

Untersuchungen über Wechselwirkungen
zwischen Proteinen der Leber und dem
großen Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz

Cora Hartmann-Stühler

geboren in Würzburg

Mainz, 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Johannes
Gutenberg-Universität, Mainz, angefertigt.

Dekan.:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2001

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

Hartmann-Stühler, C. und Prange, R. (zur Publikation eingereicht bei *Journal of Virology*).

Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin-related protein.

Die Vorstellung der Ergebnisse fand auf folgenden Kongressen statt:

Internationale Kongresse:

Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (1998). University of California, San Diego, USA.

Hartmann-Stühler, C., Werr, M., Prange, R.: Identification of interaction partners of the preS1 domain of large hepatitis B envelope protein.

Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (2000). Institut Pasteur, Paris, Frankreich.

Hartmann-Stühler, C., Werr, M., Prange, R.: Interaction of hepatitis B virus large envelope protein with the clathrin adaptor protein gamma2-adaptin.

Nationale Kongresse:

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (1999). Universität Bremen.

Hartmann-Stühler, C., Werr, M., Prange, R.: Identification of interaction partners of the preS1 domain of large hepatitis B envelope protein.

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Hepatitis-B-Virus.....	1
1.1.1	Struktur und Genom von HBV.....	1
1.1.2	Replikation und Infektionszyklus von HBV.....	4
1.1.3	Die Hüllproteine von HBV.....	8
1.2	Zielsetzung.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	14
2.1.2	Puffer und Medien.....	14
2.1.3	Zelllinien.....	14
2.1.3.1	Prokaryonten.....	14
2.1.3.2	Eukaryonten.....	14
2.1.3.3	Antikörper.....	15
2.1.4	Plasmide.....	16
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Molekulargenetische Methoden.....	19
2.2.2	Proteinchemische Methoden.....	19
2.2.2.1	Darstellung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	19
2.2.2.2	Nachweisverfahren von Proteinen.....	20
2.2.2.2.1	Quantitative Bestimmung der Proteine nach Bradford.....	20
2.2.2.2.2	Coomassie-Blau-Färbung.....	20
2.2.2.2.3	Ponceau S-Färbung.....	20
2.2.2.2.4	Westerntansfer und Immunoblot.....	20
2.2.2.2.5	Nachweis durch Chemilumineszenz.....	20
2.2.2.2.6	Nachweis durch ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay").....	21
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	21
2.2.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	21
2.2.3.2	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> und deren Reinigung.....	21
2.2.3.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	22
2.2.3.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	22
2.2.3.5	Expression von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	22
2.2.3.6	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	23
2.2.3.7	Kultivierung von Säugerzellen.....	23
2.2.3.8	Transfektion von Säugerzellen.....	23
2.2.3.9	Zellyse mit CHAPS-Puffer.....	24
2.2.3.10	Radiomarkierung von Säugerzellen und Immunpräzipitation.....	24
2.2.3.11	<i>In vitro</i> -Transkription/Translation/Translokation.....	25
2.2.3.12	Enzymatische Deglykosylierung von Proteinen mit Peptid:N-glykosidase F.....	25
2.2.4	Immunologische Methoden.....	26
2.2.4.1	Immunisierung von Kaninchen.....	26
2.2.4.2	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	26
2.2.5	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	27
2.2.5.1	Konstruktion der Plasmide, die das Fängerprotein exprimieren.....	30
2.2.5.2	Die AD.cDNA-Bank.....	31
2.2.5.3	Transformation und Selektion positiver Klone.....	32
2.2.5.4	-Galaktosidase-Test.....	33
2.2.5.5	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2.5.6	Transformation von <i>E. coli</i> mit Hefe-Plasmid-DNA.....	34
2.2.5.7	Restriktionsanalyse der Klone zur Auffindung von Duplikaten.....	35
2.2.5.8	Eliminierung von falsch-positiven Klonen.....	35

2.2.6	Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen	35
2.2.6.1	<i>In Vitro</i> -Bindungstest von Proteinen	35
2.2.6.2	Overlay-Assay	36
2.2.6.3	Nachweis der Bindung von HBV-Virionen an C1r durch ELISA	36
2.2.6.4	Koimmunpräzipitation	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H-System)	38
3.1.1	Konstruktion des Fängerproteins	38
3.1.2	Y2H-Test	40
3.1.2.1	Y2H-Test mit BD.L1-70	40
3.1.2.2	Y2H-Test mit BD.L44-108	45
3.2	Charakterisierung der Klone	47
3.2.1	Eliminierung weiterer falsch-positiver Klone	48
3.2.2	AD.Ä2 und AD.50P: Hämopexin	48
3.2.3	AD.C1: Protein E der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese	49
3.2.4	AD.G3: C1r	49
3.2.5	AD.L3	50
3.2.6	AD.T4: H4 der Inter-α-Trypsin-Inhibitor-Familie	51
3.2.7	AD.W5: "Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase 3	52
3.2.8	AD.1C: γ2-Adaptin	53
3.2.9	AD.48P	55
3.2.10	AD.60P: Dolichol-Phosphat-Mannose-Transferase Polypeptid 3	55
3.3	Verifizierung von Protein/L-Protein Interaktionen durch weitere biochemische Methoden	56
3.3.1	Die H4/PräS1-Interaktion	57
3.3.1.1	<i>In Vitro</i> -Bindung von PräS1 und H4	57
3.3.1.2	Herstellung von polyklonalem Antiserum gegen H4	60
3.3.1.3	Expression von H4 <i>in vivo</i>	61
3.3.1.4	<i>In Vitro</i> -Bindung von PräS1 und H4-HA	62
3.3.1.5	<i>In Vivo</i> -Bindung von L-Protein und H4-HA	62
3.3.2	Die C1r/PräS1-Interaktion	63
3.3.2.1	<i>In Vitro</i> -Bindung von PräS1 und C1r	63
3.3.3	Die L-Protein/γ2-Adaptin-Interaktion	65
3.3.3.1	<i>In Vitro</i> -Bindung der PräS1-Domäne und γ 2-Adaptin	65
3.3.3.2	<i>In Vivo</i> -Bindung von L-Protein und γ 2-Adaptin	66
3.3.3.3	Intrazelluläre Lokalisation von L-Protein und γ 2-Adaptin	68
3.3.3.4	Die L/ γ 2-Adaptin-Interaktion beruht auf der zytosolisch ausgerichteten PräS-Domäne des L-Proteins	71
3.3.3.5	Kartierung der Bindungsdomäne von γ 2-Adaptin, die für die Interaktion mit dem L-Protein notwendig ist	72
4	DISKUSSION	74
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	LITERATUR	89
7	ANHANG	98
7.1	Abkürzungsverzeichnis	98
7.2	Abbildungsverzeichnis	99
7.3	Tabellenverzeichnis	100

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) gehört zur Familie der Hepadnaviren. Diese kleinen, umhüllten, hepatotropen DNA-Viren zeichnen sich durch ihre Wirts- und Gewebespezifität aus und verursachen bei Infektion eine Leberentzündung (Hepatitis).

Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus gehören nach wie vor zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten des Menschen, obwohl seit Anfang der achtziger Jahre eine wirksame Schutzimpfung existiert (Kane, 1996). Nach Angaben der Weltgesundheitsbehörde (WHO) werden mehr als zwei Milliarden Menschen im Laufe ihres Lebens mit HBV infiziert, von ihnen bleiben 350 bis 400 Millionen chronische Träger des Virus. Durch die kontinuierliche Leberschädigung bei persistierender Infektion haben HBV-Träger ein erhöhtes Risiko, an Leberzirrhose oder einem primären Leberzellkarzinom zu erkranken, sodaß an den Spätfolgen der Infektion jährlich 250.000 Patienten sterben (Hollinger, 1996; Blumberg, 1997). Damit ist die Infektion mit HBV nach AIDS die häufigste tödliche Infektionskrankheit.

Die Durchseuchung der Bevölkerung mit HBV besteht global, allerdings lassen sich länderabhängig große Unterschiede feststellen. Während HBV in Industrieländern nur sporadisch-endemisch auftritt, weisen Länder in Ostasien, Afrika und Lateinamerika eine Trägerrate von 7% bis 20% auf, wobei in Hochendemiegebieten bis zu 80% der Bevölkerung mit HBV infiziert sind.

Der Infektionsverlauf reicht von völliger Symptomlosigkeit bei zwei Dritteln der Betroffenen über eine schwache selbstlimitierende Hepatitis mit vollständiger Heilung bis hin zu einer fulminanten Hepatitis mit Todesfolge. Die akute Hepatitis B kann in eine chronische Form übergehen, wobei dies, bezogen auf alle HBV-Infektionen, bei 5% bis 10% der Fälle eintritt (Hoofnagle, 1981; Thefeld *et al.*, 1994; Hollinger, 1996). HBV kann durch Blut, Blutprodukte und Körpersekrete wie Samen, Tränenflüssigkeit, Speichel oder Muttermilch übertragen werden (Heathcote *et al.*, 1974; Hoofnagle, 1981; Davison *et al.*, 1987). Neben der horizontalen Transmission, die vor allem in Industrieländern durch geeignete hygienische Maßnahmen und Überprüfung von Blutprodukten auf HBV eingeschränkt werden konnte, kommt der vertikalen Übertragung von HBV von Müttern auf ihre Kinder, während oder nach der Geburt, besondere Bedeutung zu. Die perinatal infizierten Kinder entwickeln in 90% der Fälle eine chronische Hepatitis; dadurch sinkt ihre durchschnittliche Lebenserwartung auf 30 bis 40 Jahre (Stevens *et al.*, 1975; Beasley *et al.*, 1977).

1.1.1 Struktur und Genom von HBV

Das Serum HBV-infizierter Patienten enthält infektiöse Viruspartikel mit einer sphärischen Gestalt und einem Durchmesser von 42 nm (Abb. 1) (Dane *et al.*, 1970). Sie

bestehen aus einer Lipoproteinhülle, die sich zu 25% aus wirtseigenen Lipiden und zu 75% aus den drei viralen Hüllproteinen zusammensetzt. Diese teilen sich in 60% bis 80% kleine Hüllproteine (S), ~ 20 % mittlere Hüllproteine (M) und ~ 10 % große Hüllproteine (L) auf. Im Inneren der Hülle befindet sich ein ikosaedrisches Kapsid, das aus 90 oder 120 viralen Core-Protein-Dimeren gebildet wird und einen Durchmesser von 28 nm besitzt (Bottcher *et al.*, 1997). Es enthält die virale DNA mit der kovalent gebundenen viralen DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase.

Neben infektiösen Virionen lassen sich auch filamentöse oder sphärische Formen nicht infektiöser HBV-Partikel nachweisen (Abb. 1). Sie sind mit einem Durchmesser von 22 nm kleiner als Virionen und enthalten weder Kapsid noch DNA. Diese subviralen Partikel (SVP) werden in 10^3 - bis 10^5 -fachem Überschuß gegenüber Virionen ins Serum abgegeben und tragen ebenfalls wie diese das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg). Die Funktionen dieser leeren Virushüllen sind bis heute nicht hinreichend geklärt.

