifischen HB1 Primärantikörper und einem Alexa594-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Der Messbalken entspricht 50 µm.

3.4.14 Untersuchung der Koexpression und -sekretion der DTM2-Chimäre mit WT-S mittels Western Blot

Eine Möglichkeit zur Stabilisierung der instabilen DTM2-Mutante könnte die Koexpression mit dem wildtypischen Hüllprotein darstellen. Durch Kotransfektion der beiden Konstrukte in Huh7-Zellen sollte analysiert werden, ob die Bereitstellung der WT-TM2 die Mutante zum Beispiel durch Interaktionen zwischen den S-Ketten stabilisieren kann. Dieser Effekt konnte intrazellulär beobachtet werden: sowohl die Proteinbanden des WTs als auch die der DTM2-Mutante waren stark und deutlich detektierbar (Abb. 48, L). Allerdings konnte die Sekretionsfähigkeit der Mutante dadurch nicht wiederhergestellt werden und dieser sekretionsdefizienten Phänotyp verursachte zudem eine verminderte Sekretion des Wildtyps (Abb. 48, M). Der transdominant negative Effekt war allerdings weniger ausgeprägt als in den Insertionsmutanten, was darauf hindeutet, dass die ähnliche DHBV-Sequenz zu einer Interaktion der S-Ketten beitragen könnte, die das Protein stabilisieren kann, aber die Sekretion nur eingeschränkt zulässt.

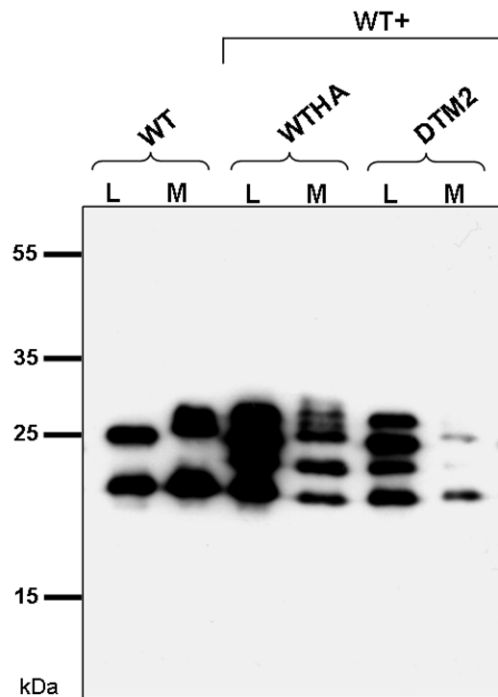


Abb. 48: Untersuchung der Koexpression und –sekretion der DTM2-Chimäre mit WT-S. (L) Lysat, (M) Medium, (WTHA) WT mit HA-Epitop.

3.5 Generierung von Mutanten der dritten Transmembrandomäne (TM3) und des hydrophoben C-Terminus

Der C-Terminus des kleinen Hüllproteins S beinhaltet zwei hydrophobe Bereiche, die möglicherweise als Transmembrandomänen wirken: AS 179 - 201 und AS 205 - 225. Ihre Hydrophobizität ist schwächer als z.B. die von TM2 und es ist noch nicht experimentell geklärt, ob die Domänen in die Membran inserieren. Für eine solche Topologie spricht die Tatsache, dass das C-terminale Ende des Proteins auf der luminalen Seite der ER-Membran liegt und somit transloziert werden muss (Eble *et al.*, 1986). Zudem liegt zwischen Aminosäure 154-174 eine amphipathische Helix (AH, persönliche Mitteilung Camille Sureau), deren Rolle, ebenso wie die des C-Terminus, noch nicht geklärt ist. Mit Insertionen und Substitutionen sollte deren Funktion in der Partikelbildung untersucht werden.

3.5.1 Einführung von Alanin-Insertionen in die amphipathische Helix und den N-terminalen und zentralen Abschnitt der TM3

Wie für TM1 und TM2 wurden Alanine in die TM3-Sequenz inseriert, um die Orientierung und Position der Aminosäuren zu verändern. Da die C-terminalen Transmembrandomänen aufgrund ihrer schwachen Hydrophobizität nicht genau definiert werden konnten, wurde in dieser Arbeit die Sequenz von AS 179 – 201 aufgrund einer Transmembranhelix-Vorhersage

als TM3 definiert (Abb. 49). Sowohl in ihren N-terminalen (Position 184) als auch zentralen Bereich (Position 192) wurde ein zusätzliches Alanin eingeführt. In einer amphipathischen Helix ist die genaue Position der Aminosäuren sehr wichtig, um den hydrophilen bzw. lipophilen Charakter der beiden Helixseiten zu erhalten. Deshalb wurde auch in die amphipathische Helix des HBV (AS 154-174) ein Alanin inseriert, um die Funktion der Helix zu stören.

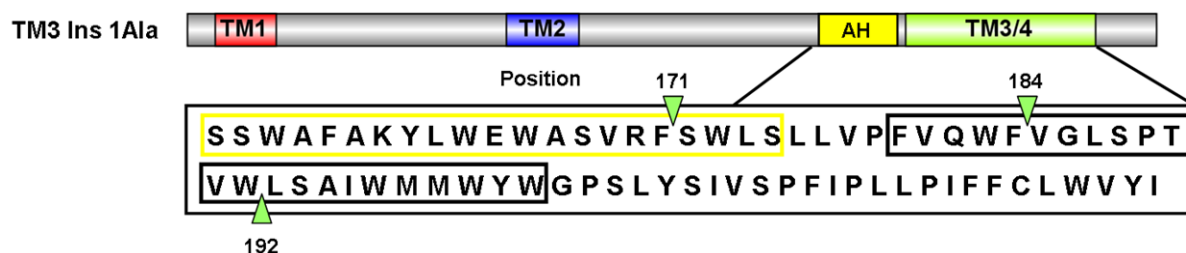


Abb. 49: Schematische Darstellung der Insertionsmutanten der TM3. Die TM3 ist in schwarz umrahmt. AH = amphipathische Helix (gelb).

3.5.2 Analyse des Einflusses von Alanin-Insertionen in der TM3 und der amphipathischen Helix auf Stabilität und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Die Stabilität der Insertionsmutanten von TM3 und der amphipathischen Helix wurde durch keines der zusätzlichen Alanine zerstört, da die Stärke des ELISA- sowie Western Blot Signals in allen Mutanten auf Wildtyp Niveau lag (Abb. 50, A). Ob diese Stabilität aufgrund einer korrekten Membrantopologie oder unabhängig davon erhalten wurde, konnte mit diesem experimentellen Ansatz nicht überprüft werden. Die exakte Orientierung der Helices schien aber nur eine untergeordnete Rolle für die Bildung eines stabilen Proteins zu spielen. Wichtig dagegen waren die Domänen für die Sekretion von subviralen Partikeln, die durch die Alanin-Insertion in die amphipathische Helix sowie in den zentralen Bereich der TM3 stark inhibiert war. Die Insertion in den N-terminalen Bereich der TM3 hatte allerdings keine negativen Auswirkungen auf die Sekretion (Abb. 50, B). Dieser Phänotyp konnte auch bei der N-terminalen Insertion in die TM1 beobachtet werden. Ähnlich wie die TM1 erfüllten wohl auch TM3 und die vorgelagerte amphipathische Helix neben einer weniger dominanten topologischen Rolle eine entscheidende Aufgabe für die Partikelbildung.

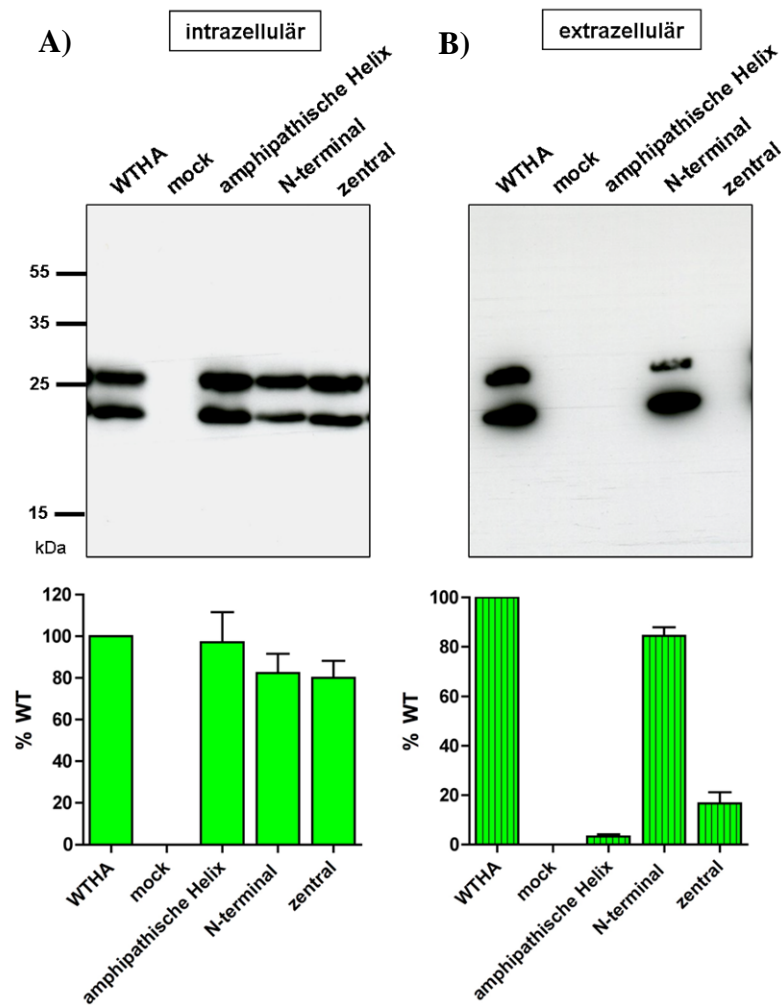


Abb. 50: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein von Insertionsmutanten der TM3 und der AH mittels Western Blot und ELISA. Anti-S Western Blot und ELISA-Messungen von Lysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) der N-terminalen und zentralen Insertionsmutanten, sowie der amphipathischen Helix.

3.5.3 Untersuchung der Koexpression und -sekretion der Insertionsmutanten der TM3 und der amphipathischen Helix mit WT-S-Protein mittels Western Blot

Durch Koexpression der Insertionsmutanten mit dem Wildtyp konnte deren Fähigkeit zur Partikelbildung wiedererlangt werden. Das Bandenmuster in den Lysaten sowie den Überständen zeigte, dass sowohl der Wildtyp als auch die einzelnen Mutanten stabil gebildet und sekretiert wurden (Abb. 51, A+B). Dies war für die N-terminale Insertion zu erwarten gewesen, da sie auch ohne Wildtyp sekretionsfähig war. Die Sekretionsdefizienz der beiden anderen Insertionsmutanten schien dagegen durch die Bereitstellung von korrekten Helices durch den Wildtyp komplementierbar zu sein. Sie hatten zudem keinen (amphipathische Helix) oder nur einen wenig ausgeprägten (zentrale Insertion) transdominant negativen Effekt auf die Sekretion der wildtypischen S-Proteine.

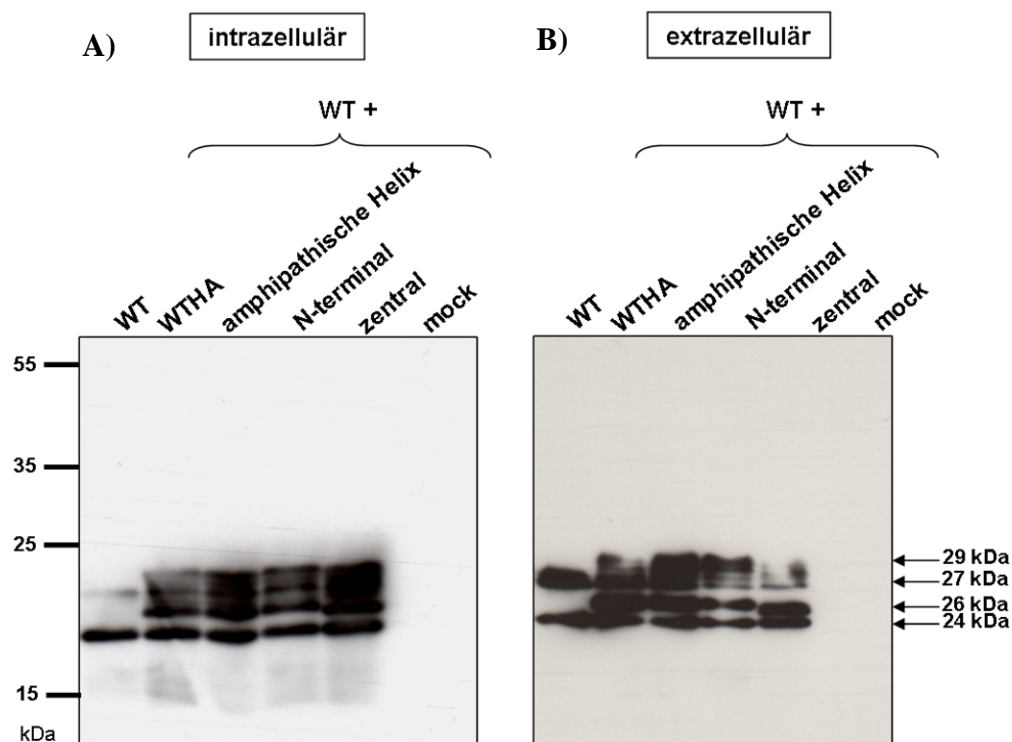


Abb. 51: Untersuchung der Koexpression und –sekretion der Insertionsmutanten der TM3 und der AH mittels Western Blot. Huh7 Zellen wurden mit je 0,5 µg des WT-Vektors und der Konstrukte für die Expression der TM3-Insertionsmutanten kotransfiziert, für 48 oder 72h inkubiert, der Überstand geerntet und die Zellen lysiert. Anti-S Western Blot der Zelllysate (A) und der Zellkulturüberstände (B).

3.5.4 Austausch des C-Terminus (TM3/4) durch die homologe Sequenz des DHBV (DC-Terminus)

Um die Konserviertheit des gesamten C-Terminus innerhalb der Hepadnaviridae zu untersuchen, wurde der HBV C-Terminus mit dem des DHBV ersetzt. Hierbei wurde im S-Protein der Bereich von AS 179-226 mit den Aminosäuren 125–167 des DHBV-S ausgetauscht (Abb. 52). Die amphipathische Helix blieb somit im chimären Protein vollständig erhalten. Abweichend von den anderen Chimären wurde für die Herstellung der DC-Terminus-Mutante eine Megaprimer-PCR eingesetzt. Diese Klonierungsstrategie hatte zur Folge, dass die Chimäre kein zusätzliches HA-Epitop trug.