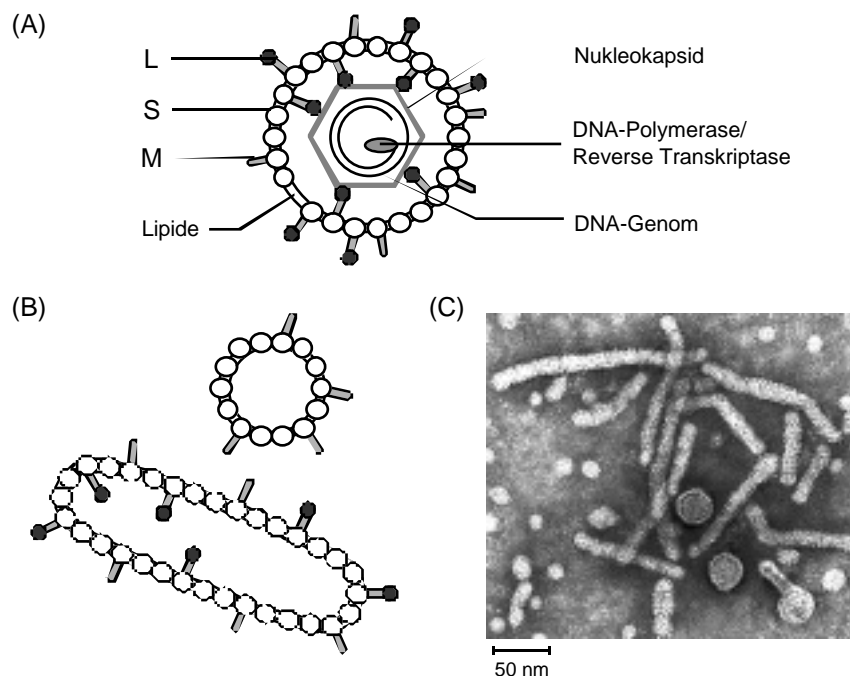


Abb. 1: **Das Hepatitis-B-Virus.** Schematische Darstellung (A) des HBV-Virions und (B) seiner sphärischen und filamentösen subviralen Partikel. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme von HBV und subviralen Partikeln.

Das Hepatitis-B-Virus gehört zu den kleinsten bekannten DNA-Viren. Sein Genom (Abb. 2) besteht, je nach Subtyp, aus 3182 (*ayw*), 3215 (*adr*) oder 3221 (*adw*) Basenpaaren, wobei es nur teilweise als Doppelstrang vorliegt. Der Minusstrang (-) liegt komplett vor, ohne kovalent geschlossen zu sein. Der gegenläufige Plusstrang (+) umfaßt 1700 bis 2800 Basen und trägt an seinem 3'-Ende die virale DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase (Pol) assoziiert. Der Minusstrang besitzt vier offene Leserahmen (ORF), die sich teilweise überlappen. Sie kodieren für (1) die Hüllproteine, (2) die Prä-Core/Core-Proteine, (3) die DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase und (4) das X-Protein (Abb. 2).

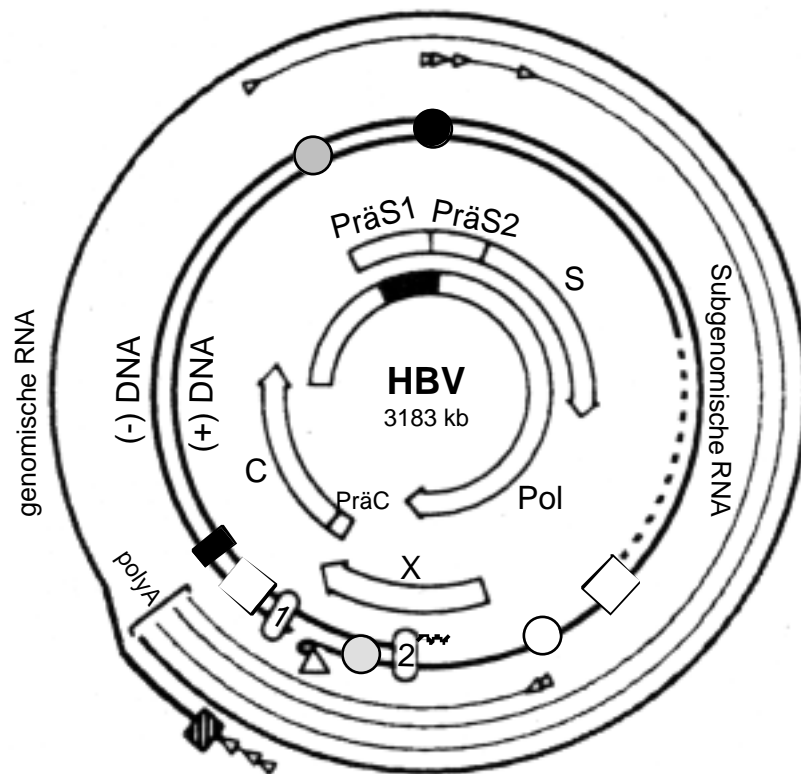


Abb. 2: **Organisation des HBV-Genoms.** Der innere geschlossene Ring zeigt das teilweise doppelsträngige DNA-Genom mit seinen Kontrollelementen (Kreise zeigen die vier verschiedenen Promotoren; das gefüllte Rechteck steht für das Polyadenylierungssignal, leere Rechtecke für die Enhancer-Elemente I und II; die mit 1 und 2 beschrifteten Boxen zeigen die direkten Wiederholungssequenzen DR1 und DR2; das Dreieck symbolisiert die Bindungsdomäne der Polymerase, die an den Minusstrang [(-) DNA] gebunden ist; die Zickzacklinie steht für den RNA-Primer am 5'-Ende des Plusstranges [(+) DNA]). Die Pfeile im Inneren zeigen die vier überlappenden Leserahmen, die für die Hüllproteine (PräS1, PräS2, S), die Polymerase (Pol), das X-Protein (X) und die Core-Proteine (PräC, C) kodieren. Die schwarz markierte Domäne im Pol-ORF stellt einen nicht-essentiellen Spacer dar. Die äußeren Linien symbolisieren die viralen Transkripte, die Pfeilspitzen geben deren mögliche Startpunkte an. \blacktriangleright markiert das Enkapsidierungssignal (modifiziert nach Nassal, 1996).

Neben den kodierenden Sequenzen trägt das HBV-Genom eine Reihe von Kontrollsequenzen für die Regulation und Transkription, wie die ω -Struktur (Junker-Niepmann *et al.*, 1990), die Enhancer-Elemente I und II (EnhI und EnhII) und die direkten Wiederholungssequenzen DR1 und DR2, die den Replikationsstartpunkt festlegen (Seeger *et al.*, 1986). Obwohl vier offene Leserahmen und vier Promotoren vorhanden sind, besitzt nicht jeder Leserahmen einen eigenen Promotor. Der Core-Promotor veranlaßt die Transkription einer 3,5 kb langen, N-terminal variablen, prägenomischen mRNA, die in das Nukleokapsid verpackt wird oder als Matrize für die Kapsidproteine und die Polymerase dient. Der Leserahmen für die Kapsidproteine enthält dabei zwei Startkodons in Phase, die die Synthese des PräCore/Core-Proteins und des kürzeren Core-Proteins ermöglichen. Die Transkription der Hüllproteine wird durch zwei Promotoren gesteuert. Die Verwendung des PräS1-Promotors erzeugt eine 2,4 kb große mRNA, von der das L-Protein translatiert wird, das sich aus der PräS1-, der PräS2- und der S-Region zusammensetzt. Für die Produktion von M- und S-Hüllproteinen, die aus der

PräS2- und der S-Region bzw. nur aus der S-Region bestehen, wird unter Einfluß des S-Promotors eine 2,1 kb große mRNA erstellt. Obwohl alle drei genannten mRNA-Transkripte auch für das X-Protein kodieren, wird für dieses eine eigene 0,7 kb große mRNA erzeugt, die unter der Kontrolle des X-Promotors steht. Alle Transkripte nutzen eine gemeinsame Polyadenylierungssequenz, die etwa 20 Basenpaare vor dem 3'-Ende des Minusstranges liegt (Abb. 2) (Cattaneo *et al.*, 1984).

Die heute bekannten Vertreter der Hepatitis-B-Viren werden in folgende Genera unterteilt: (1) Orthohepadnaviren, deren Vertreter in Säugetieren vorkommen, und (2) Avihepadnaviren, die Vögel befallen. Zu den Orthohepadnaviren gehören das Hepatitis-B-Virus des Menschen (HBV), des Waldmurmeltieres (WHV) (Summers *et al.*, 1978) und des Erdhörnchens (GSHV) (Marion *et al.*, 1980). Zu den Avihepadnaviren zählen neben weiteren das Enten Hepatitis-B-Virus (DHBV) (Mason *et al.*, 1980) und das Reiher Hepatitis-B-Virus (HHBV) (Sprengel *et al.*, 1988). Die Avihepadnaviren weisen zu den Orthohepadnaviren einige Unterschiede auf. Unter anderem besitzen sie kein X-Gen, das PräCore/Core-Gen ist fast ein Drittel größer und sie besitzen nur zwei Hüllproteine, L- und S-Protein, da das Startkodon für das M-Protein in der PräS-Region des Hüllprotein-Gens fehlt. Allen Hepadnaviren ist aber eine charakteristische Genomorganisation und Virusstruktur ebenso gemeinsam wie ihre ausgeprägte Wirts- und Zellspezifität. Hepadnaviren besitzen einen ausgeprägten Tropismus für Hepatozyten, jedoch repliziert humanes HBV auch in Lymphzellen des peripheren Blutes, des Thymus und der Milz ebenso wie in Epithelzellen des Gallengangs und in Pankreasinsinzellen (Blum *et al.*, 1983; Hollinger, 1996).

1.1.2 Replikation und Infektionszyklus von HBV

Die Infektion der Wirtszelle beginnt mit einer Anheftung der Virionen an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Hepatozyten und einer anschließenden Aufnahme in die Zelle. Trotz intensiver Forschung sind bei HBV weder die Rezeptoren noch die Mechanismen der Anheftung und Aufnahme hinreichend aufgeklärt. Schwierigkeiten bereiten vor allem die Etablierung eines effektiven *In Vitro*-Infektionssystems. Es konnte gezeigt werden, daß primäre Hepatozyten infizierbar sind (Ochiya *et al.*, 1989; Galle *et al.*, 1994); HBV-suszeptible Zelllinien fehlen jedoch.

Für die Bindung an Leberzellen wurde von Neurath *et al.* (1986) nachgewiesen, daß die Aminosäuresequenz (AS) 21-47 des L-Proteins notwendig ist. Für den erfolgreichen Eintritt werden jedoch sowohl die AS 3-77 (Le Seyec *et al.*, 1999) als auch die Myristilierung (Gripon *et al.*, 1995) des L-Proteins benötigt. Für HBV werden als L-spezifischer Rezeptor verschiedene Kandidaten wie der Asialoglykoproteinrezeptor (Treichel *et al.*, 1994) oder der Interleukin-6-Rezeptor (Neurath *et al.*, 1992) diskutiert. Weitere Kandidaten sind der IgA-Rezeptor (Pontisso *et al.*, 1992), ein bisher uncharakterisiertes 31 kD-Protein (Dash *et al.*, 1992), humane hepatozelluläre Glyceraldehyd-3-

Phosphat-Dehydrogenase (Petit *et al.*, 1992) und eine neutrale Metalloproteinase (Budkowska *et al.*, 1993; Budkowska *et al.*, 1997). Für die S-Domäne konnte eine spezifische Bindung mit Endonexin II nachgewiesen werden (Hertogs *et al.*, 1993), das möglicherweise als (Ko)Rezeptor eine Rolle spielt. Es wurde auch eine Bindung von S-Protein an das Serumprotein Apolipoprotein H nachgewiesen und so der eventuelle Transport des Virus zur Leber erklärt (Mehdi *et al.*, 1994). Außerdem wurde gezeigt, daß humane Serumproteine wie polymerisiertes Serumalbumin (Machida *et al.*, 1983; Pontisso *et al.*, 1989), Transferrin (Franco *et al.*, 1992) und Fibronektin (Budkowska *et al.*, 1995) spezifisch an die PräS2-Domäne des M-Proteins binden und damit möglicherweise eine indirekte Bindung an Hepatozyten vermitteln.

Eine Alternative zur Untersuchung des Infektionszyklus der Hepadnaviren ist das Enten-Modell-System mit DHBV, bei dem durch Mutationsanalyse der PräS-Region des L-Proteins eine 85 AS-lange Sequenz (AS 30-115 der insgesamt 165 AS-langen PräS-Region) identifiziert werden konnte, die als Rezeptor-Interaktionsdomäne dient (Urban *et al.*, 1998). Diese Domäne bindet spezifisch ein Glykoprotein (gp180), das als Carboxypeptidase D identifiziert wurde (Kuroki *et al.*, 1994; Urban *et al.*, 1998). Gp180 ist vor allem mit dem Golgi-Apparat assoziiert; es wird allerdings ständig zwischen der Zellmembran und intrazellulären Membranen transportiert und kann so die Aufgabe eines Oberflächenrezeptors wahrnehmen (Breiner *et al.*, 1998; Eng *et al.*, 1999). Analysen zur Infektionsinhibition durch antivirale Antikörper oder durch lösliches gp180 legen nahe, daß gp180 ein Rezeptor für DHBV ist (Kuroki *et al.*, 1995; Breiner *et al.*, 1998; Urban *et al.*, 1998). Da gp180 aber nicht nur auf Hepatozyten sondern auch in anderen Zelltypen exprimiert wird, die für eine DHBV-Infektion nicht permissiv sind (Kuroki *et al.*, 1994), ist anzunehmen, daß noch weitere Korezeptoren für eine Infektion notwendig sind. Als möglicher Kandidat für einen Korezeptor ist vor kurzem die Glycin-Decarboxylase (p120) identifiziert worden (Tong *et al.*, 1999). Von den Ergebnissen, die im DHBV-System gewonnen wurden, kann aber vermutlich nicht auf die Rezeptoren von HBV geschlossen werden, da sich die verschiedenen Hepadnaviren aufgrund ihrer relativ heterologen PräS-Sequenzen wahrscheinlich unterschiedlicher, artspezifischer Rezeptoren bedienen (Kuroki *et al.*, 1995).

Als nächster Schritt im Infektionszyklus findet die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle durch Membranfusion statt. Bisher sind zwei Strategien der Penetration von Viren bekannt: (1) Für einige umhüllte Viren konnte gezeigt werden, daß sie von ihrer Wirtszelle endozytiert werden. Die Viren werden dann in Endosomen einem erniedrigten pH-Wert ausgesetzt, der Bereiche ihrer Hüllproteine freilegt, die eine Membranfusion bewirken. (2) Andere umhüllte Viren fusionieren in einem pH-unabhängigen Prozess mit der Zelloberfläche ihrer Wirtszelle (zum Überblick, siehe Greber *et al.*, 1994). Für HBV verstärken sich die Hinweise, daß ein pH-unabhängiger Mechanismus die Aufnahme vermittelt (Rigg *et al.*, 1992; Hagelstein *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte

gezeigt werden, daß beim Eintritt des Virus jedoch Energie verbraucht wird (Köck *et al.*, 1996). Insgesamt betrachtet, weisen die Ergebnisse auf einen pH-unabhängigen, aber ATP-verbrauchenden endozytotischen Prozess hin, der für umhüllte Virionen unüblich ist. In der S-Region der Hepadnaviren ist eine N-terminale 16 AS-lange Sequenz stark konserviert, von der bei Untersuchungen gezeigt wurde, daß sie möglicherweise eine Membranfusion vermittelt (Rodriguez-Crespo *et al.*, 1994; Rodriguez-Crespo *et al.*, 1999), die zur Freisetzung des Virus in der Wirtszelle führt. Dabei scheint eine proteolytische Prozessierung eine Rolle zu spielen, die möglicherweise die virale Fusionssequenz im Aminoterminus des S-Proteins freilegt (Lu *et al.*, 1996).

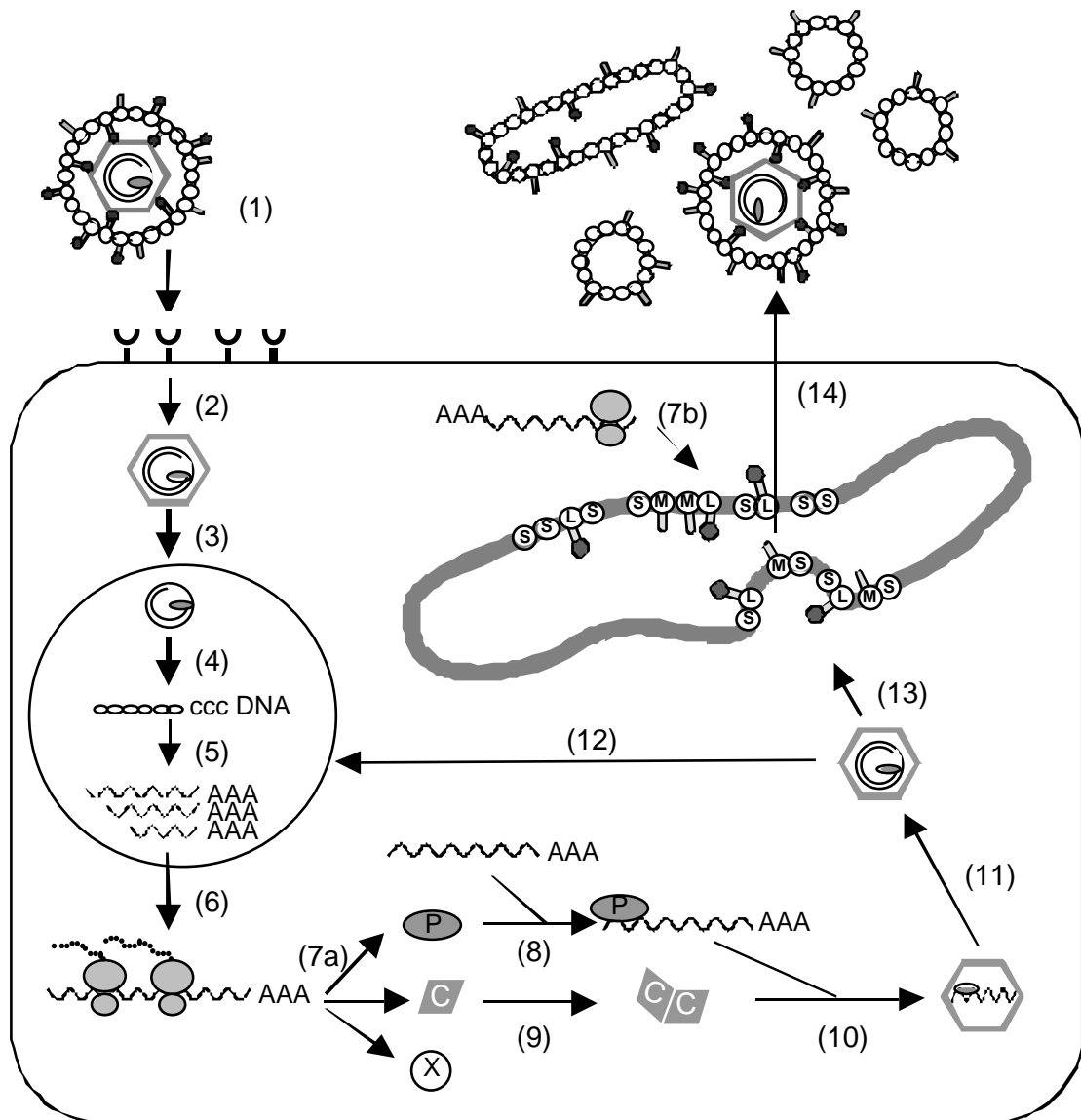


Abb. 3: **Replikationszyklus von HBV.** (1) Adhäsion, (2) Penetration, (3) Freisetzung und DNA-Transport in den Zellkern, (4) Überführung der DNA in cccDNA, (5) Transkription, (6) Transport der mRNAs in das Zytoplasma, (7a) Translation der Polymerase, der Core- und X-Proteine im Zytoplasma, (7b) Translation der Hüllproteine am ER, (8) kovalente Bindung der Polymerase an das RNA-Prägenom, (9) Dimerisierung der Core-Proteine, (10) Zusammenbau des Nukleokapsids unter Einschluß des Prägenoms, (11) reverse Transkription des Prägenoms, (12) Re-Import von Nukleokapsiden in den Zellkern, (13) Umhüllung der reifen Nukleokapside durch die viralen Hüllproteine, (14) HBV-Sekretion.

Nach Freisetzung aus der Hülle wandert das Nukleokapsid, vermutlich durch Phosphorylierungen gesteuert, die eine Strukturänderung im Core-Protein zur Folge haben (Kann *et al.*, 1994; Kann *et al.*, 1999), zum Zellkern. Dort wird der Polymerase/DNA-Komplex entlassen und gelangt durch die Kernporen in den Zellkern, wo das partiell doppelsträngige Genom in ein doppelsträngiges, kovalent-geschlossenes zirkuläres DNA-Molekül (cccDNA) umgewandelt wird (Abb. 3). Anschließend erfolgt die Transkription des Virusgenoms durch die zelluläre RNA-Polymerase II und die Bildung der oben erwähnten mRNAs, einschließlich des RNA-Prägenoms. Die mRNAs werden in das Zytoplasma transportiert. Dort werden von ihnen die verschiedenen viralen Proteine translatiert.

Die Synthese der Hüllproteine findet am Endoplasmatischen Reticulum (ER) statt, in dessen Membran sie während der Translation eingelagert werden. Die Polymerase, das PräCore/Core-, das Core- und das X-Protein werden an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert. Die genaue Funktion des X-Proteins ist noch nicht endgültig geklärt. Bisher konnte nur im Waldmurmeltier-Modell gezeigt werden, daß das X-Protein für eine Etablierung der Infektion wichtig ist (Chen *et al.*, 1993). Auch ist bekannt, daß X-Protein neben der Funktion eines transkriptionellen Transaktivators im Lebenszyklus von HBV auch onkogenes Potential besitzt (Hohne *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991; Feitelson *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 1998).