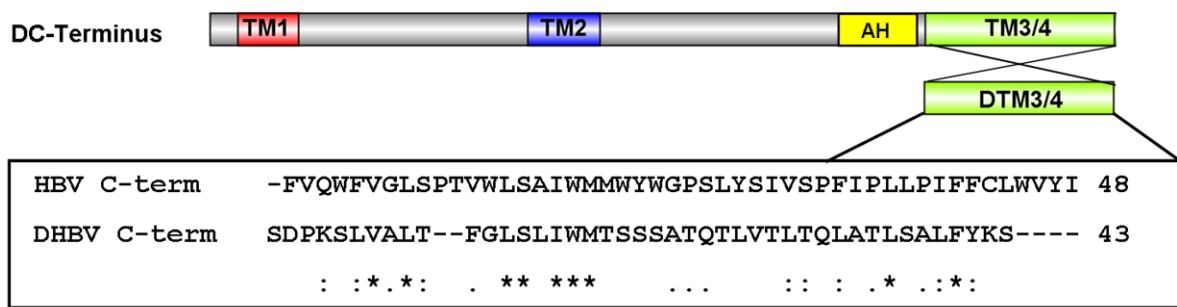


Abb. 52: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz des C-Terminus von HBV und DHBV. Sterne stehen für einzelne, vollständig konservierte Reste. Doppelpunkte zeigen Konservierungen zwischen Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften an, während Punkte Konservierungen zwischen Gruppen mit weniger ähnlichen Eigenschaften darstellen. Das „Alignment“ wurde mit dem Online-Werkzeug ClustlW2 des EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) durchgeführt.

3.5.5 Analyse der DC-Terminus-Chimäre auf ihre Stabilität und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Obwohl die Aminosäuresequenz der beiden Domänen stark unterschiedlich war, führte der DHBV C-Terminus im HBV-Hintergrund zu einem stabilen Protein (Abb. 53, A+B). Diese Beobachtung fügt sich in die Theorie ein, dass der C-Terminus mit der TM3 und 4 keine essentielle Rolle für die Stabilität des Proteins spielt, sondern zum Beispiel für die Aggregation der S-Proteine in der Membran während der Partikelmorphogenese benötigt wird. Ein geringer Teil der chimären Proteine war zudem noch in der Lage subvirale Partikel zu bilden, die in den Überstand abgegeben wurden. Diese Tatsache könnte darauf zurückzuführen sein, dass die amphipathische Helix als wichtiges strukturelles Element für die Sekretion in der Mutante vollständig vorhanden war.

3.5.6 Intrazelluläre Lokalisation der DC-Terminus-Chimäre mittels Immunfluoreszenz

Bezüglich der intrazellulären Verteilung von S glich die DC-Terminus-Chimäre stark dem Wildtyp (Abb. 54, A+B). Dies passt zu der Beobachtung, dass einige der mutierten S-Proteine wie auch die wildtypischen S-Proteine dem sekretorischen Weg folgen konnten und als subvirale Partikel aus der Zelle ausgeschieden wurden. Eine deutliche Aggregation von S-Proteinen in einem Kompartiment oder Vesikeln wie in einigen sekretionsdefizienten Mutanten konnte nicht detektiert werden.

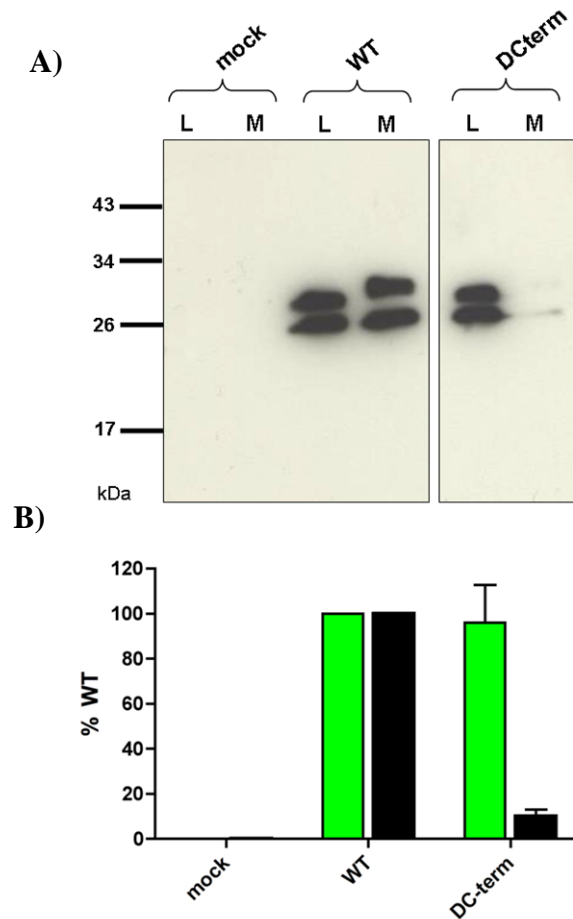


Abb. 53: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein der DC-Terminus-Chimäre mittels Western Blot und ELISA. (A) Anti-S Western Blot von Lysaten (L) und Zellkulturüberständen (M). (B) Nachweis von von intra- und extrazellulärem S-Protein mittels HBsAg-ELISA. DC-term (S mit DHBV C-Terminus).

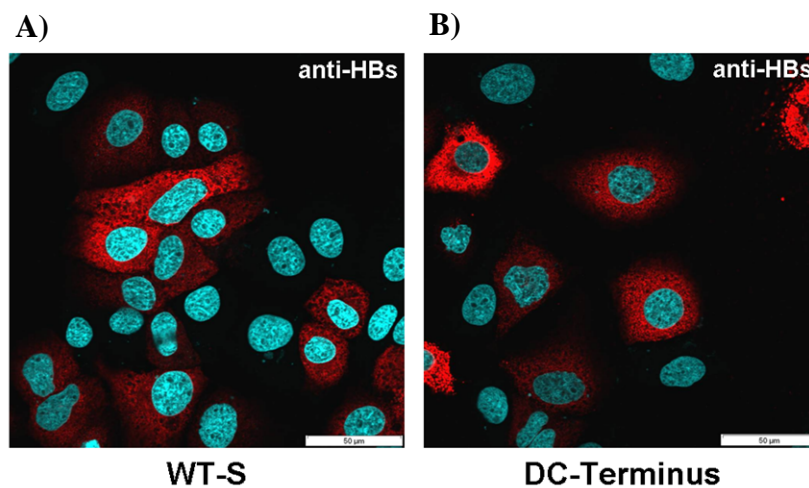


Abb. 54: Intrazelluläre Lokalisation der Mutante mit dem DC-Terminus-Chimäre mittels Immunfluoreszenz. Huh7-Zellen wurden mit pSVBX24H (WT-S, A) und dem DC-Terminus-Konstrukt (B) transfiziert, fixiert und mit dem S-spezifischen HB1 Antikörper gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper, der mit Alexa594 gekoppelt war. Der Messbalken entspricht 50 µm.

3.5.7 Überprüfung der Koexpression und -sekretion der DC-Terminus-Chimäre mit dem WT-S-Protein mittels Western Blot

Bei der Koexpression mit WT-S behinderte die Mutante mit dem C-Terminus von DHBV den Wildtyp nicht in seiner Sekretion und konnte zusammen mit diesem subvirale Partikel bilden, die von der Zelle abgegeben wurden (Abb. 55). Dieser Phänotyp konnte auch bei den sekretionsgehemmten Insertionsmutanten der TM3 und der amphipathischen Helix beobachtet werden. Hieraus ergibt sich für den C-Terminus von HBV, dass die Anwesenheit von wildtypischen Domänen die Sekretionsfähigkeit der Mutante verbessern kann.

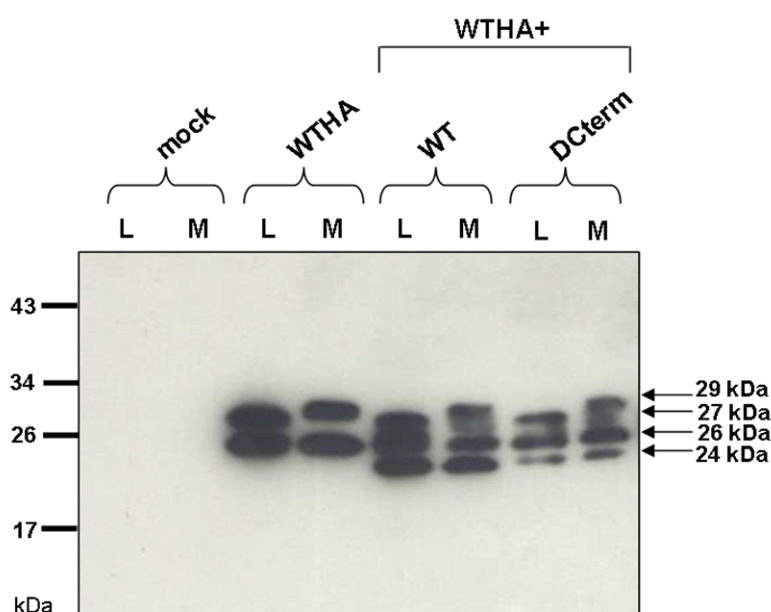


Abb. 55: Kontrolle der Koexpression und -sekretion der DC-Terminus-Chimäre mittels Western Blot. Huh7 Zellen wurden mit je 0,5 μg des WT-Vektors und des DC-Terminus-Konstruktes kotransfiziert, für 48 oder 72h inkubiert, der Überstand geerntet und die Zellen lysiert. Lysat (L), Medium (M).

3.6 Herstellung von Mutanten mit mehreren ausgetauschten Transmembrandomänen

Sowohl der Austausch der TM1 als auch der TM2 durch die homologen Domänen des DHBV lieferte keine stabilen Proteine. Es entstand deshalb die Überlegung, ob das Einbringen von mehreren DHBV-Regionen in das HBV S-Protein z.B. essentielle sequenzspezifische Interaktionen zwischen TM1 und 2 von DHBV wieder ermöglichen und damit zu einer Stabilisierung des Proteins beitragen könnte. Kombinationen aus unterschiedlichen Domänen wurden durch klassische Klonierung erzeugt. Hierbei wurden Fragmente, die die gewünschte DHBV-Domäne trugen durch Restriktionsverdau von entsprechenden Plasmiden hergestellt

und in ein Plasmid mit einer anderen DHBV-Domäne eingefügt. Die so erzeugten Konstrukte trugen entweder eine Kombination aus DTM1 und DMT2 (DTM1/DTM2), DTM2 und dem C-Terminus von DHBV (DTM2/DC-term) oder der drei homologen Domänen (DTM1/DTM2/DC-term). Zudem wurde noch ein Konstrukt erzeugt, das anstelle der TM1 das Signal I der β -Lactamase und anstelle der TM2 die homologe Sequenz des DHBV trug (beta/DTM2). Alle Konstrukte wurden auf ihre Stabilität, Topologie und Sekretion untersucht.

3.6.1 Analyse der Kombinations-Mutanten auf Stabilität, Topologie und Sekretionsfähigkeit mittels Western Blot und ELISA

Es zeigte sich, dass die Anwesenheit der DTM1 zu einer verstärkten Destabilisierung der Proteine führte. Die Konstrukte, die die DTM1 trugen, waren weder im Lysat noch im Medium detektierbar (Abb. 56, A+B). Diese Ergebnisse untermauern die These, dass die für diese Arbeit gewählte DTM1-Domäne nicht funktionell war und keine korrekte Topologie ermöglichte, was zu einem schnellen Abbau der fehlgefalteten Proteine führte. Dies ließ sich offensichtlich auch nicht durch zusätzliche DHBV-Bereiche komplementieren. Wurde dagegen die DTM2 mit dem DC-Terminus kombiniert, konnte zumindest eine geringe Menge des Konstrukts im Lysat nachgewiesen werden (Abb. 56, C+D). Verglichen mit dem Konstrukt, das nur den DC-Terminus trug und ein sehr stabiles Protein hervorbrachte, war aber ein deutlicher Verlust der Stabilität im DTM2/DC-term-Konstrukt zu beobachten. Dieser destabilisierende Effekt der DTM2 zeigte sich auch in der Mutante, die sowohl das Signal I der β -Lactamase als auch die DTM2 beinhaltete. Im Hinblick auf die N-Glykosylierung an Asn146 waren beide Konstrukte (DTM2/DC-term und beta/DTM2) topologisch korrekt, was zumindest darauf schließen lässt, dass die DTM2 für kurze Zeit in richtiger Orientierung in die Membran inserierte. Da sowohl das Typ I Signal der β -Lactamase als auch der DC-Terminus alleine im HBV-Hintergrund stabile, chimäre Proteine erzeugten, führte die fremde TM2 zu einer Destabilisierung des Proteins.

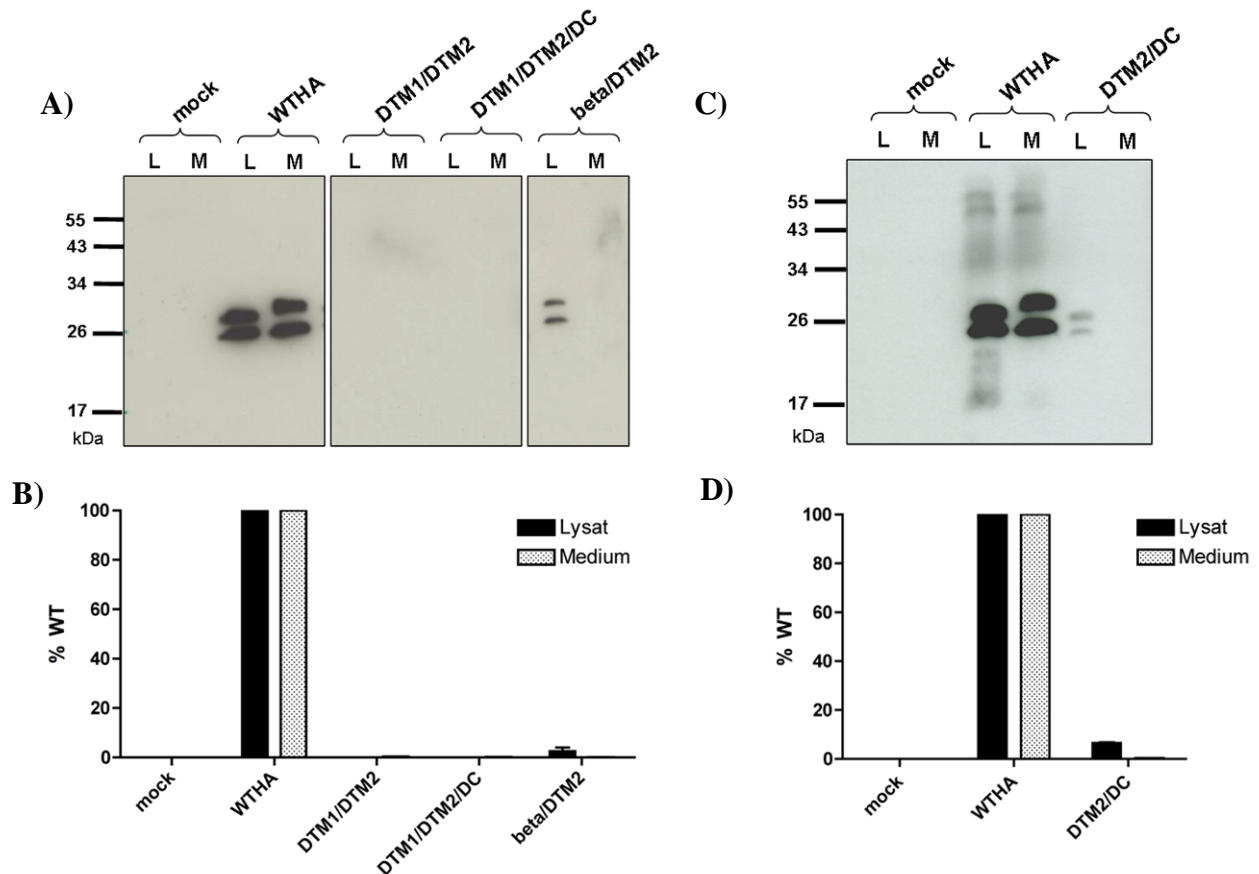


Abb. 56: Nachweis von intra- und extrazellulärem S-Protein von den Kombinationsmutanten mittels Western Blot und ELISA. (A) und (C) Anti-S Western Blot von Lysaten (L) und Zellkulturüberständen (M). (B) und (D) Nachweis von von intra- und extrazellulärem S-Protein mittels HBsAg-ELISA.