Das PräCore/Core-Protein unterscheidet sich gegenüber dem Core-Protein durch den Besitz eines 29 AS-langen N-terminalen Signalpeptids. Dieses dirigiert das PräCore/Core-Protein zum intrazellulären Sekretionsweg, wo es weiter prozessiert wird. Die Funktion des PräCore/Core-Proteins ist nicht genau geklärt, aber es wird angenommen, daß es eine regulatorische Rolle in der Virusmorphogenese spielt (Ou *et al.*, 1986; Bruss *et al.*, 1988; Guidotti *et al.*, 1996) und während der Infektion die Immunantwort des Wirtes moduliert (Schlicht *et al.*, 1989; Milich *et al.*, 1990). Die Core-Proteine dimerisieren kurz nach ihrer Synthese und lagern sich an den Pol- (RNA)-Komplex an. Dieser Komplex wird gebildet, indem Pol an das 5'-Ende der prägenomischen RNA bindet, von der sie translatiert wird. Diese RNA-Bindungssequenz wird auch als Enkapsidierungssignal bezeichnet und besteht aus einer stabilen Haarnadelschleife.

kommt im RNA-Prägenom aufgrund dessen Überlänge gegenüber dem DNA-Genom sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende vor (Abb. 2). Im vollständigen Nukleokapsid beginnt dann die reverse Transkription, bei der die Bindung zwischen dem -Signal und der Hydroxylgruppe des Tyrosin-92 von Pol als Primer dient ("Proteinpriming") (Bosch *et al.*, 1988). Es wird ein Oligonukleotid in der Region zwischen dem am 5'-Ende gelegenen -Signal und dem 5'-Ende der mRNA polymerisiert. Anschließend kommt es zu einem Transfer dieses Initiationskomplexes an das -Signal, das am 3'-Ende des Transkripts lokalisiert ist. Das Oligonukleotid hybridisiert mit komplementären Sequenzen und der DNA-Minusstrang wird polymerisiert (Wang *et al.*, 1992). Nach

Abbau der RNA aus dem RNA/DNA-Hybrid durch RNaseH-Aktivität von Pol bleibt am Ende ein kurzes Stück RNA zurück, das als Primer für die Synthese des gegenläufigen DNA-Plusstranges verwendet wird.

Ein Teil der Nukleokapside wird zum Zellkern zurücktransportiert, wo sie den Zyklus erneut durchlaufen und dadurch zur Anreicherung von HBV-Genomen in der Zelle beitragen (Tuttleman *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1990) und der Persistenz des Virus dienen. Diese Amplifikation der cccDNA wird, wie im Enten-HBV-Modell gezeigt, durch das L-Protein reguliert (Summers *et al.*, 1990; Lenhoff *et al.*, 1994). Die anderen Kapside binden noch während der Replikation an virale Hüllproteine, die in die ER-Membran eingelagert sind und werden umhüllt. Dies führt dazu, daß keine weiteren Nukleotide in das Kapsid gelangen können und die Synthese des DNA-Plusstranges mangels Nukleotide unvollständig bleibt. Für die Verpackung der Kapside ist deren Phosphorylierungsstatus wichtig (Yu *et al.*, 1994). Ein Modell erklärt die ausschließliche Verpackung von reifen Kapsiden, die mindestens den kompletten DNA-Minusstrang enthalten, durch eine Konformationsänderung der Core-Proteine. Diese entsteht beim Auflösung der Bindung des RNA/DNA-Hybrids an die Core-Proteine, nachdem der Minusstrang polymerisiert wurde. Diese Änderung ermöglicht eine Phosphorylierung der Core-Proteine (Gerelsaikhon *et al.*, 1996). Es ist zu vermuten, daß die reifen Virionen in das Lumen des Intermediären Kompartiments sprossen (Huovila *et al.*, 1992) und über den konstitutiven sekretorischen Weg aus der Zelle transportiert werden, ohne diese zu lysieren.

1.1.3 Die Hüllproteine von HBV

Am Beispiel der Hüllproteine wird deutlich, mit welcher Wirtschaftlichkeit HBV organisiert ist. Die drei Hüllproteine werden von einem einzigen ORF kodiert (Abb. 4), allerdings mit unterschiedlichen Startkodons und einem gemeinsamen Stoppkodon. Allen gemeinsam ist die C-terminale Sequenz von 226 AS, aus der das kleinste der Hüllproteine, das S-Protein, besteht (Abb. 4). Das mittlere M-Protein ist N-terminal um eine Sequenz von 55 AS verlängert, die auch als PräS2-Region bezeichnet werden. Das große L-Hüllprotein umfaßt zusätzlich zum M-Protein eine weitere Sequenz von 108 AS (Subtyp ayw) oder 119 AS (Subtyp adw), die PräS1-Region heißt. Die PräS1- und PräS2-Regionen werden auch als PräS-Region zusammengefaßt. Die Vorsilbe "PräS" bezeichnet jedoch nur die Lage strangaufwärts von S, nicht aber, daß "PräS" ein Signalpeptid enthält, noch daß die längeren Proteine M und L zu kürzeren S-Proteinen prozessiert werden können.

Gesteuert durch topogene Signale in der S-Region, werden alle Hüllproteine während der Synthese in die ER-Membran eingelagert (Eble *et al.*, 1987; Eble *et al.*, 1990; Ostapchuk *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur S-Region zeigen die PräS1- und PräS2-Region keine Signalsequenz-Aktivitäten. Bei der Insertion in die ER-Membran wird die

Konsensussequenz für N-Glykosyltransferasen (Asparagin-146 in S) bei allen drei Hüllproteinen kotranslational glykosyliert. Allerdings findet die Modifizierung nicht immer statt, sodaß L-, M- und S-Proteine jeweils in glykosylierter und unglykosylierter Form vorliegen. Das M-Protein trägt zusätzlich am Asparagin-4 seiner PräS2-Region ein N-Glykan. Die Konsensussequenzen für N-Glykosyltransferasen in der PräS-Region des L-Proteins bleiben unglykosyliert, nur das Glycin-2 der PräS1-Region wird durch die kovalente Bindung einer Myristinsäure modifiziert.

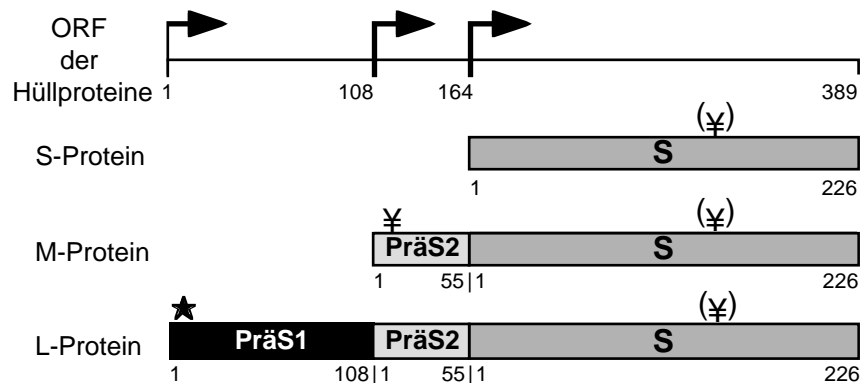


Abb. 4: **Die Hüllproteine von HBV.** Schematische Darstellung des Hüllprotein-ORFs und der Genprodukte S, M und L; die Zahlen geben die entsprechenden Aminosäurepositionen an; ¥ symbolisiert N-Glykane; ★ kennzeichnet die Myristinsäure.

Nach Translation und Einlagerung der Hüllproteine in die ER-Membran kommt es unter Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken zur Dimerbildung, die während ihres Transports vom ER zum Intermediären Kompartiment weiter oligomerisieren (Huovila *et al.*, 1992; Mangold *et al.*, 1997). Auch in Abwesenheit von viralen Nukleokapsiden knospen die zusammengelagerten Hüllproteine von der Wirtsmembran und bilden subvirale Lipoproteinpartikel (SVP) sphärischer oder tubulärer Form, die kleinen, leeren Virushüllen entsprechen. Dies ist eine Besonderheit von HBV. Für die sphärischen SVPs lagern sich etwa 50 Dimere zusammen. Sie sprossen vermutlich in das Intermediäre Kompartiment und verlassen die Zelle über den konstitutiven Sekretionsweg (Heermann *et al.*, 1991). Bei Virionen wird noch zusätzlich das im Zytosol gebildete Nukleokapsid von den Hüllproteinen unter Beteiligung der S-Region und zytosolisch ausgerichteten PräS1-Domänen verpackt (Ueda *et al.*, 1991; Bruss, 1997; Le Seyec *et al.*, 1999; Löffler-Mary *et al.*, 2000).

In der Virushülle der Virionen sind alle Formen der Hüllproteine vertreten, ebenso lassen sich bei einer HBV-Infektion alle drei Hüllproteine auf der Oberfläche der SVPs nachweisen. Wird die Fähigkeit der einzelnen Hüllproteine untersucht Lipoproteinpartikel zu bilden, indem Zellen mit den verschiedenen Hüllproteinen transfiziert werden, so zeigt sich, daß das S-Protein hinreichend für die Bildung von SVPs ist (Patzer *et al.*, 1984; Eble *et al.*, 1986). Im Gegensatz zum M- und S-Protein wird das L-Protein von transfizierten Zellen nicht sezerniert (Ou *et al.*, 1986; McLachlan *et al.*, 1987). Die Retention des L-Proteins im ER wird einerseits durch seine N-terminale Sequenz

einschließlich der Myristinsäure (Kuroki *et al.*, 1989; Prange *et al.*, 1991), und andererseits durch eine 35 AS-lange Sequenz am C-Terminus der PräS1-Region verursacht (Nemeckova *et al.*, 1994). Bei einer Koexpression von L- und S-Proteinen wird die Sekretion der SVPs durch L-Proteine blockiert. Werden die Anteile der exprimierten Hüllproteine so verändert, daß ein Überschuß von S-Proteinen gegenüber L-Proteinen vorliegt, so wird der dominant negative Effekt des L-Proteins aufgehoben und SVPs werden sezerniert. Es wird vermutet, daß die Retention von L-Proteinen während einer natürlichen Infektion die Anzahl der L-Proteine in der Zelle erhöhen soll, damit diese dann ihre Funktion als Bindungspartner des Nukleokapsids bei der Verpackung in die Virushülle übernehmen können. Die Funktion der SVPs ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Lange Zeit wurde angenommen, daß sie bei der Immunevasion helfen und als Ablenkungsobjekte für das Immunsystem dienen. Inzwischen konnte am Beispiel von DHBV gezeigt werden, daß SVPs auch die Infektiosität von Virionen steigern können (Bruns *et al.*, 1998).