3.7 Nachweis der Dimerbildung von sekretionsdefizienten Mutanten mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE

Das Modell für die intrazelluläre Bildung von subviralen Partikeln geht davon aus, dass die kleinen Hüllproteine kurz nach ihrer Insertion und N-Glykosylierung durch Disulfidbrücken miteinander verbunden werden und Dimere entstehen. Diese Dimere könnten höhere Oligomere bilden, die letztendlich die Knospung der Partikel initiieren. Die Dimerisierung ist somit nach dem korrekten Einbau der Proteine in die Membran der nächste wichtige Schritt in der Partikelbildung. Nachdem einige Mutanten zwar ein stabiles, korrekt gefaltetes Protein erzeugten, nicht aber sekretiert wurden, sollten diese sekretionsdefizienten Konstrukte auf ihre Fähigkeit zur Dimerbildung getestet werden. Die Verwendung von SDS-Gelen, in denen den Proben kein Reduktionsmittel zur Zerstörung der Disulfidbrücken zugesetzt wird, ermöglicht den Nachweis von Disulfidbrücken-verknüpften Dimeren. Um zu vermeiden, dass Cysteine, die in der Zelle im gefalteten Protein nicht in Disulfidbrückenbindung involviert waren, beim Zellaufschluss zusätzliche Brücken ausbilden konnten, wurde dem Lysispuffer Iodacetamid

zugesetzt. Diese Chemikalie bindet an freie SH-Gruppen in Cysteinen und blockiert diese für die Bildung von Disulfidbrücken. Das Ergebnis des Blots zeigte, dass alle Mutanten die Fähigkeit zur Dimerbildung behielten. Im Lysat aller Mutanten konnten sowohl Banden mit der spezifischen Größe von Monomeren (26 kDa und 29 kDa) als auch von Dimeren detektiert werden. Allerdings erschienen auf Höhe der Dimere nur 1-2 Banden (Abb. 57). Bezug nehmend auf die Ergebnisse von Wunderlich und Bruss (1996), die zeigen konnten, dass sowohl nicht glykosylierte als auch glykosylierte S-Proteine ohne spezielle Vorlieben miteinander dimerisieren, würde man allerdings im Lysat bei den HA-markierten S-Proteinen drei Dimerbanden erwarten: eine 52 kDa Bande (unglykosyliertes S mit unglykosyliertem S), eine 55 kDa Bande (unglykosyliertes S mit glykosyliertem S) und eine 58 kDa Bande (glykosyliertes S mit glykosyliertem S). Die DC-Terminus-Chimäre ohne HA-Epitop sollte jeweils um ca. 4 kDa kleinere Dimere ausbilden. Die Auftrennung von drei Banden konnte auch mit einem 10 %-igen Gel leider nicht erreicht werden. Dies könnte daran liegen, dass im Bereich höherer Molekulargewichte die Auftrennung der Banden ungenauer wurde oder tatsächlich spezielle Dimerformen nicht ausgebildet wurden.

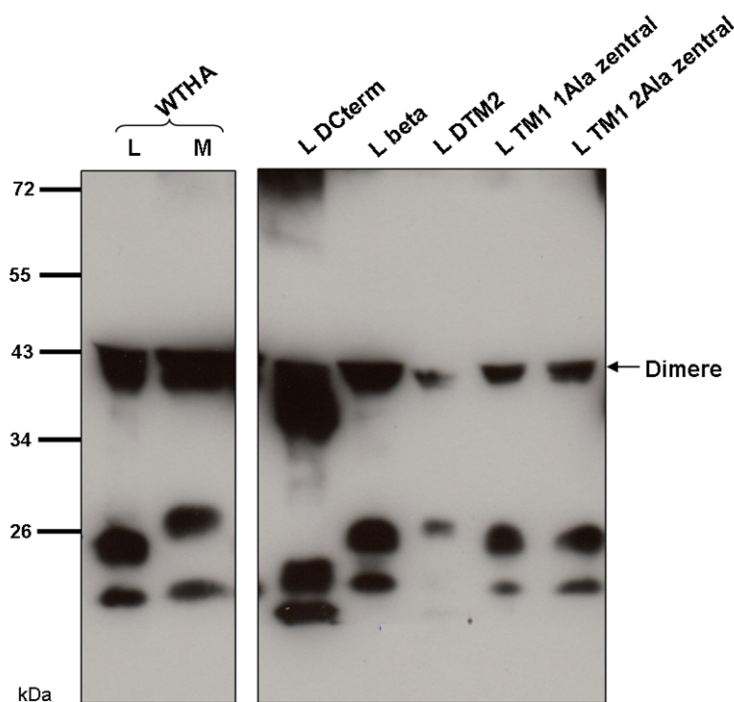


Abb. 57:
Nachweis von S-Dimeren mit nicht-reduzierender SDS-PAGE. Huh7-Zellen wurden mit jeweils 1 μ g Plasmid-DNA der unterschiedlichen S-Konstrukte transfiziert, für 72 h inkubiert, der Überstand geerntet und die Zellen lysiert. Dem Lysat und dem Überstand wurde 20 mM Iodacetamid zugesetzt. Das SDS-Gel war 10 %-ig. Der Blot wurde mit dem anti-S Antikörper HB1 entwickelt. L = Lysat, M=Medium.

3.8 Intra- und extrazellulärer Nachweis von HBs-positiven Partikeln mittels nativer Agarosegele

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die getesteten Mutanten noch Dimere bilden konnten, stellte sich weiterhin die Frage, ob eventuell die späteren Schritte wie Oligomerisierung und Knospung in das ER/ERGIC-Lumen inhibiert waren. Da die Existenz von oligomeren Zwischenstufen noch nicht vollständig geklärt ist und sie zudem schwer nachweisbar sind, sollten stattdessen als Nachweis für eine korrekte Knospung intrazelluläre subvirale Partikel isoliert und detektiert werden. Um die lipidhaltigen Partikel nicht durch Detergenzien aus dem Lysispuffer zu zerstören, wurden die Zellen mittels mehrerer Runden von Einfrieren (-80°C) und Auftauen (37°C) geöffnet. Für die Auftrennung der intrazellulären und extrazellulären Partikel wurden native Agarosegele verwendet, da sie zum einen weder reduzierend noch denaturierend waren und eine weniger enge Gelmatrix bildeten. Zudem bekamen die Partikel keine zusätzliche Ladung, sondern wanderten entsprechend ihrer natürlichen Ladung. Diese Aspekte ermöglichen, dass ganze Proteinkomplexe elektrophoretisch aufgetrennt werden können, was für HBV-Kapside schon gezeigt wurde.

Für den Versuch, die intrazellulären Partikel zu isolieren und mittels nativer Agarosegele nachzuweisen, wurden Mutanten ausgewählt, die intrazellulär ein stabiles Protein bildeten: Die sekretionsdefiziente Mutante mit dem Typ I Signal der β -Lactamase (beta), mit der zentralen Insertion in TM1 (TM1 1Ala zentral) und der N-terminalen Insertion in TM2 (TM2 1Ala N). Als Kontrolle dienten die beiden Wildtypen (WT und WTHA) sowie die sekretionskompetente Mutante mit einer N-terminalen Insertion von zwei Alaninen in TM1 (TM1 2Ala N). Diese Mutante wurde ebenfalls auf Stabilität und Sekretionsfähigkeit getestet und zeigte den gleichen Phänotyp wie die Mutante mit einem Alanin (Daten nicht gezeigt). Der Wildtyp ohne HA-Epitop (WT) zeigte im Zelllysate ein deutliches S-Signal und ein etwas niedriger laufendes zweites Signal, was für einen erfolgreichen Zellaufschluss sprach. Auch im Zellkulturüberstand konnte eine definierte Bande detektiert werden, die allerdings etwas weiter lief als die starke Bande im Zelllysate (Abb. 58) und in etwa auf Höhe der zweiten Lysatbande. Ob es sich bei den S-positiven Signalen um freie 20 nm Partikel oder um zelluläre Kompartimente wie zum Beispiel ERGIC-Zisternen oder ER-Vesikel mit akkumulierten S-Proteinen handelt, ließ sich alleine mit den Agarosegelen schwer feststellen. Da für native Agarosegele zur Proteinauftrennung keine Größenmarker erhältlich sind, fehlt zum einen ein Vergleichsmaßstab, zum anderen beeinflusst neben der Größe auch die Ladung das Laufverhalten der Partikel. Aus diesem Grund liefen die Partikel des WTHA im Gel weiter als die des WT, da das angehängte HA-Epitop zusätzliche negative Ladungen in das natürlich

negativ geladene Protein einführte. Auch die sekretionskompetente Mutante (TM1 2 Ala N), die ebenfalls einen HA-Epitop trug, produzierte sowohl im Medium als auch im Überstand Signale, die auf der Höhe des WTHA liefen. Dagegen erzeugten die drei sekretionsdefizienten Mutanten (beta, TM1 1Ala zentral, TM2 1Ala N) keine oder schwache Signale im Zelllysat und kein Signal im Medium. Dies würde dafür sprechen, dass diese Mutanten in ihrer Partikelbildung gestört waren und deshalb kein Partikelsignal sichtbar war. Vorhandene einzelne S-Proteine, sowie Dimere konnten aufgrund ihrer Größe in den Agarosegelen vermutlich nicht detektiert werden. Zu bemerken ist zudem, dass in den Lysaten der sekretionskompetenten Mutanten und des Wildtyps zwei Signale auf unterschiedlicher Höhe zu sehen sind, während bei den defizienten Mutanten nur die obere Bande sichtbar ist.

Native Agarosegele könnten somit für den Nachweis von subviralen Partikeln herangezogen werden. Allerdings sollten die Partikel durch vorherige Zentrifugationen aufgereinigt werden, um sicherzugehen, dass es sich um SVPs handelt.

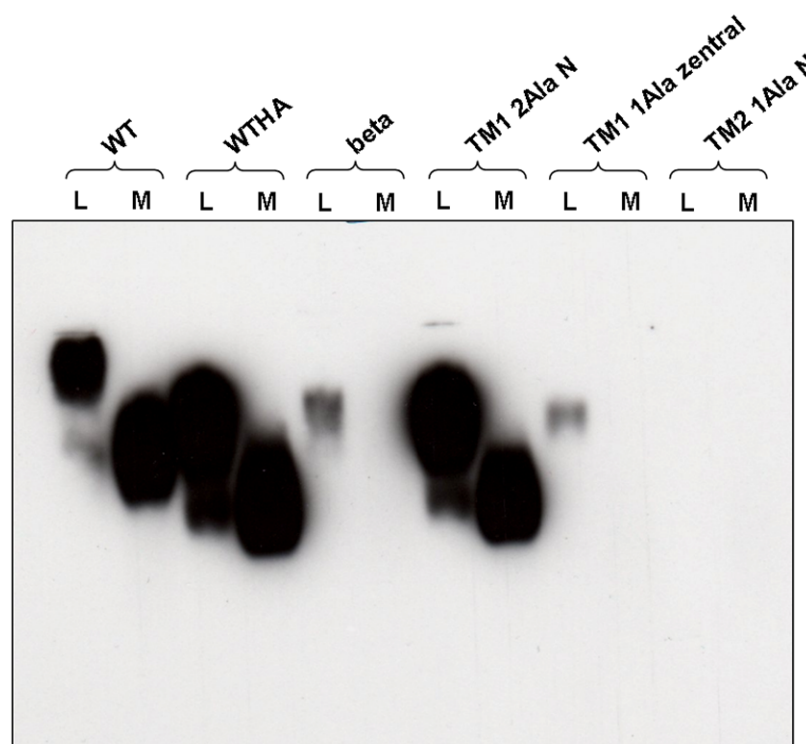


Abb. 58: Natives Agarosegel zum Nachweis von HBs-positiven Partikeln. Huh7 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konstrukten transfiziert und nach 72 h die Überstände geerntet. Die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert. Je 30 µl Lysat und Überstand der Mutanten wurden auf ein 1 %-iges natives Agarosegel geladen. Die Proteine wurden mittels Kapillarblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und der Blot mit dem anti-S Antikörper HB1 gefärbt.