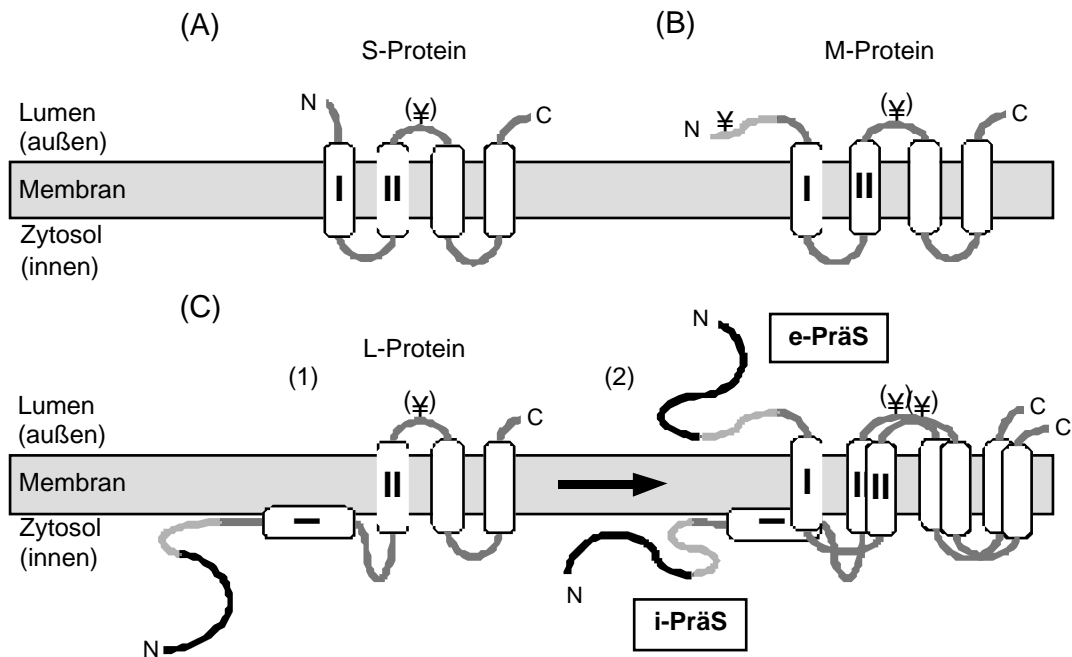


Abb. 5: **Transmembrane Struktur der drei Hüllproteine.** (A) S-Protein, (B) M-Protein und (C) L-Protein (1) während der Synthese und (2) nach der Reifung; I und II kennzeichnet die Lage von Signal I und II in der S-Region.

Die S-Region besteht aus vier hydrophoben Domänen, die durch zwei hydrophile Regionen unterbrochen werden. Die N-terminalen hydrophoben Bereiche werden als Signal I und Signal II bezeichnet und besitzen topogene Signaleigenschaften. Diese vermitteln die Translokation und Insertion in die ER-Membran (Abb. 5 A) (Eble *et al.*, 1987; Bruss *et al.*, 1991; Prange *et al.*, 1992). Für die dritte und vierte hydrophobe Region wird vermutet, daß sie in zwei weiteren α -helikale Transmembrandurchgängen vorliegen, doch der endgültige Nachweis wurde bisher nicht erbracht (Eble *et al.*, 1987). Die hydrophobe Schleife zwischen Signal I und Signal II ist ca. 55 AS lang und liegt auf

der zytosolischen Seite der ER-Membran. Die zweite hydrophile Schleife (AS 99-168) ist wahrscheinlich ins ER-Lumen gerichtet (Stirk *et al.*, 1992; Wunderlich *et al.*, 1996).

Das M-Protein nimmt vermutlich eine vergleichbare Struktur wie das S-Protein ein. Die Signale der S-Region steuern die Translokation der strangaufwärts gelegenen PräS2-Region in das ER-Lumen, sodaß das M-Protein eine ähnliche Topologie wie das S-Protein besitzt (Abb. 5 B) (Eble *et al.*, 1990). Einen weiteren Hinweis auf die Lage der PräS2-Region im ER-Lumen gibt auch die Glykosylierung von M-Proteinen am Asparagin-4 der PräS2-Domäne und die Zugänglichkeit von PräS2-spezifischen Epitopen auf der Oberfläche sezernierter Partikel (Heermann *et al.*, 1984).

Im Gegensatz zu allen bisher bekannten viralen Hüllproteinen zeigt das große Hüllprotein eine völlig andere, duale Topologie der PräS-Region, bei der die PräS-Region sowohl innen als auch außen auf der viralen Lipidhülle vorkommt (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange *et al.*, 1995). In diesen Studien wurde in Proteaseschutzversuchen *in vitro* und *in vivo* gezeigt, daß während oder kurz nach der Synthese des L-Proteins die PräS-Region zytosolisch ausgerichtet bleibt, während die S-Region kotranslational in die ER-Membran eingelagert wird (Abb. 5 C (1)). Ein weiterer Hinweis auf diese Topologie ist das Glykosylierungsmuster von L-Proteinen, deren PräS-Region, trotz Konsensussequenzen für N-Glykosidasen, gänzlich unglykosyliert bleibt, während das Asparagin-146 der S-Region, wie im M- und S-Protein auch, partiell glykosyliert wird. Wenn durch Anfügen einer Signalsequenz an den N-Terminus des L-Proteins eine kotranslationale Translokation der PräS-Region forciert wird, so werden auch die bisher ungenutzten Glykosylierungsstellen glykosyliert (Bruss *et al.*, 1995; Gallina *et al.*, 1995). Erst in einem distalen ER- oder Prä-Golgi-Kompartiment wird etwa bei der Hälfte der L-Proteine die PräS-Region posttranslational in das Lumen befördert, was dann zu einer dualen Ausrichtung der PräS-Region führt (Prange *et al.*, 1995). Da in diesem Kompartiment keine N-Glykosidasen aktiv sind, wird die PräS-Region im Anschluß an die posttranslationalen Translokation nicht mehr modifiziert. Nach Sprossung des fertigen Virus liegen die luminal ausgerichteten L-Proteine (e-PräS) auf dessen Außenseite und die zytosolisch ausgerichteten L-Proteine (i-PräS) im Inneren des Virus (Abb. 5 C (2)).

Die duale Topologie des L-Proteins erlaubt es dem Virus, dieses für viele Funktionen zu nutzen, sodaß das L-Protein eine Schlüsselrolle im Infektionszyklus von HBV spielt. In der e-PräS-Form vermittelt das L-Protein mit seiner PräS1-Domäne die Bindung und Aufnahme in die Leberzelle (Neurath *et al.*, 1986; Neurath *et al.*, 1992). Als Bestandteil der viralen Hülle ist es essentiell für die Verpackung des Nukleokapsids. Mit seiner zytosolisch ausgerichteten PräS-Domäne (i-PräS) vermittelt das L-Protein mit Sequenzen seiner PräS1- und S-Domäne die Bindung an Kapside, sodaß diese in die Virushülle eingeschlossen werden können (Ueda *et al.*, 1991; Bruss, 1997; Le Seyec *et al.*, 1999; Löffler-Mary *et al.*, 2000). Eine weitere Funktion von i-PräS ist eine

transkriptionelle Transaktivierung durch zelluläre Transkriptionsfaktoren. Initiiert durch die PräS2-Region des L-Proteins werden dabei durch Signaltransduktion über eine Ras-Raf-MAP-Kinase-Kaskade Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B aktiviert (Hildt *et al.*, 1996; Rothmann *et al.*, 1998).

Die duale Topologie des L-Proteins ist ein wichtiges strukturelles Merkmal der Hepadnaviren. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, daß sie sowohl bei HBV als auch bei dem phylogenetisch weniger verwandten DHBV konserviert ist. Der Mechanismus der posttranslationalen Translokation ist bei HBV bisher nicht erforscht. Beim Enten-Modell-System gibt es Hinweise, daß durch die Oligomerisierung der Transmembrandomänen der S-Region von L-Proteinen eine Pore entsteht, die die Durchquerung der PräS-Region durch die Membran erlauben könnte (Guo *et al.*, 1997; Grgacic *et al.*, 2000).

Die posttranslationale Translokation und die damit verbundene duale Topologie ist eine intrinsische Fähigkeit des L-Proteins (Prange *et al.*, 1995; Swameye *et al.*, 1997). Das Potential, eine kotranslationale Translokation der PräS-Region zu verhindern, hängt von einer C-terminalen Sequenz in der PräS1-Region ab, denn eine Deletion der AS 70-107 führt zu einer einheitlichen luminalen Topologie (Prange *et al.*, 1995). Die verantwortliche Region, auch zytosolische Verankerungsdomäne (CAD) genannt, konnte weiter auf die AS-Sequenz 70-94 eingegrenzt werden (Löffler-Mary *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigten *In Vitro*-Bindungsstudien eine spezifische Bindung zwischen CAD und dem zytosolischen Hitzeschockprotein Hsc70. Es wird vermutet, daß das Chaperon Hsc70 aufgrund seiner Fähigkeit bei der Faltung und Entfaltung von anderen Proteinen zu assistieren, die kotranslationale Translokation durch Bindung an die PräS1-Domäne verhindert, diese Region in einem ungefalteten Zustand fixiert und anschließend eine zeitverzögerte posttranslationale Translokation ermöglicht (Prange *et al.*, 1999).

Bei der Synthese des L-Proteins wird am Glycin-2 der PräS1-Region eine Myristinsäure gebunden. Wird die Bindungsstelle deletiert, verlieren die Virionen ihre Infektiosität (Macrae *et al.*, 1991; Gripon *et al.*, 1995; Bruss *et al.*, 1996). Da dies sowohl bei HBV als auch DHBV konserviert ist, wird vermutet, daß die Fettsäure eine indirekte Virus-Adhäsion und -Penetration vermittelt, die von der eigentlichen Rezeptorbindung unabhängig ist.

1.2 Zielsetzung

Die Hülle von HBV besteht aus drei verwandten viralen Proteinen. Besondere Bedeutung bei der Virusvermehrung kommt dem L-Hüllprotein zu. Im Gegensatz zu typischen Membranproteinen wird es posttranslational in die ER-Membran der Hepatozyten reorientiert und zeigt eine duale Topologie, die bei der Morphogenese von HBV und im Infektionszyklus eine wichtige Rolle spielt. Das L-Protein ist einerseits für die Bildung infektiöser Viren, andererseits aber auch für die Aufnahme in die Leberzelle

essentiell. Es ist anzunehmen, daß das L-Protein für die Ausbildung der speziellen Topologie als auch zur Erfüllung seiner verschiedenen Aufgaben mit zahlreichen zellulären Proteinen interagieren muß. Von diesen wirtsspezifischen Proteinen sind trotz langjähriger Untersuchung nur sehr wenige bekannt, z.B. Hsc70, daß in die posttranslationale Translokation involviert ist. So stehen bis heute die Charakterisierung des oder der Rezeptoren, die Mechanismen der Retention von L-Proteinen in der Zelle und die Aufklärung des Weges aus, den das Virus in die Zelle nimmt.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, das Hefe-Zwei-Hybrid-System zu etablieren, mit dessen Hilfe Proteine aus einer Leberzell-cDNA-Bank selektioniert werden sollten, die spezifisch mit der PräS1-Region des L-Proteins interagieren. Nach Identifizierung positiver Klone sollten diese sequenziert und charakterisiert werden. Da das Y2H-System dafür bekannt ist, neben echten Interaktionspartnern auch falsch-positive Ergebnisse zu liefern, sollte die neu entdeckte Interaktion zwischen dem L-Protein und den zellulären Proteinen in weiteren unabhängigen Testsystemen verifiziert werden. Nach Klonierung der Sequenz in geeignete Vektoren sollten diese Proteine in Prokaryonten oder Säugerezelllinien exprimiert und mit Hilfe von Immunpräzipitation oder *In Vitro*-Bindungstests sollte die spezifische Interaktion mit dem L-Protein bzw. der PräS1-Domäne nachgewiesen werden. Konnte auch hier eine spezifische Interaktion beobachtet werden, sollten die Bindungsstellen der beteiligten Proteine näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchungen immer der HBV-Subtyp *ayw* verwendet. Die Numerierung folgt dabei der Bezifferung, die von Galibert *et al.* (1979) beschrieben wurde und bei der die singuläre EcoRI-Schnittstelle des HBV-Genoms als Nullpunkt festgelegt wurde.

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Reagenzien der folgenden Firmen wurden benutzt: Aldrich (Steinheim), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), BioRad (München), Boehringer Mannheim (Mannheim), Clontech (Heidelberg) Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL/Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

Feinchemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Gibco BRL/Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Puffer und Medien

Puffer und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Maniatis *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1994) hergestellt. Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden bei Gibco BRL/Life Technologies (Eggenstein) bezogen.

2.1.3 Zelllinien

2.1.3.1 Prokaryonten

<i>E. coli</i>	DH5	ATCC 53868
<i>E. coli</i>	M15(pREP4)	(Qiagen)
<i>E. coli</i>	HB101	ATCC 33694
<i>E. coli</i>	BNN132	ATCC 47078

2.1.3.2 Eukaryonten

Hefezellen:

<i>S. cerevisiae</i>	Y190	(Flick <i>et al.</i> , 1990)
----------------------	------	------------------------------

Säugerzellen:

COS-7	(grüne Meerkatze, Nierenzelltumor)	ATCC CRL-1651
HepG2	(humane Hepatomzellen)	ATCC HB-8065

2.1.3.3 Antikörper

Tab. 1: Aufstellung der verwendeten Antikörper (Ak)

K37	polyklonales Kaninchenantiserum gegen HBsAg-Partikel
K47	polyklonales Kaninchenantiserum gegen die PräS1-Region von L
H166	monoklonaler Maus-Ak gegen S (Abbott)
MA 18/7	monoklonaler Maus-Ak gegen PräS1 (Gabe des Labors W. H. Gerlich, Gießen)
Auszyme-S-AK	monoklonaler Maus-Ak gegen S gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Abbott)
mAK IgG	Monoklonaler Anti-Maus-IgG-Ak gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Bio-Rad)
-HA-Ak	monoklonaler Maus-Ak gegen das Hämagglutinin-Epitop (BabCO)
-H4-Ak	polyklonales Kaninchenantiserum gegen GST.H4 ₇₁₅₋₉₂₉
- 2-Adaptin-Ak	polyklonales Kaninchenantiserum gegen den C-Terminus von 2-Adaptin (AS 803-822)
-C1r-Ak	monoklonaler Maus-Ak gegen die B-Kette von C1r (Gabe des Labors von M. Loos, Mainz)
mAk IgG DTAF	monoklonaler Anti-Maus-IgG-Ak aus Ziege gekoppelt mit DTAF (Dianova)
mAk IgG RRX	monoklonaler Anti-Kaninchen-IgG-Ak aus Ziege gekoppelt mit Rhodamin Red-Ex (RRX) (Dianova)

2.1.4 Plasmide

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die in Tab. 1 - Tab. 5 aufgeführten Plasmide verwendet. Plasmide, die für diese Arbeit erstellt wurden, sind dort mit (*) gekennzeichnet. Unter der Bezeichnung eines Plasmids ist in Klammern der Name des Proteins angegeben, das exprimiert wird.

Tab. 2: Expressionsvektoren für *E. coli*

Plasmid	Beschreibung
pGEX.3x-C1r ₅₆₀₋₇₀₅ (GST.C1r ₅₆₀₋₇₀₅)*	C-Terminus von C1r, kloniert in die BamH1-Schnittstelle von pGEX-3x, entnommen als BglII-Fragment aus pACT2/G3 (entspricht pACT2.C1r ₅₆₀₋₇₀₅).
pGEX.3x-H4 ₇₁₅₋₉₂₉ (GST.H4 ₇₁₅₋₉₂₉)*	C-Terminus der H4-Kette der Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Familie (ITI _H), kloniert in die BamH1-Schnittstelle von pGEX-3x, entnommen als BglII-Fragment aus pACT2/T4 (entspricht pACT2.H ₇₁₅₋₉₂₉).
pGEX-3x (GST)	Expressionsvektor für Prokaryonten (Pharmacia) (GenBank Acc.Nr.: U13852); die Fusionsproteine tragen für die Reinigung N-terminal vor dem Polylinker eine Sequenz, die für den C-Terminus der Glutathion-S-Transferase des Helminthen <i>Schistosoma japonicum</i> kodiert
pQE11.H ₇₁₅₋₉₂₉ ([His] ₆ -H ₇₁₅₋₉₂₉)*	C-Terminus der H4-Kette der Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Familie (ITI _H), kloniert in die BamH1-Schnittstelle von pQE11, entnommen als BglII-Fragment aus pACT2/T4 (entspricht pACT2.H ₇₁₅₋₉₂₉).
pQE11.L ₁₋₁₀₈ ([His] ₆ -L ₁₋₁₀₈)*	PräS1-Region von L [BglII-EcoRI-Fragment Nukleotid (Nt) 2839-3182 des L-Gens], kloniert in die BamH1/EcoRI-Schnittstellen von pQE11.
pQE11-E7 ([His] ₆ -Kontrolle)	E7-Gen des Humanen Papilloma-Virus Typ 33 (HPV33), kloniert in den Polylinker von pQE11.
pQE60-C1r ₄₆₄₋₇₀₅ C1r ₄₆₄₋₇₀₅ -L1 ₁₋₇ [His] ₆ (*)	An die B-Kette von C1r (AS 464-705) wurde durch PCR-Mutagenese das L1 ₁₋₇ -Epitop (HPV33) angefügt, über BamH1/BglII in den Polylinker von pQE60 kloniert; mit C-terminalem Polyhistidinschwanz; C1r-Sequenz entnommen aus pUC-C1r (Journet <i>et al.</i> , 1986).
pQE9, pQE10, pQE11, pQE60	Expressionsvektoren für Prokaryonten (Qiagen); die Fusionsproteine tragen eine 6×His-Sequenz für die Reinigung N-terminal vor dem Polylinker (pQE9, pQE10, pQE11) bzw. C-terminal nach dem Polylinker (pQE60).

Die Expression der Fusionsproteine unterliegt sowohl bei pQE als auch bei pGEX-3x dem hybriden bakteriellen Tac-Promotor und sie ist durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induzierbar.

Tab. 3: *In Vitro*-Expressionsvektoren

Plasmid	Beschreibung
pSP64	<i>In Vitro</i> -Expressionsvektor des "SP6-Coupled Reticulocyte Lysate System" (Promega); die Gene werden unter Kontrolle des SP6-RNA-Polymerase-Promotors exprimiert.
pSP64.H4 ₇₁₅₋₉₂₉ (H4 ₇₁₅₋₉₂₉) ^(*)	C-Terminus der H4-Kette der Inter- -Trypsin-Inhibitor-Familie (ITIH), kloniert in die HindIII/PstI-Schnittstelle von pSP64, entnommen als SalI/PstI-Fragment aus pGEX.3x-H4 ₇₁₅₋₉₂₉ .
pSP64.L(M'S) (L)	L-Gen unter Kontrolle des SP6-RNA-Polymerase-Promotors in pSP64; die internen Transkriptionsstartpunkte des M- und S-Proteins sind bei diesem Konstrukt deletiert.

Tab. 4: Expressionsvektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H-System)

Plasmid	Beschreibung
pACT2	Expressionsvektor des Y2H-Systems mit GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ , DNA-AD und LEU2 (Clontech) (Abb. 9) (GenBank Acc.Nr.: U29899).
pACT2/cDNA (AD.cDNA)	Etwa 1,3 kb-große cDNA-Fragmente einer humanen Leberzellgenbank, kloniert in die XhoI/EcoRI-Schnittstellen von pACT2 (Clontech).
pAS2-1	Expressionsvektor des Y2H-Systems mit GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ , DNA-BD und TRP1 (Clontech) (Abb. 8) (GenBank Acc.Nr.: U30497).
pAS2-1/L ₁₋₁₀₈ (BD.L1-108) ^(*)	PräS1-Region von L (AS 1-108) (BglIII-EcoRI-Fragment Nt 2839–3182 des L-Gens), kloniert in die SmaI-Schnittstelle von pAS2-1.
pAS2-1/L _{1-44,70-108} (BD.L1-44,70-108) (*)	PräS1-Region von L mit interner Deletion (AS 45-69 fehlen), entnommen aus einem pNI2.L-Konstrukt (Löffler-Mary <i>et al.</i> , 1997), kloniert in die SmaI-Schnittstelle von pAS2-1.
pAS2-1/L ₁₋₆₂ (BD.L1-62) ^(*)	PräS1-Region von L (AS 1-62) (BglIII-StuI-Fragment Nt 2839-3034 des L-Gens), kloniert in die SmaI-Schnittstelle von pAS2-1.
pAS2-1/L _{1-62,95-108} (BD.L1-62,95-108) (*)	PräS1-Region von L mit interner Deletion (AS 63-94 fehlen), entnommen aus einem vorhandenen pNI2.L-Konstrukt (Löffler-Mary <i>et al.</i> , 1997), kloniert in die SmaI-Schnittstelle von pAS2-1.
pAS2-1/L ₁₋₇₀ (BD.L1-70) ^(*)	PräS1-Region von L (AS 1-70) (BglIII-Bsu36I-Fragment Nt 2839-3052 des L-Gens), kloniert in die SmaI-Schnittstelle von pAS2-1.
pAS2-1/L ₄₄₋₁₀₈ (BD.L44-108) ^(*)	PräS1-Region von L (AS 44-108) (AhaII-EcoRI-Fragment Nt 2977-3182 des L-Gens), kloniert in die SmaI-Schnittstelle von pAS2-1.
pCL1	Expressionsvektor des Y2H-Systems mit Wildtyp GAL4-Gen (Clontech).
pGBT9	Expressionsvektor des Y2H-Systems mit GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ , DNA-BD und TRP1 (Clontech) (GenBank Acc.Nr.: U07646).

Plasmid	Beschreibung
pLAM5 ⁻ -1	Expressionsvektor des Y2H-Systems mit humanem LaminC in pAS2-1 (Clontech).
pTD1-1	Expressionsvektor des Y2H-Systems mit SV40-T-Antigen in pACT2 (Clontech).
pVA3-1	Expressionsvektor des Y2H-Systems mit murinem p53 in pGBT9 (Clontech).

Alle Vektoren des Y2H-Systems sind sog. „Shuttle“-Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* autonom replizieren. Sie tragen alle das *bla*-Gen, das in *E. coli* eine Ampicillinresistenz verleiht und eines von verschiedenen AS-Synthese-Genen, die auxotrophe Hefen befähigen, auf Selektionsmedien zu wachsen (TRP2 in pAS2-1; LEU2 in pACT2).