4 Diskussion

4.1 Frühere Deletionsstudien

Die Knospung des kleinen Hüllproteins an internen Membranen zu subviralen Partikeln ist ein komplexer Prozess, an dem unterschiedliche Domänen des Proteins beteiligt sind. Der Fokus dieser Arbeit lag darauf, die Rolle der Transmembrandomänen bei diesem Vorgang durch eine Mutationsanalyse näher zu charakterisieren. Es konnte bereits im Vorfeld durch Deletionen gezeigt werden, dass die Membransignale I und II nicht nur für eine korrekte Topologie, sondern auch für die Partikelbildung wichtig sind. So erzeugte das vollständige Entfernen der TM1 ein stabiles Protein, das aber nicht mehr sekretiert werden konnte (Bruss und Ganem, 1991b; Prange *et al.*, 1992). Wurden dagegen längere Sequenzen im C-terminalen Bereich der TM1 deletiert, so wurde das Protein destabilisiert und war im Lysat nur noch schwach detektierbar (Prange *et al.*, 1992). Eine Destabilisierung und Inhibition der Sekretion erzeugten auch Deletionen von 2-4 hydrophoben Aminosäuren innerhalb der TM1 (Lepère-Douard *et al.*, 2009). Wurde die gesamte TM2 entfernt oder im N-terminalen Bereich, der zytoplasmatisch an die TM2 anschließt, Deletionen eingebracht, so führte dies zu einer vollständigen Destabilisierung des Proteins (Bruss und Ganem, 1991b; Prange *et al.*, 1992; Jenna und Sureau, 1998), was die topologisch wichtige Funktion der TM2 als Membrananker und „Stop-Transfer“-Signal unterstreicht. Da der C-Terminus des kleinen Hüllproteins vermutlich ebenfalls zwei Transmembrandomänen trägt, wurde auch er in die vorliegende Mutationsanalyse mit eingeschlossen. Auch hier konnten Deletionsstudien bereits eine Funktion für die Partikelsekretion herausarbeiten. Wurde der C-Terminus (AS 174-226) entfernt, so konnte S nicht mehr von der Zelle abgegeben werden und war in seiner Stabilität leicht vermindert (Bruss und Ganem, 1991b). Andere Experimente zeigten, dass Deletionen ab Aminosäure 162/172/182/192 zu einer stärkeren Destabilisierung des Proteins führten, während das Entfernen der letzten 14 Aminosäuren die Stabilität nicht beeinflusste, aber eine Sekretionsblockade hervorrief (Jenna und Sureau, 1999). Diese Abweichung lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Präparationsmethoden erklären. Zusammenfassend lässt sich deshalb sagen, dass die Transmembrandomänen neben ihrer topologischen Funktion offenbar auch eine wichtige Rolle für die Sekretion spielen.

Einführung von Punktmutationen, Insertionen und Substitutionen sollten in dieser Arbeit nun das Verständnis über mögliche Funktionen der Domänen vertiefen. Der Großteil der hier eingeführten Veränderungen verursachte eine Störung in der Bildung oder Sekretion der

Partikel, was die von anderen Gruppen postulierte essentielle Bedeutung der transmembranen Regionen für die Sekretion von S weiterhin bestärkte.

4.2 Veränderung der Primärsequenz durch Punktmutationen

Alle erzeugten Punktmutanten der TM1, bei denen die Phenylalanine durch Leucine ersetzt wurden, konnten ihre Fähigkeit zur Partikelbildung bewahren und zeigten einen wildtypischen Phänotyp (Abb. 19). Vermutlich war hierbei entscheidend, dass weder die Hydrophobizität noch die Helixdrehung drastisch verändert wurden, sodass sowohl die Membraninsertion als auch mögliche Interaktionen untereinander weiterhin gewährleistet waren. Auch in der TM2 hatten Punktmutationen keinen negativen Einfluss auf die Stabilität und nur einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die Sekretion der Proteine (Abb. 36). Somit schienen auch in der TM2 die Phenylalanine keine essentiellen Reste zu sein, die eine spezifische Funktion vermittelten. Es wäre möglich, dass diese Rolle zum Beispiel die Leucine in der Domäne übernehmen, die in Form eines „Leucin-Zippers“ die Dimersierung der Proteine unterstützen könnten. Dieser Aspekt wird bei den Insertionsmutanten näher diskutiert.

4.3 Veränderung der Helixdrehung durch Insertionen

Die Position der Aminosäuren in einer Transmembranhelix ist zum Beispiel für Interaktionen zwischen einzelnen Resten wichtig. Durch Insertion von einer zusätzlichen Aminosäure in eine Helix werden die Reste auf der N-terminalen Seite der Insertion relativ zu den Resten auf der C-terminalen Seite der Insertion um einen Winkel von 110° verlagert (Op de Beeck *et al.*, 2000). Eine Insertion in die Transmembrandomäne verändert somit zum einen abhängig von ihrer Position die Stellung der Aminosäuren innerhalb der Helix zueinander und zum anderen die Position der Aminosäuren der TM zu den Resten der übrigen Proteinkette. Falls nun eine Aminosäure eine Interaktion eingeht, so könnte diese durch eine Veränderung in der Helixdrehung gestört werden. Ein Beispiel hierfür geben die Ergebnisse einer Insertionsmutagenese mit den Transmembrandomänen der beiden Hüllproteine E1 und E2 des Hepatitis C Virus. Die beiden Hüllproteine bilden Heterodimere, die für die Sekretion des Virus essentiell sind. Durch die Insertion eines Alanins in den zentralen Bereich der Transmembrandomänen von E1 oder E2 konnte die Heterodimerisierung stark vermindert werden (Op de Beeck *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Dimerisierung des Erythrozyten-Transmembranproteins Glykophorin A, die durch Alanin-Insertionen in essentielle Bereiche ebenfalls unterbunden werden konnte (Mingarro *et al.*, 1996). Auch andere

Funktionen wie Interaktionen mit Lipiden oder mit zellulären Proteinen könnten eventuell durch eine veränderte Position der Reste verhindert werden.

4.3.1 Veränderung der Helixorientierung der TM1 durch Insertionen

In dieser Arbeit wurde nun getestet, welchen Einfluss Alanin-Insertionen in die Transmembrandomänen auf die Proteinstabilität und die Partikelmorphogenese hatten. N-terminale Insertionen in die TM1 verursachten keine Veränderung im Sekretionsverhalten und die Mutanten wurden mit wildtypischer Effizienz ausgeschleust (Abb. 21). Durch diese Insertion am N-terminalen Ende von TM1 wurde nur die Position der ersten acht Aminosäuren des Proteins im Verhältnis zur TM1 und der restlichen Proteinkette verändert, was auf die Funktion der TM1 offensichtlich keine Auswirkungen hatte bzw. kompensiert werden konnte. Auch die Deletion der Reste 3-9 erlaubte noch die Sekretion von Partikeln (Prange *et al.*, 1992). Die Insertionsmutante hemmte zudem nicht die Sekretion des Wildtyps (Abb. 24), was ebenfalls dafür spricht, dass für die Sekretion wichtige Funktionen wie zum Beispiel Interaktionen zwischen den TM1-Domänen weiterhin stattfinden konnten.

Die Insertion eines Alanins in den zentralen Bereich der TM1 hingegen verursachte eine Konformationsänderung, die eine Partikelsekretion nicht mehr zuließ und auch die Sekretion des Wildtyps transdominant hemmte (Abb. 21/24). Man könnte hier vermuten, dass zum Beispiel Interaktionen der Domänen sowohl zwischen den Mutanten als auch zwischen Mutanten und Wildtyp durch die veränderte Position der Aminosäuren nicht mehr möglich waren oder aber die TM1-Domäne nicht mehr korrekt in die Membran inserieren konnte, was beides die Sekretion blockieren könnte. Dass die mutierte TM1 aber prinzipiell als topologisches Typ I Signal funktionieren und in die Membran inserieren konnte, wurde im Hintergrund des mittleren Hüllproteins durch die Translokation der N-terminaler präS2-Domäne in das ER-Lumen experimentell nachgewiesen (Abb. 22).

Wurde das Alanin dagegen in das zytoplasmatische Ende der Helix inseriert, so konnten wieder einige Proteine als Partikel sekretiert werden (Abb. 21). Die C-terminale Insertion in TM1 führt primär zu einer 110°-Verdrehung der transmembranen Helix im Verhältnis zum Rest des Proteins. Es wäre denkbar, dass eine Konformationsänderung in der zytoplasmatischen Schleife, die relativ flexibel ist, diese Drehung kompensiert, so dass TM1 wieder nahe an seine Wildtyp-Position zurückkehren kann und zur Partikelbildung eingeschränkt beitragen kann. Hierfür spricht auch, dass die Mutante zusammen mit dem Wildtyp sekretiert wurde und somit mögliche Interaktionen ausbilden konnte (Abb. 24).

Es stellt sich nun die Frage, welche Art von Funktion die TM1 für die Partikelbildung übernehmen könnte, die durch Insertionen gestört werden kann. Eine essentielle, stabilisierende Funktion scheint die TM1 zuerst einmal nicht zu übernehmen, da von anderen Gruppen durchgeführte Deletionen der gesamten Helix und die in dieser Arbeit eingebrachten Insertionen keinen destabilisierenden Effekt hatten. Die Reste der TM1-Domäne könnten Wechselwirkungen eingehen, durch die entweder zwei oder mehrere TM1-Domänen miteinander oder mit Helices der TM2-4 verbunden werden oder die TM1 mit umgebenden Lipiden interagieren könnte. Vor allem polare Reste wie Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin sowie Lysin, Arginin und Histidin können über Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Di- oder Oligomerisierung von Transmembrandomänen beitragen. Weil das Einbringen von polaren Resten in die Membran ein energetisch sehr aufwendiger Prozess ist, sind nur etwa 5 % der Reste in Transmembranhelices polar. Dies entspricht nur etwa einem Viertel der polaren Reste in löslichen Regionen (22 %) (Tourasse und Li, 2000). Tauchen dennoch polare Reste in Transmembranregionen auf, so sind diese kaum zu mutagenisieren, was für eine wichtige strukturelle oder funktionelle Rolle der Reste spricht (Tourasse und Li, 2000). Auch in der TM1 von HBV ist ein polarer Rest inseriert: das Glutamin an Position 16. Eine mögliche Interaktion der Glutamine zweier benachbarter TM1-Domänen könnte durch Insertion von zusätzlichen Aminosäuren in die TM1 gestört werden. Das Glutamin ist zudem in WHV und GSHV konserviert, nicht aber in DHBV. Die Fähigkeit von HBV-Hüllproteinen mit WHV-Hüllproteinen gemischte Partikel zu bilden, nicht aber mit DHBV (Gerhardt und Bruss, 1995), könnte deshalb möglicherweise für einen konservierte Interaktion innerhalb der Orthohepadnaviren sprechen, die in Avihepadnaviren nicht vorhanden ist. Allerdings zeigte eine HBV-Deletionsmutante (Q16-G18) keinen Defekt in der Partikelsekretion (Lepère-Douard *et al.*, 2009).

Eine andere Möglichkeit, wie die Reste der TM1 Einfluss auf die Sekretion nehmen könnten, wäre die Umlagerung von oder die Interaktion mit Lipiden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Peptid, das die Sequenz M1-Q16 trug, Liposome auch bei neutralem pH destabilisieren und Lipide mischen konnte (Rodriguez-Crespo *et al.*, 1995). Berting *et al.* (2000) konnten zudem zeigen, dass Peptide im Bereich von G7-Q18 des kleinen HBV-Hüllproteins im Hintergrund des Influenza Hämagglutinin-Fusionsproteins einen Hemifusionsprozess auslösen konnten. Mehrere hydrophobe Bereiche der TM1 wurden identifiziert, die bei Deletion das S-Protein destabilisierten und die Sekretion hemmten, sowie im L-Protein einen Einfluss auf die Infektiosität hatten (Lepère-Douard *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die TM1 in der Lage ist, Lipidstrukturen zu verändern. Es wird deshalb diskutiert, dass die TM1

im L-Protein zumindest für den Eintritt des Virus in die Zelle als Fusionsschleife oder –peptid wirken könnte. Für die DHBV-TM1 des großen Hüllproteins wird eine solche Funktion ebenfalls angenommen (Grgacic und Schaller, 2000; Chojnacki *et al.*, 2005). Ob die TM1 auch im S-Hintergrund für einen Fusionsprozess oder die Neuordnung von Lipiden während der Bildung von subviralen Partikeln eine Rolle spielen könnte, bleibt zu überprüfen.

4.3.2 Veränderung der Helixdrehung der TM2 durch Insertionen

Im Gegensatz zu TM1 ist TM2 stärker hydrophob und beinhaltet keine polaren Reste. Als Membrananker übernimmt sie eine essentielle topologische Funktion für die Stabilität des Proteins. Deletionen der TM2 sowie im zytoplasmatischen Bereich vor der TM2 (AS60-80) führten zu einem instabilen Protein (Bruss und Ganem, 1991b; Jenna und Sureau, 1998).

Auch die in dieser Arbeit eingeführten zentralen und C-terminalen Alanin-Insertionen in der TM2 hatten einen destabilisierenden Effekt auf das Protein und verhinderten dessen Sekretion (Abb. 38). Die zusätzliche Aminosäure veränderte zum einen die Orientierung der Reste innerhalb der Helix (zentrale Insertion) und zum anderen die der kompletten Helix zum restlichen Protein (C-terminale Insertion). Es wäre möglich, dass die Ausbildung von Interaktionen zwischen den TM2-Domänen sowohl für die Stabilisierung zum Beispiel durch Unterstützung der Dimerbildung als auch für die Sekretion des Proteins essentiell ist und durch die Insertionen unterbunden wurde.

Am stabilsten war das Protein, wenn die Alanin-Insertion in der TM2 dem zytoplasmatischen Bereich zugewandt war (Abb. 38, N-terminale Insertion). Geht man davon aus, dass die TM2 eine für die Stabilität wichtige Interaktion eingehen muss, so war diese in der Mutante zumindest eingeschränkt möglich. Offensichtlich war die Orientierung der zytoplasmatischen Schleife zur restlichen Proteinkette nicht entscheidend für deren Ausbildung.

Die unterschiedliche Stabilität der Mutanten, aber ihre gemeinsame Sekretionsblockade und ihre negative Transdominanz gegenüber dem Wildtyp (Abb. 40), lassen eventuell auf zwei unterschiedliche Funktionen der TM2 für Stabilität und Sekretion schließen oder auf eine komplexe Funktion, die bei der N-terminalen Insertion nur teilweise erfüllt werden konnte zum Beispiel die Dimerisierung und eine anschließende konformationelle Änderung des Dimers.

Eine Interaktion der TM2-Domänen miteinander könnte über zwei mögliche Verbindungen geschehen. Zum einen könnte das Cys an Position 90 Disulfidbrücken zwischen zwei TM2-Domänen ausbilden. Dies ist eher unwahrscheinlich, da zum einen Cys-Cys-Verbindungen in Membranproteinen sehr selten sind (Adamian und Liang, 2001) und zum anderen gezeigt werden konnte, dass Cys90 eine freie SH-Gruppe trägt und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit

nicht in Disulfidbrücken involviert ist (Mangold *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit könnte die Interaktion über einen Leucin-Zipper sein. Gurezka und Kollegen (1999) konnten zeigen, dass das Vorkommen eines Heptad-Motivs mit der Abfolge LLXXLLXLLXXLLXLL zur Selbstassemblierung von Transmembransegmenten in Membranen führt. Verglichen mit der Sequenz-Abfolge der TM2 (FIIFLFIILLCLIFLLVLL) könnte diese mit zwei Abweichungen an Position 1 (F statt L) und 8 (C statt L) möglicherweise ein solches Heptad-Motiv darstellen. Spezielle Sequenzen, wie das GxxxG-Motiv, die für Interaktionen von anderen Transmembrandomänen charakteristisch waren, wurden in keiner der Transmembranhelices von HBV gefunden.