Tab. 5: Expressionsvektoren für Eukaryonten

Plasmid	Beschreibung
pcDNA3	Expressionsvektor für Eukaryonten, mit Cytomegalovirus-(CMV)-Promotor (Invitrogen).
PcDNA3-HA. 1 (1)	1-Adaptin mit N-terminaler HA-Sequenz in pcDNA3 (Takatsu <i>et al.</i> , 1998); Gabe aus dem Labor von K. Nakayama, Japan.
pcDNA3-HA. 2 (2)	2-Adaptin mit N-terminaler HA-Sequenz in pcDNA3 (Takatsu <i>et al.</i> , 1998), Gabe aus dem Labor von K. Nakayama, Japan.
pcDNA3-HA. 2 528-785 (2 528-785) ^(*)	pcDNA3-HA. 2 mit verkürztem 2-Adaptin (XhoI-ApaI-Fragment Nt 1613-2455 von 2-Adaptin deletiert; Numerierung nach GenBank Acc. Nr. AB05318).
pcDNA3-HA. 2 627-785 (2 627-785) ^(*)	pcDNA3-HA. 2 mit verkürztem 2-Adaptin (XhoI-BglIII-Fragment Nt 1926-2455 von 2-Adaptin deletiert; Numerierung nach GenBank Acc. Nr. AB05318).
pcDNA3.1	Expressionsvektor für eukaryontische Zellen, entspricht pcDNA3, besitzt aber einen modifiziertem Polylinker (Invitrogen).
pcDNA3.1-H4-HA (H4) ^(*)	Die H4-Kette von ITIH in pcDNA3.1 wurde über die EcoRI-Schnittstelle eingefügt und C-terminal mit einem HA-Epitop versehen. Sie wurde aus pBluescriptII-KS.PK120 entnommen (Nishimura <i>et al.</i> , 1995), Gabe aus dem Labor von S. Nagasawa, Japan.
pNI2	Expressionsvektor mit humanem MetallothioninIIa-(hMT)-Promotor und SV40-Promotor-Sequenz zur Amplifizierung des Plasmids in COS-7-Zellen (Israel <i>et al.</i> , 1989).

Plasmid	Beschreibung
pNI2.S _{HA} (S)	S-Gen unter Kontrolle des hMT-Promotors in pNI2 (Prange <i>et al.</i> , 1995); das Influenzavirus Hämagglutinin-(HA)-Epitop (YPYDVPD YASL) wurde durch gezielte Mutagenese unter Verwendung des M13mp19.HBV-Bakteriophagen (Löffler-Mary <i>et al.</i> , 1997) und dem Antisense-Nukleotid HA 5'-G TTT TGT TAG GGT TTA <u>CAA GCT AGC GTA ATC GGT AAC ATC GTA TGG GTA</u> AAT GTA TAC CCA AAG-3' (die HA-spezifische Sequenz ist unterstrichen) direkt mit dem C-Terminus des S-Gens fusioniert.
pNI2.L _{HA} (L)	L-Gen unter Kontrolle des hMT-Promotors in pNI2 (Prange <i>et al.</i> , 1995); das HA-Epitop wurde mit dem C-Terminus des L-Gens fusioniert.
pNI2.L::Ile-9 (L::Ile-9)	L-Gen unter Kontrolle des hMT-Promotors in pNI2 (Prange <i>et al.</i> , 1995), fusioniert mit einem 18 AS-langen Signalpeptid des humanen Interleukin-9 am N-Terminus von L; die Konstruktion erfolgte mittels PCR-Mutagenese und dem Primer 5'-AC AAG ATC TAC AGC <u>ATG CTT CTG GCC ATG GTC CTT ACC TCT GCC CTG CTC CTG TGC TCC GTG GCA GGC</u> GGG CAG AAT CTT TCC-3' (die Ile-9-spezifische Sequenz ist unterstrichen).

Die Plasmide pNI2.S, pNI2.L sind gängige Vektoren in unserem Labor und wurden an anderer Stelle genau beschrieben (Israel *et al.*, 1989; Prange *et al.*, 1991; Prange *et al.*, 1995; Löffler-Mary *et al.*, 1997). Die Gene der HBV-Hüllproteine sind hinter den hMT-Promotor geschaltet und tragen jeweils das HBV-spezifische Polyadenylierungssignal in der 3'-nichtkodierenden Region.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekulargenetische Methoden

Die grundlegenden molekulargenetischen und -biologischen Methoden wurden anlehnend an die ausführlichen Protokolle von Maniatis *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1994) durchgeführt.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Darstellung von Proteinen durch SDS-PAGE

Die eindimensionale, elektrophoretische Auftrennung der Proteine in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) erfolgte durch eine diskontinuierliche Elektrophorese (Laemmli, 1970). Die aufgetragene Proteinprobe wurde zunächst in einem Sammelgel fokussiert und wanderte von dort umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht (MW) in das Trenngel ein. Dabei wurden, je nach zu detektierender Proteingröße 10%,

12,5% oder 15%ige Polyacrylamid-Trenngele mit 5%igem Sammelgel verwendet (SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, SDS-PAGE). Der Auftrag der Proben erfolgte in Laemmli-Puffer (50 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerin, 5% Mercaptoethanol). Nach der Gel-Elektrophorese (Ausubel *et al.*, 1994) wurden die Proteinbanden unspezifisch oder spezifisch angefärbt (2.2.2.2).

2.2.2.2 Nachweisverfahren von Proteinen

2.2.2.2.1 Quantitative Bestimmung der Proteine nach Bradford

Die quantitative Bestimmung gelöster Proteine erfolgte nach Bradford (1976). Dabei wurde die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einem Referenzprotein (BSA Fraktion V, Roth; kalibriert nach Bradford) bestimmt.

2.2.2.2.2 Coomassie-Blau-Färbung

Die unspezifische Detektion von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte nach Wilson (1983) durch Coomassie-Blau-Färbung. Dabei werden Proteine durch eine Blaufärbung sichtbar. Das gefärbte Gel wurde anschließend gewässert und im Gelrockner getrocknet.

2.2.2.2.3 Ponceau S-Färbung

Mit der Ponceau S-Färbung (Salinovich *et al.*, 1986) wurden unspezifisch Proteine nachgewiesen, die durch Westerntransfer auf Nitrozellulosemembranen übertragen worden waren. Diese Färbung ist reversibel und stört dadurch die nachfolgenden immunchemischen Nachweise nicht. Sie dient als Kontrolle der Vollständigkeit des Proteintransfers und der Markierung der mitgeführten Referenz-Markerproteine.

2.2.2.2.4 Westerntransfer und Immunoblot

Bei der Methode des Westerntransfers wurden Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung in der SDS-PAGE (2.2.4.1) ebenfalls elektrophoretisch aus der Gelmatrix eluiert, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immobilisiert (Towbin *et al.*, 1979). Auf der Membran entstand ein identische Abbild des Proteinmusters. Unspezifische Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden durch Schütteln der Membran für 30 min in 5%iger Magermilchpulver (MMP) in PBS blockiert. Dann folgte die Inkubation der Membran mit primären Ak (1:1.000 bis 1:10.000 verdünnt) für 3 h oder über Nacht bei Raumtemperatur (RT). Zur Entfernung des überschüssigen Ak wurde die Membran mehrfach im Zeitraum von 60 min mit PBS unter Zusatz von 0,05% Tween-20 gewaschen.

2.2.2.2.5 Nachweis durch Chemilumineszenz

Der Nachweis des Ak/Protein-Komplexes erfolgte enzymatisch mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-IgG-Ak (Jackson Immuno Research Lab.)

und dem "ECL-Western-Blot-Detection-Kit" (Amersham). Bei der Methode des ECL (Enhanced Chemiluminescence) katalysiert die Meerrettich-Peroxidase (HRPO) mit Hilfe von H_2O_2 die Lichtemission von Luminol, die bei Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm-MP, Amersham) durch dessen Grau- bzw. Schwarzfärbung nachgewiesen werden kann.

2.2.2.2.6 Nachweis durch ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay")

Zum Nachweis von HBsAg wurde der "Auszyme Monoklonal HBsAG-ELISA" (Abbott) verwendet. Es wurde die Konzentration von HBsAg in einer Lösung dadurch bestimmt, daß HBsAg von -HBsAg-Ak gebunden wurde, die ihrerseits an einen festen Träger gekoppelt waren. Zu dem Ansatz wurde ein monoklonaler -HBsAg-Ak, der mit Merrettich-Peroxidase gekoppelt war, gegeben und 3 h inkubiert. Durch Waschen wurde überschüssiger Ak entfernt. Die Konzentration des gebundenen antigen-spezifischen Ak konnte dann mit Hilfe der HRPO-katalysierten Farbreaktion von OPD (Ortho-Phenyldiamindihydrochlorid)/ H_2O_2 als Substrat photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm quantifiziert werden.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde nach Ausubel *et al.* (1994) bei 37°C in LB-Flüssigmedium geschüttelt oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Verwendung spezifischer Zusätze (z.B. Ampicillin oder Kanamycin) richtete sich nach den Resistenzgenen, die auf den eingeschleusten Plasmiden vorhanden waren.

Zur Kryokonservierung wurde *E. coli* in der exponentiellen Wachstumsphase 1:2 mit sterilem Glycerin gemischt und in einem Kryoröhrchen bei -70°C gelagert.

2.2.3.2 Expression von Proteinen in *E. coli* und deren Reinigung

Fusionsproteine mit einem Polyhistidinschwanz:

Zur Expression von Proteinen mit einem Polyhistidinschwanz in *E. coli* wurde das QIAexpress-System der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurde z.B. die DNA der L-Protein-spezifischen PräS1-Region von HBV in den pQE-Vektor kloniert. In dessen ORF befindet sich auch eine kodierende Region für 6 × Histidin, das dem Polylinker vorangestellt ist, in den die gewünschte DNA kloniert wird. Dem PräS1-Polypeptid wurde so am N-Terminus ein Histidinschwanz angefügt. Die Reinigung basiert auf der Bindung der Polyhistidine an Ni-NTA-Agarose und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

E. coli-Zellen (M15pRep4) wurden mit dem gewünschten Expressionsvektor transfiziert. Nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG wurden die Zellen durch Zentrifugieren pelletiert und mit Lysepuffer (SB-Puffer: 100 mM NaPi, 10 mM Tris

pH 8,0), unter Zusatz von 0,5% Triton X-100 mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Branson) lysiert. Zur Reinigung wurde das Lysat zentrifugiert und der Überstand mit Ni²⁺-Nitrilotriacetic-Acid-Agarose (Ni-NTA) in SB-Puffer mit 10 mM Imidazol bei 4°C für 2 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose viermal mit SB-Puffer mit 20 mM Imidazol und dreimal mit PBS gewaschen. Die Aufbewahrung der immobilisierten [His]₆-Proteine erfolgte in PBS mit 0,005% Thimerosal bei 4°C. Die Überprüfung der Reinigung fand durch SDS-PAGE (2.2.2.1) mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung (2.2.2.2) statt.

GST-Fusionsproteine:

Eine weitere Möglichkeit, Fusionsproteine in *E. coli* zu exprimieren und durch Affinitätschromatographie effizient zu reinigen, ist das Glutathion-S-Transferase-(GST)-System. Als Expressionsvektor wurde pGEX-3x (Pharmacia) benutzt, der für den C-Terminus der Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma japonicum* kodiert. Die Expression der Fusionsproteine unterliegt hierbei dem hybriden bakteriellen Tac-Promotor und ist durch IPTG induzierbar. In Anlehnung an das von Smith *et al.* (1988) beschriebene Protokoll wurden rekombinante *E.coli*-Zellen in Gegenwart von IPTG kultiviert und mit Detergentien und Ultraschall lysiert. Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose-Säulen (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde nach Ausubel *et al.* (1994) je nach Bedarf in YPD-Flüssigmedium oder in "Synthetic-Dropout"-(SD)-Selektionsmedium bei 30°C geschüttelt. Zur Anzucht von Kolonien wurden YPD- oder SD-Agarplatten verwendet.