4.3.3 Veränderung der Helixorientierung der potentiellen amphipathischen Helix

Das Vorkommen einer möglichen amphipathischen Helix im C-terminalen Bereich des Hüllproteins wurde von Camille Sureau postuliert (persönliche Mitteilung). Es konnte gezeigt werden, dass neben TM1 und TM2 auch die amphipathische Helix (AH, 154-174) eine Assoziation mit Membranen bewirken kann (Le Duff *et al.*, Abstract HBV-meeting 2010). Diese Entdeckung und das Vorkommen von amphipathischen Helices in Proteinen mit Membran-biegenden Fähigkeiten (Prinz und Hinshaw, 2009), könnten einen Hinweis darauf geben, dass die amphipathische Helix für den Knospungsprozess von HBV in die ER-Membran inserieren könnte, um diese zu verformen. Das Einbringen einer zusätzlichen Aminosäure in diese Helix verhinderte die Bildung von Partikeln (Abb. 50). Dies könnte darauf beruhen, dass die Helix aufgrund der veränderten Position ihrer Reste nicht mehr in die Membran inserieren konnte, um eine Biegung der Membran für die Knospung hervorzurufen. Waren dagegen durch WT-S-Proteine intakte Helices vorhanden, konnte auch die Insertionsmutante kosekretiert werden (Abb. 51). Neben der Helixdrehung spielt wohl auch die Primärsequenz des amphipathischen Bereichs eine wichtige Rolle, da Punktmutationen an Position R169L/P/G innerhalb der Helix die Sekretion von subviralen Partikeln und Viren hemmten (Ito *et al.*, 2010). Auch Substitutionen (AS 164-168KL und 169-173KL) im Bereich der amphipathischen Helix verhinderten die Sekretion des kleinen Hüllproteins (Jenna und Sureau, 1999). Eine Funktion der Orientierung der potentiellen amphipathischen Helix für die Stabilität von S konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Insertionsmutante trotz zusätzlichem Alanin stabil war (Abb. 50).

4.3.4 Veränderung der Helixdrehung der TM3 durch Insertionen

Die Aufgabe des C-Terminus für die Partikelbildung sowie dessen Topologie sind noch weitestgehend ungeklärt. Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde eine dritte Transmembranhelix an Position 179 – 201 angenommen, in deren N-terminalen und zentralen Bereich ein zusätzliches Alanin inseriert wurde. Während die veränderte Helixdrehung im N-terminalen Bereich keinen Einfluss auf die Stabilität oder Sekretion des Proteins hatte und somit wichtige Reste ihre Aufgabe weiterhin erfüllen konnten, wurde durch die zentrale Insertion die Sekretionsfähigkeit drastisch reduziert (Abb. 50). Da durch die Insertion an Position 192 die Reste der nachfolgenden, kurzen zytoplasmatische Schleife und der möglichen TM4 in ihrer Orientierung verändert wurden, könnten diese möglicherweise eine besondere Rolle für die Partikelbildung spielen. Der Austausch des Tryptophans an Position 196 durch ein Arginin, nicht aber durch ein Phenylalanin (Jenna und Sureau, 1999), konnte die Bildung von Partikeln verhindern (Ke Zhang, persönliche Mitteilung). Die genaue Position der zytoplasmatischen Schleife und damit des W196 ist allerdings noch nicht geklärt. Da es als wichtig für die Umhüllung des Hepatitis D Virus identifiziert werden konnte (Jenna und Sureau, 1999), das das kleine Hüllprotein von HBV für die Umhüllung seines Kapsids nutzt, wird eine Lokalisation im Zytoplasma diskutiert. Es wäre auch möglich, dass die zytoplasmatische Schleife mit zellulären Proteinen wie Chaperonen interagiert und so den Knospungsprozess vorantreibt.

4.4 Analyse von chimären S-Proteinen

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der Rolle der Transmembrandomänen bietet neben der Veränderung der Primärsequenz und der Helixorientierung die Substitution der gesamten Domäne durch ein fremdes Signal. Bisherige Versuche in dieser Richtung wurden mit dem Einbringen von Epitopen fremder Viren gekoppelt, um diese veränderten, subvirale HBV-Partikel als Impfstoff zu etablieren. In dieser Arbeit wurde zuerst die Konserviertheit der Domänen und ihrer Funktionen zwischen Avi- und Orthohepadnaviren untersucht, indem sie gegeneinander ersetzt wurden.

4.4.1 Konserviertheit der Transmembrandomänen zwischen Avihepadnaviren und Orthohepadnaviren

4.4.1.1 TM1

In dieser Arbeit sollten als „Fremddomänen“ zuerst die Transmembrandomänen des DHBV in den HBV-Hintergrund eingebracht werden, um zu testen, inwiefern deren Funktionen zwischen Avi- und Orthohepadnaviren konserviert sind. Das chimäre Konstrukt mit der DTM1-Domäne anstelle der TM1 war instabil (Abb. 33), was darauf schließen lässt, dass eine Komplementation weder topologisch noch funktionell möglich war. Man könnte vermuten, dass spezifische Wechselwirkungen der HBV-TM1 durch die DTM1 nicht eingegangen werden konnten. Diese Theorie wird auch durch die Tatsache gestützt, dass das DHBV-S keine gemischten Partikel mit HBV bilden kann (Gerhardt und Bruss, 1995). Weitere Hinweise darauf, dass die Domänen innerhalb der unterschiedlichen Gattungen variable Aufgaben erfüllen, liefern auch andere Ergebnisse. Zum einen führte die Deletion der TM1 in HBV zu einem stabilen Protein (Bruss und Ganem, 1991b), während die Deletion der TM1 in DHBV kein stabiles Protein erzeugte (Grgacic, 2002). Des Weiteren ist die TM1 des S-Proteins in DHBV für die Translokation von L essentiell (Grgacic *et al.*, 2000), während S in HBV hierfür nicht benötigt wird (Lambert und Prange, 2001). Zwei polare Reste (K24 und E27) in DTM1 wurden identifiziert, die bei Mutationen zu Alaninen die Stabilität nicht beeinflussten, die Partikelbildung aber verhinderten (Grgacic, 2002). Da in der DTM1-Chimäre dieser Arbeit nur die Reste von 8-23 in den HBV-Hintergrund eingeführt wurden und daher an Position 24 und 27 weiterhin die Reste von HBV lagen (R24 und T27), könnte dies möglicherweise zusätzlich die Funktionalität der DTM1 gestört haben. Eine Funktion in der Membranfusion wird für die TM1-Domänen beider Viren diskutiert.

Zu erwähnen ist außerdem, dass Chojnacki *et al.*, (2005) den umgekehrten Versuch machten und die DTM1 durch die HBV TM1 im Hintergrund von DHBV ersetzen. Die fremde Domäne wurde dabei allerdings in das große Hüllprotein eingeführt und diese L-Mutante mit dem wildtypischen S-Protein koexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass das chimäre L-Protein stabil war und nicht mit S kosekretiert wurde, die Sekretion des wildtypischen S aber auch nicht hemmte (Chojnacki *et al.*, 2005). Es wäre möglich, dass hier eine Interaktion von S und chimärem L nicht mehr korrekt ausgebildet werden konnte, die für eine Kosekretion notwendig war. Mutierten die Experimentatoren aber das Glutamin an Position 16 in der HBV TM1-Domäne des chimären L-Konstrukts zu einem Leucin, der korrespondierenden Aminosäure in DHBV, so konnten L und S miteinander sekretiert werden (Chojnacki *et al.*, 2005). Dies könnte für eine Interaktion zwischen beiden Hüllproteinen sprechen, die vor

Veränderung der Aminosäure eventuell nicht möglich gewesen war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die TM1 von HBV durch Mutation des polaren Glutamins zumindest im L-Protein die DTM1 komplementieren konnte.

4.4.1.2 TM2

Wie bei DTM1 so erzeugte auch die Chimäre mit der TM2 des DHBV kein Protein mit Wildtyp-Stabilität (Abb. 46). Dies deutet darauf hin, dass, wie für die Insertionsmutanten diskutiert, die TM2 für die Stabilisierung des Proteins zum Beispiel durch Interaktionen während der Dimerisierung wichtig ist und durch die DTM2 nicht komplementiert werden konnte. Durch Koexpression mit dem WT-S konnte die Mutante stabilisiert werden, behinderte aber gleichzeitig den Wildtyp in seiner Sekretion (Abb. 48). Dass durch Anwesenheit des Wildtyps eine Stabilisierung der DTM2-Mutante möglich war und diese transdominant wirkte, lässt darauf schließen, dass beide Domänen zumindest teilweise interagieren können zum Beispiel über einige konservierte Reste im N-terminalen Bereich der TM2. Dimere konnten auch schwach in nicht-reduzierender SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 57). Es ist zu vermuten, dass für die Sekretion aber eine korrekte Interaktion wichtig ist, die z.B. zusätzliche Konformationsänderungen ermöglicht und die durch die DTM2 nicht unterstützt wurde. Die Funktion als topologisches Typ II Signal konnte die DTM2 dagegen erfüllen, da die Proteine trotz geringer Stabilität topologisch korrekt (N-Glykosylierung an Asn146) waren (Abb. 46). Da die N-Glykosylierung von Glykoproteinen kotranslational stattfindet (Bergman und Kuehl, 1977; Hanover und Lennarz, 1981) konnte die fremde Domäne möglicherweise kurz in die Membran inserieren, so dass das chimäre Protein glykosyliert wurde. Da die DTM2 aber in ihrer Primärsequenz nicht der TM2 entsprach und deshalb eventuelle sequenzspezifische Interaktionen, wie zum Beispiel einen Leucin-Zipper, nur eingeschränkt ausbilden konnte, könnte das Protein nach der Glykosylierung abgebaut worden sein.

4.4.1.3 C-Terminus

Die Funktion des C-Terminus scheint im Gegensatz zu TM1 und TM2 zumindest für die Herstellung eines stabilen Proteins in DHBV und HBV komplementierbar zu sein. Der Austausch der beiden Domänen lieferte ein stabiles Protein, das zudem schwach sekretiert wurde (Abb. 53). Es konnte für HBV-S gezeigt werden, dass schon die Deletion der letzten 14 Aminosäuren des kleinen Hüllproteins dessen Sekretion verhinderte, während die Deletion der letzten 34 bzw. 64 Aminosäuren zusätzlich noch die Stabilität erniedrigte (Jenna und Sureau, 1999). Nur eine leichte Destabilisierung des Proteins konnten dagegen Ganem und Bruss

(1991b) beobachten, die die Aminosäuren ab 174 deletierten. Diese Abweichung lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Präparationsmethoden erklären. Um die Topologie zu erhalten und damit die Stabilität des Proteins zu gewährleisten, könnte somit die Kettenlänge des C-Terminus eine Rolle spielen. Die Kettenlänge des ersetzten DHBV C-Terminus war nur um 5 Aminosäuren kürzer als die Originalsequenz, was eine Komplementation bezüglich der Länge ermöglichte und vermutlich deshalb nicht die Stabilität des Proteins verringerte. Zudem könnten in den von anderen Gruppen deletierten Bereichen wichtige Reste liegen, die für die Funktion des C-Terminus essentiell sein könnten. Wie oben schon erwähnt war im Hinblick auf die Sekretion das Tryptophan an Position 196 zwar durch ein Phenylalanin, nicht aber durch ein Arginin ersetzbar. Auch das Leucin an Position 215 könnte eine für die Sekretion weitere essentielle Aminosäure des C-Terminus sein. Eine Veränderung zu Glutamin blockierte die Bildung von subviralen Partikeln (Araujo *et al.*, 2008). Beide Reste waren in DHBV konserviert und könnten somit die gleichen Aufgaben in DHBV und HBV erfüllen, was neben wildtypischer Stabilität auch die schwache Sekretion erklären könnte. Allerdings scheinen für eine korrekte Sekretion der Proteine zusätzlich andere Reste oder topologische Strukturen notwendig zu sein, die in DHBV nicht vorhanden waren. Eine vollständige Komplementation für die Sekretion war nur durch die Bereitstellung wildtypischer Domänen durch Koexpression von WT-S möglich (Abb. 55). Eine Funktion des C-Terminus könnte die Ausbildung von Interaktionen mit zellulären Proteinen oder umgebenden Lipiden sein, um diese zum Beispiel umzustrukturieren. Der Lipidanteil der subviralen Partikel ist mit 25 % sehr gering (Gavilanes *et al.*, 1982) und obwohl als Knospungsort das ER angenommen wird, passt die Lipidzusammensetzung nicht zu der der ER-Membran in unterschiedlichen Geweben (McMurray, 1974; Satoh *et al.*, 2000). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Lipide vermutlich nicht in einer klassischen Lipiddoppelmembran angeordnet sind, sondern in stark immobilisierter Form verpackt werden, zum Beispiel als eine Art Monolayer (Satoh *et al.*, 2000). Für eine solche Umlagerung der Lipide könnte der C-Terminus eine Rolle spielen. Er könnte zum Beispiel präferentiell mit Phosphatidylcholin (z.B. 1,2-Diacylglycerophosphocholin), dem Hauptlipidbestandteil der Partikel, interagieren und diese verstärkt in die Partikel einbauen. Für eine Interaktion mit zellulären Proteinen konnte in der Literatur kein Kandidat identifiziert werden.

4.4.2 Komplementationsversuche mit funktionell ähnlichen Domänen

Da eine Komplementation der Transmembrandomänen durch die DHBV-Domänen nur eingeschränkt möglich war, wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein Austausch durch funktionell ähnliche Signale durchgeführt. Dies gab Rückschlüsse darüber, welche Funktionen der Domänen durch ihre Signalfunktion und welche durch die Sequenz gekennzeichnet waren.

4.4.2.1 Austausch der TM1 durch das Typ I Signal der β -Lactamase

Das Typ I Signal der β -Lactamase anstelle der TM1 lieferte ein stabiles Protein, das in seiner Sekretion gestört war (Abb. 26). Wie auch für die sekretionsdefiziente zentrale Insertionsmutante konnte eine korrekte Topologie nur im M-Hintergrund nachgewiesen werden (Abb. 27). Da es sich bei der Signalsequenz der β -Lactamase um eine Sequenz handelt, die normalerweise von einer Peptidase geschnitten wird, wäre es möglich, dass bei Expression des chimären S-Proteins ohne das mittlere Hüllprotein die Domäne nicht in der Membran, sondern im Zytosol lokalisiert war und Funktionen der TM1 nicht mehr erfüllen konnte. Es könnte auch sein, dass die fremde Domäne durch ihre Konformation zum Beispiel eine wichtige Interaktion der wildtypischen TM2-Domänen zwischen zwei chimären Proteinen blockiert, was zur Sekretionsdefizienz führen könnte. Eine Dimerisierung über Disulfidbrücken schien aber möglich zu sein, da Dimere in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE detektiert werden konnten (Abb. 57).

Bei den bisherigen Mutanten wurde davon ausgegangen, dass ein transdominant negativer Phänotyp, wie ihn auch die β -Lactamase-Chimäre zeigte (Abb. 28), eine Interaktion von Wildtyp und Mutante erwarten lässt. Da aber die Sequenz von TM1 mit dem fremden Typ I Signal keine Homologie aufwies, ist eine direkte Interaktion zwischen beiden Domänen wenig wahrscheinlich. Möglich wäre aber, dass die wildtypischen TM2-Domänen von Wildtyp und Mutante miteinander interagieren konnten, aber durch das Typ I Signal im chimären Protein weitere Schritte für die Partikelbildung gestört waren. Des Weiteren könnte man auch vermuten, dass die Vielzahl an sekretionsdefizienten, stabilen, chimären S-Ketten in der ER-Membran Interaktionen zwischen unterschiedlichen wildtypischen S-Proteinen und damit deren Sekretion sterisch verhindern könnte. Dieser Aspekt könnte auch erklären, warum zusammen mit dem Wildtyp ein geringer Teil an Mutanten ausgeschleust wurde (Abb. 28). In einigen Bereichen der Membran könnten aufgrund statistischer Verteilung viele wildtypische und wenige mutierte S-Proteine liegen, so dass ein fast vollständig wildtypischer Partikel mit wenigen mutierten S gebildet und sekretiert werden kann. In anderen Experimenten konnte

interessanterweise gezeigt werden, dass das Ersetzen der TM1 durch TM-Domänen der beiden Hüllproteine E1 und E2 von HCV eine Kosekretion zuließ (Patient *et al.*, 2009b).

4.4.2.2 Austausch der TM2 durch das Typ II Signal des humanen Transferrin-Rezeptors

Sowohl Deletionen aus vorherigen Arbeiten, als auch Insertionen aus dieser Arbeit konnten zeigen, dass Veränderungen in der TM2 zu einer Destabilisierung des Proteins führen. Dies bestätigte sich auch beim Austausch der TM2 durch das funktionell ähnliche Typ II Signal des humanen Transferrin-Rezeptors (Abb. 42). Das Protein war nicht stabil und wurde nicht sekretiert. Die Destabilisierung konnte auch schon durch Bruss und Ganem (1991b) in ihren „pulse-chase“-Experimenten beobachtet werden. Die Verkürzung der Domäne auf die Länge der HBV-TM2 (19 AS) brachte auch nur eine geringe Erhöhung der Stabilität. Ähnlich wie bei der wenig stabilen DTM2-Mutante waren die Proteine dennoch topologisch korrekt, womit sich auch eine ähnliche Erklärung wie dort anbietet. Im Gegensatz zur DTM2-Mutante blockierte das Transdel8aa-Konstrukt aber nur geringfügig die Sekretion des Wildtyps und wurde durch ihn nicht stabilisiert (Abb. 44), was dafür spricht, dass keine Interaktion zwischen WT und Mutante stattfinden konnte, die eine negative Transdominanz hervorrufen konnte. Aufgrund der geringen Sequenzhomologie ist dies für TM2 auch sehr wahrscheinlich. Offensichtlich reichten die wildtypische TM1 sowie TM3/4 in der Transdel8aa-Mutante nicht aus, um eine negative Transdominanz hervorzurufen. Zudem ist die Konzentration der instabilen Mutanten in der Membran vermutlich relativ niedrig, weshalb sie die Interaktionen zwischen den WT-S-Proteinen nicht so stark beeinflussen könnten wie zum Beispiel die β -Lactamase-Chimäre. Zu bemerken ist auch, dass die Signale im Western Blot deutlich stärker erschienen als die Signale des korrespondierenden ELISA-Tests. In dem verwendeten ELISA wurden HBs-gekoppelte Mikropartikel verwendet, an die das HBsAg binden konnte und mit Hilfe eines zweiten Biotin-gekoppelten anti-HBs-Antikörpers und eines dritten anti-Biotin-Antikörpers, der an die alkalische Phosphatase gekoppelt war, detektiert wurde. Es wäre somit möglich, dass für die Detektion von HBsAg in diesem ELISA eine oligomere Struktur mit mehreren Epitopen benötigt wurde, diese aber durch Einbau der fremden Domäne des humanen Transferrin-Rezeptors in das S-Protein nicht mehr aufgebaut werden konnte und deshalb eine Erkennung im ELISA nicht mehr möglich war. Im Western Blot wurde ein anderer Antikörper verwendet, der denaturiertes S-Protein erkennen kann und deshalb ein

deutlich stärkeres Signal lieferte. Es wäre deshalb wichtig die Transdel8aa-Mutante mit einem nicht reduzierenden SDS-PAGE auf Dimerbildung zu untersuchen.

4.5 Teilweise Komplementation der Sekretionsdefizienz durch die präS2

In zwei Mutanten konnte die Sekretionsdefizienz durch die Anwesenheit der präS2-Domäne des mittleren Hüllproteins teilweise ausgeglichen werden. Es handelte sich dabei um die Mutante mit der Alanin-Insertion im zentralen Bereich der TM1 (Abb. 21) und die Mutante mit dem Typ I Signal der β -Lactamase anstelle der TM1 (Abb. 26). Um die Topologie der mutierten TM1-Domäne zu überprüfen, waren die beiden Mutationen zusätzlich zu S auch in M eingebracht worden. Dies war angebracht, da im verwendeten, experimentellen System mit der Glykosylierungsstelle an Asn146 nicht überprüfbar war, ob im S-Protein die veränderte TM1 wirklich in die Membran inserierte. Die Nutzung dieser Glykosylierungsstelle gibt aufgrund ihrer Lage in der luminalen Schleife nur Auskunft darüber, ob die TM2 in die Membran inseriert.

Mit Hilfe der zusätzlichen Glykosylierungsstelle in präS2 des mittleren Hüllproteins konnte die Translokationsfunktion der veränderten Domänen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden beide S-Mutanten wieder in geringem Maße zusammen mit dem ebenfalls mutierten M-Protein sekretiert. Eine Erklärung für diesen Phänotyp könnte sein, dass bei alleiniger Expression des S-Proteins die mutierte TM1 nicht mehr korrekt als Typ I Signal wirken konnte und im Zytoplasma verblieb. Dies hatte auf die Stabilität des Proteins keine Auswirkung, was ebenfalls beobachtet wurde, wenn die TM1 deletiert wurde (Bruss und Ganem, 1991b), verhinderte aber die Sekretion. Die präS2 könnte während der Translation des Proteins als eine Art Anker wirken, der verhindert, dass die mutierte TM-Domäne in das Zytoplasma zurückgelange. Dadurch könnte die Funktion der TM1 zumindest teilweise wiederhergestellt werden und eine Partikelbildung möglich machen. Eine ähnliche Funktion könnte auch die mCherry-Domäne und das zusätzliche Sekretionssignal in der mCherry-S-beta-Mutante haben, die ebenfalls wieder schwach sekretiert wurde (Abb. 31). Die präS2-Domäne könnte zudem die Typ I Funktion der mutierten TM1 unterstützen, da gezeigt wurde, dass sie als isoliertes Peptid ohne zusätzliche Komponenten die Membran passieren kann (Oess und Hildt, 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die präS2-Domäne über eine kurze amphipathische Sequenz dimerisieren kann (Hildt *et al.*, 1995). Diese Dimerisierung könnte zum einen dazu beitragen, dass die mutierte TM1 in der Membran gehalten wird und zum anderen mögliche defekte Interaktionen, die für eine Annäherung der Proteine notwendig sein könnten und durch die Mutationen gestört waren, teilweise ausgleichen.

Da die Nutzung der Glykosylierungsstelle am Asn4 des M-Proteins für die Rekrutierung und Bindung des Chaperons Calnexin notwendig ist (Werr und Prange, 1998), wäre es auch möglich, dass die Rekrutierung von Chaperonen durch die Glykosylierung an der präS2-Domäne die Faltung von M und S und ihre Position zueinander korrigiert, so dass die durch die Insertion veränderte Helixdrehung der Transmembrandomänen teilweise ausgeglichen werden könnte. Dass M und S gemischte Dimere ausbilden können, konnte von Wunderlich und Bruss (1996) gezeigt werden.

4.6 Modell für den Sekretionsweg

Es bleibt weiterhin zu klären, an welchen Schritten der Partikelbildung potentielle Interaktionen innerhalb der Transmembrandomänen oder zwischen Transmembrandomänen und zellulären Lipiden und/oder Proteinen eine entscheidende Rolle spielen. Da die sekretionsdefizienten Mutanten sehr variable Phänotypen aufwiesen, waren offensichtlich Funktionen der Membrandomänen sowohl in frühen als auch späten Schritten der Partikelbildung betroffen. Einige der Mutationen verhinderten die Ausbildung einer stabilen Proteinkette. Vor allem Mutanten der TM2, die als Membrananker und „Stop-Transfer“-Signal fungiert, waren hierbei betroffen. Man könnte sich ein Modell vorstellen, bei der die S-Proteine an der ER-Membran translatiert werden und in die Membran inserieren. Zur Stabilisierung des Proteins könnten Interaktionen nötig sein, bei denen vor allem TM2 eine wichtige Rolle übernimmt. Da das Protein auch ohne TM1 stabil bleibt, ist für die Stabilisierung des Proteins TM2 essentiell. Diese könnte zur Ausbildung von Dimeren beitragen, die über einen Leucin-Zipper miteinander verbunden sind und durch die Ausbildung von Disulfidbrücken enger verknüpft werden. Für den Aufbau dieser Disulfidbrücken könnte die Protein Disulfid Isomerase (PDI) im ER verantwortlich sein (Huovila *et al.*, 1992). Eine höhere Kreuzvernetzung der Dimere über Disulfidbrücken zu Oligomeren im ER ist durch die hohe Konzentration an Chaperonen aber eher unwahrscheinlich. Diese Theorie konnte durch Experimente gestützt werden, in denen subvirale Partikel mit PDI inkubiert wurden und als Endprodukt Dimere entstanden (Huovila *et al.*, 1992). Wo der eigentliche Knospungsprozess stattfindet, ist noch nicht geklärt. Huovila *et al.*, 1992 postulieren, dass die Dimere kurz nach ihrer Bildung in der ER-Membran zum ERGIC transportiert werden, wo die eigentliche Partikelbildung geschieht. Andere Gruppen sind dagegen der Meinung, dass die Knospung durch Bildung von langen Filamenten an der ER-Membran stattfindet (Patient *et al.*, 2007). Dass TM1, TM3 und der C-Terminus für den Knospungs- und Sekretionsprozess eine wichtige Rolle spielen, konnte durch die erzeugten Mutanten in dieser Arbeit gezeigt werden. Eine

mögliche Aufgabe der TM1 könnte eine Umlagerung oder Neuordnung von Lipiden während des Knospungsprozesses sein oder Interaktionen über das polare Glutamin mit anderen TM1-Domänen. Die mögliche amphipathische Helix im C-terminalen Bereich könnte, wie bereits oben diskutiert, der Biegung der Membran dienen. Man könnte sich also vorstellen, dass während des Knospungsprozesses durch Insertion der amphipatischen Helix in die ER-Membran eine Biegung der Membran hervorgerufen wird und die TM1 oder der C-Terminus zusätzlich die Lipidstruktur verändern. Durch die enge Verknüpfung der Proteine zu Dimeren und die dichte Packung in der ER-Membran könnte diese Membranbiegung die Knospung von langen Filamenten initiieren, wie sie von Patient *et al.* (2007) beobachtet wurden, oder von runden Partikeln. Diese könnten zum ERGIC transportiert werden, wo sich zum Beispiel durch Veränderung des pH-Wertes, Verringerung der Chaperonkonzentration oder Veränderung der Lipidzusammensetzung die S-Proteine konformationell neu ordnen, z.B. durch höhere Vernetzung zu Oligomeren. Dadurch könnten sich Vesikel von den langen Filamenten abschnüren und durch den Golgi nach außen transportiert werden. In den nativen Agarosegelen dieser Arbeit wurden intrazellulär zwei unterschiedlich große Formen an S-Partikeln detektiert, während extrazellulär nur die kleinere Form auftauchte (Abb. 58). Mutanten, die sekretionsdefizient waren, bildeten intrazellulär nur geringe Mengen der größeren Form, konnten aber nicht mehr die sekretierte Form produzieren. Man könnte nun vermuten, dass es sich bei der größeren Form um die langen Filamente handelt, die am ER knospen, oder um ERGIC-Kompartimente beladen mit S-Protein. Bei der kleineren, sekretierten Form handelt es sich vermutlich um 22 nm-Sphären. Die sekretionsdefizienten Mutanten könnten somit nur noch wenige Filamente und keine Sphären mehr produzieren.

4.7 Ausblick

Der Fokus für weiterführende Projekte könnte zum einen auf der Identifikation von Interaktionen zwischen den transmembranen Bereichen des Proteins liegen. Hierfür gibt es mehrere mögliche Ansätze. Man könnte die Transmembrandomänen an zwei unterschiedlich farbige Fluoreszenzproteine fusionieren (z.B. YFP und CFP) und dann über den Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) die Distanz zwischen den Domänen bestimmen.

In einem System, das zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Transmembrandomänen etabliert wurde (Langosch *et al.*, 1996; Brosig und Langosch, 1998), wird der ToxR Transkriptionsaktivator von *Vibrio cholerae* in *E. coli* Bakterien genutzt. Hierzu wird ein dreiteiliges Fusionsprotein erzeugt. Es besteht zum einen aus dem zytoplasmatischen Teil von ToxR, bei dem der anschließende transmembrane Bereich durch die zu untersuchende

Transmembransequenz ersetzt wird. Zum anderen wird an das periplasmatische Ende das Maltose-bindende Protein (MalE) von *E. coli* fusioniert. Diese Domäne ist wichtig, um das Konstrukt fest in der Membran zu verankern (Kolmar *et al.*, 1995). Interagieren nun die Transmembrandomänen in der inneren Membran miteinander, so entstehen ToxR Dimere, die den *ctx*-Promotor aktivieren können. In einem speziellen *E. coli*-Reporterstamm, beim dem das *lacZ*-Reportergen hinter den *ctx*-Promotor geschaltet wurde, kann die Aktivität der β -Galaktosidase im Zellysate Aufschluss darüber geben, ob Dimere entstanden sind (Kolmar *et al.*, 1994) und damit eine Interaktion zwischen den untersuchten Transmembrandomänen stattgefunden hat. In diesem System könnten sowohl wildtypische als auch mutierte Domänen getestet werden. Hierbei könnte zum Beispiel in der TM2 das mögliche Heptad-Motiv durch Mutationen verändert und somit näher charakterisiert werden, ob die beiden TM2-Domänen miteinander interagieren können.

Für die Immunfluoreszenzversuche könnten einige der interessanten Phänotypen (beta, zentrale Insertion TM1) durch Kofärbungen mit Kompartiment-spezifischen Markern weiter untersucht werden. Auch „life cell imaging“-Aufnahmen der Mutanten könnten Aufschluss darüber geben, wo und vor allem wann in der Zelle die Sekretion spezieller Mutanten blockiert ist.

Weiterführende Erkenntnisse könnten auch Versuche mit nativen Agarosegelen liefern. Es wäre einerseits interessant zu erfahren, um was es sich bei den unterschiedlichen intra- und extrazellulären Formen handeln könnte. Zum anderen sollten noch andere Mutanten in diesem System getestet werden, um zu verifizieren, dass sekretionsdefiziente Mutanten tatsächlich nur die „Partikelvorstufe“ bilden können.

5 Zusammenfassung

Als präventiver Schutz gegen das Hepatitis B Virus wird seit 1984 ein in Hefe produzierter Impfstoff eingesetzt. Hauptbestandteil des Impfstoffs ist das kleine virale Hüllprotein S, an dessen Oberfläche das immunogene Hauptepitop des Virus liegt (HBsAg). Es hat die besondere Fähigkeit, ohne zusätzliche virale Faktoren an intrazellulären Membranen zu knospen und als subviraler Partikel in sphärischer Form die Zelle zu verlassen. Der Prozess beginnt mit der Synthese von S als integrales Membranprotein mit vier Transmembrandomänen (TM1-4) am ER, wobei TM1 als Typ I- und TM2 als Typ II-Signal wirkt. Nach Bildung von Disulfidbrücken-verknüpften Dimeren erfolgt die Knospung der Partikel entweder an der ER-Membran oder an einem ER/Golgi intermediären Kompartiment (ERGIC) durch bisher ungeklärtes Mitwirken der unterschiedlichen Proteindomänen.

Um die Rolle der Transmembrandomänen für einzelne Schritte der Partikelbildung näher zu charakterisieren, wurden Punktmutationen (F zu L) sowie Insertionen in die transmembranen Bereiche von S eingeführt und die Domänen durch funktionell ähnliche Regionen anderer Proteine oder durch die TM des Enten Hepatitis B Virus (DHBV) ersetzt. Da die rekombinante Expression des kleinen Hüllproteins in Säugetier-Zellen die Bildung von subviralen Partikeln im Zellkultursystem ermöglicht, wurden die Konstrukte in Huh7-Zellen transfiziert und intra- und extrazellulär das S-Protein nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Primärequenz der TM1 für deren Funktion als Typ I Signal variieren kann, da Punktmutanten sekretionskompetent blieben und das Typ I Signal der β -Lactamase zumindest im Hintergrund des mittelgroßen Hüllproteins M die TM1 von HBV topologisch komplementieren konnte. Die Insertion eines zusätzlichen Alanins in den zentralen Bereich der TM1 hemmte dagegen die Sekretion und wirkte transdominant negativ auf die Sekretion des koexprimierten Wildtyps, während N- und C-terminale Insertionen eine Partikelabgabe ermöglichten. Da diese TM1-Mutanten zudem stabil waren, zeigte sich, dass die korrekte räumliche Orientierung der Helixreste der TM1 zueinander und zur restlichen Proteinkette ein essentieller Faktor für die Partikelbildung ist, um z. B. Interaktionen eingehen zu können, nicht aber die Stabilität beeinflusst.

Die TM2 scheint dagegen Funktionen zu erfüllen, die sowohl der Erhaltung der Proteinestabilität als auch der Sekretion dienen. N-, zentrale oder C-terminale Insertionen von einem Alanin in die TM2 verringerten die Stabilität und blockierten die Sekretion der Mutanten und des koexprimierten Wildtyps, was für eine direkte Interaktion spricht. Auch der Austausch der Domäne durch das fremde Typ II Signal des humanen Transferrin-Rezeptors destabilisierte das Protein und verhinderte die Sekretion.

Insertions- und Substitutionsmutanten des C-Terminus (TM3/4) und einer potentiellen amphipathischen Helix waren stabil und konnten zumindest zusammen mit dem Wildtyp sekretiert werden, was auf eine Funktion für die Knospung und nicht für die Interaktion der S-Proteinketten schließen lässt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Funktionen der TM1 und 2 zwischen Orthohepadnaviren (HBV) und Avihepadnaviren (DHBV) nicht konserviert sind, die C-Termini aber teilweise gegeneinander austauschbar sind.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Transmembrandomänen nicht nur für die korrekte Topologie essentiell sind, sondern aktiv am Prozess der Partikelbildung mitwirken.

6 Summary

A vaccine against hepatitis B virus produced in yeast is available since 1984. The immunogenic component of this vaccine is the small viral surface protein S with the main epitope on its surface (HBsAg). The protein has the outstanding ability to bud at intracellular membranes and leave the cell as spherical subviral particle without the help of additional viral factors. This process starts with the synthesis of S as an integral membrane protein with four transmembrane domains (TM1-4) at the ER. After formation of dimers linked by disulfide bridges particles bud at the membrane of the ER or an ER/Golgi intermediate compartment (ERGIC) with unknown contribution of the different protein domains.

To characterize the role of the transmembrane domains for the different steps in particle formation point mutations and insertions were introduced in the transmembrane region. Additionally, the domains were replaced by functional similar domains from foreign proteins and from the duck hepatitis B virus (DHBV). Recombinant expression of the small envelope protein S in mammalian cells results in the secretion of subviral lipoprotein particles. Therefore, the constructs were transfected in Huh7 cells and the intra- and extracellular S-protein was detected.

The results show that the primary sequence of TM1 could vary for its role as type I translocation signal since point mutations as well as the exchange by the type I signal of beta-lactamase were tolerated for membrane insertion at least in the background of the middle sized surface protein M. On the other hand insertion of an additional alanine in the centre of TM1 inhibited secretion of mutants and the coexpressed wildtype while N- and C-terminal insertions allowed particle formation. In addition all of these mutants formed stable proteins. It was shown, that the correct spatial orientation of the residues inside of the transmembrane helix and in relation to the rest of the protein chain is an essential factor for particle assembly but not for stability. This argues for interactions between the transmembrane domains required for particle generation.

Results for TM2 implicated a function which affects the stability and the secretion capacity. Insertions in the N-terminal, central and C-terminal part diminished the stability and blocked secretion also of coexpressed wildtype indicating for a direct interaction of mutant and wildtype S. Also exchange of TM2 with the type II signal of the human transferrine receptor leads to an instable protein and disabled secretion.

Insertion and substitution mutants of the C-terminus (TM3/TM4) and a potential amphipathic helix upstream were stable and could be secreted at least with coexpressed wildtype S indicating that these regions have a function in budding but not for the interaction of S chains.

In addition it was shown that the function of TM1 and 2 were not conserved between Orthohepadnaviruses (HBV) und Avihepadnaviruses (DHBV) but for the C terminus partial complementation was possible.

We conclude that all transmembrane domains are not only important for the correct transmembrane topology but also contribute actively to the assembly of subviral particles.

7 Literatur

1. **Adamian, L. und J. Liang.** 2001. Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins. *J Mol Biol* **311**:891-907.
2. **Aggerbeck, L. P. und D. L. Peterson.** 1985. Electron microscopic and solution X-ray scattering observations on the structure of hepatitis B surface antigen. *Virology* **141**:155-61.
3. **Araujo, N. M., C. O. Vianna, C. C. Soares und S. A. Gomes.** 2008. A unique amino acid substitution, L215Q, in the hepatitis B virus small envelope protein of a genotype F isolate that inhibits secretion of hepatitis B virus subviral particles. *Intervirology* **51**:81-6.
4. **Bartenschlager, R., M. Junker-Niepmann und H. Schaller.** 1990. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol* **64**:5324-32.
5. **Bartenschlager, R. und H. Schaller.** 1992. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *Embo J* **11**:3413-20.
6. **Bavand, M., M. Feitelson und O. Laub.** 1989. The hepatitis B virus-associated reverse transcriptase is encoded by the viral pol gene. *J Virol* **63**:1019-21.
7. **Beck, J. und M. Nassal.** 2007. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**:48-64.
8. **Bergman, L. W. und W. M. Kuehl.** 1977. Addition of glucosamine and mannose to nascent immunoglobulin heavy chains. *Biochemistry* **16**:4490-7.
9. **Berting, A., C. Fischer, S. Schaefer, W. Garten, H. D. Klenk und W. H. Gerlich.** 2000. Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res* **68**:35-49.
10. **Blumberg, B. S., B. J. Gerstley, D. A. Hungerford, W. T. London und A. I. Sutnick.** 1967. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* **66**:924-31.
11. **Bock, C. T., P. Schranz, C. H. Schroder und H. Zentgraf.** 1994. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* **8**:215-29.
12. **Borel, C., C. Sunyach, O. Hantz, C. Trepo und A. Kay.** 1998. Phosphorylation of DHBV pre-S: identification of the major site of phosphorylation and effects of mutations on the virus life cycle. *Virology* **242**:90-8.
13. **Breiner, K. M., S. Urban und H. Schaller.** 1998. Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J Virol* **72**:8098-104.
14. **Brosig, B. und D. Langosch.** 1998. The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci* **7**:1052-6.
15. **Bruss, V.** 2004. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* **106**:199-209.
16. **Bruss, V.** 2007. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* **13**:65-73.
17. **Bruss, V.** 1997. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* **71**:9350-7.
18. **Bruss, V. und D. Ganem.** 1991a. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:1059-63.
19. **Bruss, V. und D. Ganem.** 1991b. Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* **65**:3813-20.

20. **Bruss, V., J. Hagelstein, E. Gerhardt und P. R. Galle.** 1996. Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* **218**:396-9.
21. **Bruss, V., X. Lu, R. Thomssen und W. H. Gerlich.** 1994. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *Embo J* **13**:2273-9.
22. **Cattaneo, R., H. Will, N. Hernandez und H. Schaller.** 1983. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* **305**:336-8.
23. **Cattaneo, R., H. Will und H. Schaller.** 1984. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *Embo J* **3**:2191-6.
24. **Chisari, F. V., P. Filippi, A. McLachlan, D. R. Milich, M. Riggs, S. Lee, R. D. Palmiter, C. A. Pinkert und R. L. Brinster.** 1986. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J Virol* **60**:880-7.
25. **Chojnacki, J., D. A. Anderson und E. V. Grgacic.** 2005. A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome. *J Virol* **79**:14945-55.
26. **Crowley, C. W., C. C. Liu und A. D. Levinson.** 1983. Plasmid-directed synthesis of hepatitis B surface antigen in monkey cells. *Mol Cell Biol* **3**:44-55.
27. **Crowther, R. A., N. A. Kiselev, B. Bottcher, J. A. Berriman, G. P. Borisova, V. Ose und P. Pumpens.** 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* **77**:943-50.
28. **Dane, D. S., C. H. Cameron und M. Briggs.** 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**:695-8.
29. **Dubois, M. F., C. Pourcel, S. Rousset, C. Chany und P. Tiollais.** 1980. Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:4549-53.
30. **Eble, B. E., V. R. Lingappa und D. Ganem.** 1986. Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* **6**:1454-63.
31. **Eble, B. E., V. R. Lingappa und D. Ganem.** 1990. The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* **64**:1414-9.
32. **Eble, B. E., D. R. MacRae, V. R. Lingappa und D. Ganem.** 1987. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**:3591-601.
33. **Fernholz, D., M. Stemler, M. Brunetto, F. Bonino und H. Will.** 1991. Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. *J Hepatol* **13 Suppl 4**:S102-4.
34. **Funk, A., M. Mhamdi, H. Will und H. Sirma.** 2007. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* **13**:91-103.
35. **Gallina, A., F. Bonelli, L. Zentilin, G. Rindi, M. Muttini und G. Milanese.** 1989. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol* **63**:4645-52.
36. **Ganem, D.** 1991. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol* **168**:61-83.
37. **Ganem, D. und H. E. Varmus.** 1987. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* **56**:651-93.

38. **Gavilanes, F., J. M. Gonzalez-Ros und D. L. Peterson.** 1982. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem* **257**:7770-7.
39. **Gerelsaikhan, T., J. E. Tavis und V. Bruss.** 1996. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* **70**:4269-74.
40. **Gerhardt, E. und V. Bruss.** 1995. Phenotypic mixing of rodent but not avian hepadnavirus surface proteins into human hepatitis B virus particles. *J Virol* **69**:1201-8.
41. **Gerhardt, E.** 1992. Phänotypische Substitution von Oberflächenproteinen des Hepatitis B Virus durch homologe Proteine anderer Hepadnaviren, Diplomarbeit AG Bruss, Göttingen
42. **Gerlich, W. H. und M. Kann.** 2005. Hepatitis B, S. 1226-1268. *In* B. W. J. Mahy und V. ter Meulen (ed.), Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, vol. 2. ASM Press, Washington, DC.
43. **Gilbert, R. J., L. Beales, D. Blond, M. N. Simon, B. Y. Lin, F. V. Chisari, D. I. Stuart und D. J. Rowlands.** 2005. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:14783-8.
44. **Gough, N. M.** 1983. Core and E antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs. *J Mol Biol* **165**:683-99.
45. **Grgacic, E. V.** 2002. Identification of structural determinants of the first transmembrane domain of the small envelope protein of duck hepatitis B virus essential for particle morphogenesis. *J Gen Virol* **83**:1635-44.
46. **Grgacic, E. V. und D. A. Anderson.** 1994. The large surface protein of duck hepatitis B virus is phosphorylated in the pre-S domain. *J Virol* **68**:7344-50.
47. **Grgacic, E. V., C. Kuhn, und H. Schaller.** 2000. Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation. *J Virol* **74**:2455-8.
48. **Grgacic, E. V. und H. Schaller.** 2000. A metastable form of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: low-pH release results in a transition to a hydrophobic, potentially fusogenic conformation. *J Virol* **74**:5116-22.
49. **Gripon, P., J. Le Seyec, S. Rumin und C. Guguen-Guillouzo.** 1995. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* **213**:292-9.
50. **Guo, J. T. und J. C. Pugh.** 1997. Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis. *J Virol* **71**:1107-14.
51. **Gurezka, R., R. Laage, B. Brosig und D. Langosch.** 1999. A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J Biol Chem* **274**:9265-70.
52. **Hatton, T., S. Zhou und D. N. Standring.** 1992. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* **66**:5232-41.
53. **Hanover, J. A. und W. J. Lennarz.** 1981. Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins. *Arch Biochem Biophys* **211**:1-19.
54. **Heermann, K. H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten und W. H. Gerlich.** 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* **52**:396-402.
55. **Hildt, E., S. Urban und P. H. Hofschneider.** 1995. Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* **11**:2055-66.

56. **Hirsch, R. C., J. E. Lavine, L. J. Chang, H. E. Varmus und D. Ganem.** 1990. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* **344**:552-5.
57. **Hruska, J. F., D. A. Clayton, J. L. Rubenstein und W. S. Robinson.** 1977. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* **21**:666-72.
58. **Huovila, A. P., A. M. Eder und S. D. Fuller.** 1992. Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* **118**:1305-20.
59. **Ito, K., Y. Qin, M. Guarnieri, T. Garcia, K. Kwei, M. Mizokami, J. Zhang, J. Li, J. R. Wands und S. Tong.** Impairment of hepatitis B virus virion secretion by single-amino-acid substitutions in the small envelope protein and rescue by a novel glycosylation site. *J Virol* **84**:12850-61.
60. **Jenna, S. und C. Sureau.** 1998. Effect of mutations in the small envelope protein of hepatitis B virus on assembly and secretion of hepatitis delta virus. *Virology* **251**:176-86.
61. **Jenna, S. und C. Sureau.** 1999. Mutations in the carboxyl-terminal domain of the small hepatitis B virus envelope protein impair the assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol* **73**:3351-8.
62. **Kolmar, H., C. Frisch, G. Kleemann, K. Gotze, F. J. Stevens und H. J. Fritz.** 1994. Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an *Escherichia coli* promoter to the association constant of REIV. *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**:61-70.
63. **Kolmar, H., F. Hennecke, K. Gotze, B. Janzer, B. Vogt, F. Mayer und H. J. Fritz.** 1995. Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *Embo J* **14**:3895-904.
64. **Koshland, D., R. T. Sauer und D. Botstein.** 1982. Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of beta-lactamase in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **30**:903-14.
65. **Kuroki, K., R. Cheung, P. L. Marion und D. Ganem.** 1994. A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. *J Virol* **68**:2091-6.
66. **Kuroki, K., F. Eng, T. Ishikawa, C. Turck, F. Harada und D. Ganem.** 1995. gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J Biol Chem* **270**:15022-8.
67. **Lambert, C., T. Doring und R. Prange.** 2007. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* **81**:9050-60.
68. **Lambert, C. und R. Prange.** 2001. Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem* **276**:22265-72.
69. **Langosch, D., B. Brosig, H. Kolmar und H. J. Fritz.** 1996. Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol* **263**:525-30.
70. **Le Duff, Y., R. Julithe, F. Penin und C. Sureau.** 2010. Characterization of membrane-association determinants in the small HBV envelope protein. Abstract International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2010.
71. **Lepere-Douard, C., M. Trotard, J. Le Seyec und P. Gripon.** 2009. The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J Virol* **83**:11819-29.

72. **Lien, J. M., C. E. Aldrich und W. S. Mason.** 1986. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* **57**:229-36.
73. **Liu, C. C., D. Yansura und A. D. Levinson.** 1982. Direct expression of hepatitis B surface antigen in monkey cells from an SV40 vector. *DNA* **1**:213-21.
74. **Löffler-Mary, H., J. Dumortier, C. Klentsch-Zimmer und R. Prange.** 2000. Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* **270**:358-67.
75. **Lucifora, J., S. Arzberger, D. Durantel, L. Belloni, M. Strubin, M. Levrero, F. Zoulim, O. Hantz und U. Protzer.** 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol.*
76. **Macrae, D. R., V. Bruss und D. Ganem.** 1991. Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology* **181**:359-63.
77. **Mangold, C. M., F. Unckell, M. Werr und R. E. Streeck.** 1997. Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles. *Arch Virol* **142**:2257-67.
78. **Marion, P. L., S. S. Knight, M. A. Feitelson, L. S. Oshiro und W. S. Robinson.** 1983. Major polypeptide of duck hepatitis B surface antigen particles. *J Virol* **48**:534-41.
79. **Marion, P. L., L. S. Oshiro, D. C. Regnery, G. H. Scullard und W. S. Robinson.** 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2941-5.
80. **Mason, W. S., G. Seal und J. Summers.** 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**:829-36.
81. **McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller und M. R. Hilleman.** 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**:178-80.
82. **McClelland, A., L. C. Kuhn und F. H. Ruddle.** 1984. The human transferrin receptor gene: genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. *Cell* **39**:267-74.
83. **McMurray, W. C.** 1974. Phospholipids in subcellular organelles and membranes, S. 205-251. *In* G. B. Ansell, J. N. Hawthorne und R. M. C. Dawson (ed.), *Form and Function of Phospholipids*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
84. **Mingarro, I., P. Whitley, M. A. Lemmon und G. von Heijne.** 1996. Ala-insertion scanning mutagenesis of the glycoporphin A transmembrane helix: a rapid way to map helix-helix interactions in integral membrane proteins. *Protein Sci* **5**:1339-41.
85. **Moriarty, A. M., B. H. Hoyer, J. W. Shih, J. L. Gerin und D. H. Hamer.** 1981. Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:2606-10.
86. **Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane und J. Sato.** 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**:3858-63.
87. **Nassal, M.** 1992. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* **66**:4107-16.
88. **Nassal, M. und A. Rieger.** 1996. A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first-strand DNA synthesis. *J Virol* **70**:2764-73.
89. **Nassal, M., A. Rieger und O. Steinau.** 1992. Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. *J Mol Biol* **225**:1013-25.

90. **Neurath, A. R. und S. B. Kent.** 1988. The pre-S region of hepadnavirus envelope proteins. *Adv Virus Res* **34**:65-142.
91. **Newbold, J. E., H. Xin, M. Tencza, G. Sherman, J. Dean, S. Bowden und S. Locarnini.** 1995. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* **69**:3350-7.
92. **Nowak, M. A., S. Bonhoeffer, A. M. Hill, R. Boehme, H. C. Thomas und H. McDade.** 1996. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4398-402.
93. **Oess, S. und E. Hildt.** 2000. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther* **7**:750-8.
94. **Op De Beeck, A., R. Montserret, S. Duvet, L. Cocquerel, R. Cacan, B. Barberot, M. Le Maire, F. Penin und J. Dubuisson.** 2000. The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J Biol Chem* **275**:31428-37.
95. **Ostapchuk, P., P. Hearing und D. Ganem.** 1994. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *Embo J* **13**:1048-57.
96. **Ou, J. H., O. Laub und W. J. Rutter.** 1986. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:1578-82.
97. **Ou, J. H. und W. J. Rutter.** 1987. Regulation of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the preS-1 protein. *J Virol* **61**:782-6.
98. **Patient, R., C. Hourieux, P. Y. Sizaret, S. Trassard, C. Sureau und P. Roingeard.** 2007. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* **81**:3842-51.
99. **Patient, R., C. Hourieux und P. Roingeard.** 2009a. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol* **11**:1561-70.
100. **Patient, R., C. Hourieux, P. Vaudin, J. C. Pages und P. Roingeard.** 2009b. Chimeric hepatitis B and C viruses envelope proteins can form subviral particles: implications for the design of new vaccine strategies. *N Biotechnol* **25**:226-34
101. **Patra, M.** 2010. Construction and characterization of an RFP-labeled envelope protein of HBV. Masterarbeit AG Bruss.
102. **Patzer, E. J., G. R. Nakamura, C. C. Simonsen, A. D. Levinson und R. Brands.** 1986. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol* **58**:884-92.
103. **Patzer, E. J., G. R. Nakamura und A. Yaffe.** 1984. Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J Virol* **51**:346-53.
104. **Persing, D. H., H. E. Varmus und D. Ganem.** 1986. Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide. *Science* **234**:1388-91.
105. **Persing, D. H., H. E. Varmus und D. Ganem.** 1987. The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol* **61**:1672-7.
106. **Peterson, D. L., N. Nath und F. Gavilanes.** 1982. Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J Biol Chem* **257**:10414-20.
107. **Pollack, J. R. und D. Ganem.** 1994. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J Virol* **68**:5579-87.
108. **Ponsel, D. und V. Bruss.** 2003. Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol* **77**:416-22.

109. **Prange, R., R. Nagel und R. E. Streeck.** 1992. Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol* **66**:5832-41.
110. **Prange, R. und R. E. Streeck.** 1995. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *Embo J* **14**:247-56.
111. **Prinz, W. A., und J. E. Hinshaw.** 2009. Membrane-bending proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**:278-91.
112. **Ren J., W. Longping, G. Xinjiao, J. Changjiang, X. Yu und Y. Xuebiao.** 2009. DOG 1.0: Illustrator of Protein Domain Structures. *Cell Research* **19**:271–273
113. **Robinson, W. S. und L. I. Lutwick.** 1976. The virus of hepatitis, type B. *N Engl J Med* **295**:1168-75/1232-6.
114. **Rodriguez-Crespo, I., E. Nunez, J. Gomez-Gutierrez, B. Yelamos, J. P. Albar, D. L. Peterson und F. Gavilanes.** 1995. Phospholipid interactions of the putative fusion peptide of hepatitis B virus surface antigen S protein. *J Gen Virol* **76 (Pt 2)**:301-8.
115. **Rothmann, K., M. Schnolzer, G. Radziwill, E. Hildt, K. Moelling und H. Schaller.** 1998. Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol* **72**:10138-47.
116. **Satoh, O., H. Imai, T. Yoneyama, T. Miyamura, H. Utsumi, K. Inoue und M. Umeda.** 2000. Membrane structure of the hepatitis B virus surface antigen particle. *J Biochem* **127**:543-50.
117. **Satoh, O., M. Umeda, H. Imai, H. Tunoo und K. Inoue.** 1990. Lipid composition of hepatitis B virus surface antigen particles and the particle-producing human hepatoma cell lines. *J Lipid Res* **31**:1293-300.
118. **Schlicht, H. J., C. Kuhn, B. Guhr, R. J. Mattaliano und H. Schaller.** 1987. Biochemical and immunological characterization of the duck hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol* **61**:2280-5.
119. **Seeger, C., F. Zoulim und W. S. Mason.** 2007. Hepadnaviruses, p. 2977-3030. *In* D. M. Knipe (ed.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 1.
120. **Sheu, S. Y. und S. J. Lo.** 1992. Preferential ribosomal scanning is involved in the differential synthesis of the hepatitis B viral surface antigens from subgenomic transcripts. *Virology* **188**:353-7.
121. **Simon, K., V. R. Lingappa und D. Ganem.** 1988. Secreted hepatitis B surface antigen polypeptides are derived from a transmembrane precursor. *J Cell Biol* **107**:2163-8.
122. **Sprengel, R., E. F. Kaleta und H. Will.** 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* **62**:3832-9.
123. **Sprengel, R., C. Kuhn, H. Will und H. Schaller.** 1985. Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes. *J Med Virol* **15**:323-33.
124. **Stibbe, W. und W. H. Gerlich.** 1983. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol* **46**:626-8.
125. **Summers, J. und W. S. Mason.** 1982. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**:403-15.
126. **Summers, J., J. M. Smolec und R. Snyder.** 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:4533-7.
127. **Swameye, I. und H. Schaller.** 1997. Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing pre-S translocation and glycosylation. *J Virol* **71**:9434-41.
128. **Tavis, J. E. und D. Ganem.** 1995. RNA sequences controlling the initiation and transfer of duck hepatitis B virus minus-strand DNA. *J Virol* **69**:4283-91.

129. **Tavis, J. E., S. Perri und D. Ganem.** 1994. Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer. *J Virol* **68**:3536-43.
130. **Tourasse, N. J. und W. H. Li.** 2000. Selective constraints, amino acid composition, and the rate of protein evolution. *Mol Biol Evol* **17**:656-64.
131. **Urban, S. und P. Gripon.** 2002. Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. *J Virol* **76**:1986-90.
132. **Valenzuela, P., M. Quiroga, J. Zaldivar, P. Gray und W. J. Rutter.** 1980. The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. *In* B. N. Fields, R. Jaenisch und C. F. Fox (ed.), *Animal virus genetics*. Academic Press, Inc., New York.
133. **Weber, M., V. Bronsema, H. Bartos, A. Bosserhoff, R. Bartenschlager und H. Schaller.** 1994. Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol* **68**:2994-9.
134. **Werr, M. und R. Prange.** 1998. Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J Virol* **72**:778-82.
135. **WHO.** 2002. www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_who.cdscr.ryo2002_2.pdf.
136. **Will, H., W. Reiser, T. Weimer, E. Pfaff, M. Buscher, R. Sprengel, R. Cattaneo und H. Schaller.** 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* **61**:904-11.
137. **Wunderlich, G. und V. Bruss.** 1996. Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch Virol* **141**:1191-205.
138. **Wynne, S. A., R. A. Crowther und A. G. Leslie.** 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* **3**:771-80.
139. **Zerial, M., P. Melancon, C. Schneider und H. Garoff.** 1986. The transmembrane segment of the human transferrin receptor functions as a signal peptide. *Embo J* **5**:1543-50.
140. **Zheng, J., F. Schodel und D. L. Peterson.** 1992. The structure of hepadnaviral core antigens. Identification of free thiols and determination of the disulfide bonding pattern. *J Biol Chem* **267**:9422-9.
141. **Zhou, S. und D. N. Standring.** 1992. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10046-50.
142. **Zhu, Y., T. Yamamoto, J. Cullen, J. Saputelli, C. E. Aldrich, D. S. Miller, S. Litwin, P. A. Furman, A. R. Jilbert und W. S. Mason.** 2001. Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* **75**:311-22.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Volker Bruß danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die gute wissenschaftliche Betreuung, das angenehme Arbeitsklima und vor allem dafür, dass die Türe zu seinem Büro mir immer offen stand.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl möchte ich mich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch danke ich für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Prüfungskommission zu übernehmen.

Ich danke der Leiterin des Instituts für Virologie Prof. Dr. Ulrike Protzer und allen Mitarbeitern für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, eine angenehme und ungezwungene Arbeitsatmosphäre, für lustige Grill- und Partyabende, unterhaltsame Mensabesuche und schnee- und skireiche Betriebsausflüge in die nahen Alpen.

Andrea Weicht, Theresa Asen und Raindy Tedjokusumo danke ich ganz herzlich, dass sie immer Zeit gefunden haben meine unzähligen HBsAg-ELISA-Proben zu pipettieren und zu messen.

Der „goldene Labofant“ und bester Dank gehen an meine Mitstreiterinnen Beate und Karin ohne die der lange Weg der Doktorarbeit viel beschwerlicher und weit weniger lustig gewesen wäre. Ich danke euch für Korrekturen, Aufmunterungen und viele schöne Stunden in und nach dem Labor.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir während der ganzen Zeit immer den Rücken gestärkt, mich aufgemuntert und an mich und meine Ziele geglaubt haben.

Meinem Freund Steff danke ich dafür, dass er keine Sekunde an meinen Fähigkeiten gezweifelt hat und mir immer mit Rat, Tat und Humor zur Seite stand.