Zur Kryokonservierung wurde *S. cerevisiae* in der exponentiellen Wachstumsphase 1:1 mit sterilem Glycerin gemischt und in Kryoröhrchen bei -70°C gelagert.

2.2.3.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Plasmid-DNA wurde mit der Lithium-Acetat-Methode nach Ausubel *et al.* (1994) in die Hefezellen eingebracht und die Transformation durch Ausstreichen der Kolonien auf Selektionsplatten kontrolliert.

2.2.3.5 Expression von Proteinen in *S. cerevisiae*

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden 5 ml Flüssigkulturmedium mit einer Kolonie (ca. 1-2 mm Durchmesser, nicht älter als 4 Tage) inokuliert und bei 200 U/min bei 30°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit 45 ml Medium verdünnt und weiter geschüttelt bis ein OD₆₀₀ von 0,3-0,4 erreicht war. Die Flüssigkultur wurde direkt unter Zugabe von Eis gekühlt und bei 1500 U/min bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit eiskaltem Wasser gewaschen und dann bei

-70°C aufbewahrt. Alternativ wurden hieraus direkt komplette Proteinextrakte mit der TCA-Methode (2.2.3.6) präpariert.

2.2.3.6 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Die pelletierten Hefezellen (2.2.3.5) wurden in gleichem Volumen TCA-Puffer [20 mM Tris pH 8,0, 50 mM Ammoniumacetat, 2 mM EDTA und Protease-Inhibitoren wie Antipain (1,5 µg/ml), Pepstatin (2 µg/ml), Chymostatin (3 µg/ml) und Aprotinin (10 µg/ml)] sowie 20% TCA-Lösung resuspendiert. Dieser Mischung wurden Glasperlen (425-600 µm Durchmesser) zugegeben und auf dem Vortex mit höchster Stufe zehnmal 30 sek gemischt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Mischung immer wieder auf Eis gekühlt. Nach Absetzen der Glasperlen wurde der Überstand abgenommen, die Perlen mit einer 1:1-Mischung aus TCA-Puffer und 20% TCA versetzt und erneut auf dem Vortex fünfmal 30 sek geschüttelt. Beide Überstände wurden vereinigt und bei 13.000 U/min bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Laemmli-Puffer aufgenommen, gekocht und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3.7 Kultivierung von Säugerzellen

Zellen der COS-7-Zelllinie wurden als adhärente Zellen in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) unter Zugabe von 10% fötalem Rinderserum (FCS), 0,012% Penicillin und 0,02% Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die konfluenten Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und für eine Minute mit 2,5 mM EDTA inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen weitere 5 bis 10 min in der verbleibenden Flüssigkeit inkubiert. Anschließend wurden sie mit DMEM abgelöst und für eine weitere Passage in gewünschter Verdünnung kultiviert.

Zur Kryokonservierung wurde der konfluente Zellrasen wie bei der Passage behandelt und in DMEM auf eine Konzentration von 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit 10% DMSO versetzt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß bei -70°C für mindestens 4 h gelagert, bevor die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.3.8 Transfektion von Säugerzellen

COS-7-Zellen wurden durch Elektroporation mit DNA transfiziert (Neumann *et al.*, 1982). Diese physikalische Methode des DNA-Transfers gewährleistet eine hohe Transfektionseffizienz. Die Durchführung erfolgte mit dem "Cellporator" (Gibco BRL/Life Technologies) nach Herstellerangaben unter Verwendung von 5 × 10⁶ Zellen und 12 µg DNA pro Plasmid für eine Zellkulturschale mit 15 cm Durchmesser.

2.2.3.9 Zellyse mit CHAPS-Puffer

Zum Nachweis möglicher Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden transfizierte COS-7-Zellen drei Tage nach Transfektion zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und 30 min auf Eis mit 2% CHAPS {3[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propansulfat}-HBS (50 mM Hepes pH 7,5, 200 mM NaCl) unter Zusatz von Protease-Inhibitoren wie Antipain (1,5 µg/ml), Pepstatin (2 µg/ml), Chymostatin (3 µg/ml) und Aprotinin (10 µg/ml) lysiert. Das Zellysat wurde mit einem Gummiwischer von der Petrischale abgewischt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 U/min bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Für anschließende Versuche wurde das klare Lysat des Überstands verwendet. Die Überprüfung der Proteinexpression erfolgte mit SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot. Hierzu wurden 50 µl Zellysat (entspricht 1/20 Zellysat) aufgetragen. Parallel wurde zum Nachweis der HBV-Hüllproteine 50 µl Zellysat im HBsAg-ELISA verwendet (2.2.2.2.6).

2.2.3.10 Radiomarkierung von Säugerzellen und Immunpräzipitation

Die Markierung von Proteinen durch Einbau radioaktiver AS während der Synthese stellt eine sehr empfindliche Methode dar, um Proteine nachzuweisen. Das Protein von Interesse kann dann durch Fällung mit spezifischem Ak aus dem Gemisch radioaktiv markierter Proteine isoliert werden.

Radiomarkierung

Transfizierte COS-7-Zellen wurden am dritten Tag der transienten Expression markiert. Dazu wurden sie zunächst in 2 ml MEM (minimal essential medium) mit 1% FCS für 45 min bei 37°C inkubiert, um den intrazellulären Spiegel an Methionin abzubauen. Zur Markierung wurden die Zellen mit 150 µCi [³⁵S]-Methionin/Cystein (1175 Ci/mM; NEN DuPont) in 1 ml MEM für 3 h inkubiert. Danach wurde das Markierungsmedium gegen 2 ml DMEM ausgetauscht, in dem die Zellen für 20 h belassen wurden.

Zellyse mit RIPA-Puffer

Nach der Radiomarkierung von Zellen wurden die Zellkulturüberstände bei 7000 U/min und RT für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 1 ml RIPA-Puffer (50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mM EDTA) für 20 min auf Eis lysiert. Durch Zentrifugieren bei 10.000 U/min bei 4°C für 5 min wurden die Lysate anschließend geklärt.

Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden die gewünschten Mengen Zellysate und Zellkulturüberstände auf eine Endkonzentration von 1% Triton X-100, 0,05% Deoxycholsäure (DOC) und 0,01% SDS eingestellt und mit spezifischen Ak bei 4°C über Nacht im Rotator inkubiert. Die Isolierung der Immunkomplexe erfolgte mit 1% Protein-G-Sepharose (Virofem), mit der die Probe bei 4°C für 1 h unter Drehen inkubiert wurde.

Durch kurzes Zentrifugieren konnten die Protein-Ak-Sepharose-Komplexe sedimentiert werden. Die Reinigung erfolgte durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 0,5% Triton X-100, 0,1% SDS) und Äquilibration in 125 mM Tris pH 7,5. Die Immunkomplexe wurden nach Zugabe von 30 µl Laemmli-Puffer durch fünfminütiges Kochen denaturiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine zunächst durch ein 30-minütiges Bad in 7%iger Essigsäure in der Gelmatrix fixiert und dann 30 min mit Amplify (Amersham) behandelt, um die Emission der Isotope zu verstärken. Anschließend wurde das Gel im Vakuum getrocknet und autoradiographiert.

2.2.3.11 *In vitro*-Transkription/Translation/Translokation

Im "SP6-Coupled Reticulocyte Lysate System" (Promega) wurden Gene unter Kontrolle des Promotors der SP6-RNA-Polymerase exprimiert und ihre Produktion durch Markierung mit [³⁵S] nachgewiesen. Die Transkription und Translation erfolgte dabei in Reticulozytenlysat. Durch Zusatz von Mikrosomen aus Hundepankreas (Promega) konnten zusätzlich die Translokation von Proteinen über die ER Membran sowie kotranslationale Modifikationen in einem zellfreien System simuliert werden. Als Standard wurde in 25 µl Reaktionsvolumen 0,5 µg zirkuläre Plasmid-DNA in Anwesenheit von 20 µCi [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mM; Amersham) bei 30°C 90 min *in vitro* transkribiert und translatiert. Die Reinigung der Mikrosomen erfolgte durch Auftrag des Reaktionsgemischs auf 1 ml 250 mM Saccharose/TBS und anschließendem Zentrifugieren bei 14.000 U/min und 4°C für 30 min. Die Mikrosomen wurden in 100 µl NET-Puffer (0,25% Gelatine, 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 1 mM EDTA pH 7,5) resuspendiert.

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen *In vitro*-translatierten Proteinen wurde das Reaktionsgemisch bzw. die resuspendierten Mikrosomen mit NET-Puffer auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Die in NET-Puffer gelösten Proteine, deren Interaktion untersucht werden sollte, wurden gemischt und bei 4°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Ak-Sepharose-Lösung über Nacht immunpräzipitiert (2.2.3.10).

2.2.3.12 Enzymatische Deglykosylierung von Proteinen mit Peptid:N-glykosidase F

Die Peptid:N-glykosidase F (PNGase F) (New England Biolabs) ist eine Amidase des Bakteriums *Flavobacterium meningosepticum*, die N-glykosidisch gebundene Zuckerreste von Glykoproteinen abspaltet, indem sie die Bindung zwischen der Seitenkette des Asparaginrestes und dem N-Acetylglukosamin des Zuckerrestes hydrolysiert. PNGase F spaltet sämtliche N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide. Die

enzymatische Deglykosylierung erfolgte an immunpräzipitierten und immobilisierten Proteinen nach Angaben des Herstellers.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Immunisierung von Kaninchen

Zur Immunisierung wurden weibliche Kaninchen verwendet, denen die Antigenlösung intramuskulär in einen ihrer Hinterläufe appliziert wurde. Für die primäre Immunisierung wurde 450 µg lösliches Antigen (in 500 µl 0,9% NaCl-Lösung) verwendet, das in 500 µl kompletten Freundschens Adjuvans emulgiert worden war. Auffrischungsinjektionen erfolgten vier und acht Wochen nach der ersten Applikation des Antigens in einer Emulsion mit inkomplettem Freundschens Adjuvans mit der gleichen Menge Antigen.

2.2.4.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

COS-7-Zellen, die mit Hilfe der Elektroporation (2.2.3.8) transient transfiziert worden waren, wurden auf Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät und bei 37°C für 36 bis 48 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit eiskaltem Methanol mit 2 mM EGTA bei -20°C für 15 min fixiert. Das Methanol wurde durch gründliches Waschen mit PBS entfernt und unspezifische Bindungsstellen entweder mit 5% MMP in PBS oder 3% Ziegen-N-Normalserum in PBS blockiert. Der primäre Ak wurde in Verdünnungen von 1:10.000 (polyklonaler Ak) oder 1:50 (monoklonaler -HA-Ak) direkt auf das Deckglas getropft und dieses dann in einer feuchten Kammer bei RT für 45 min inkubiert. Anschließend wurde die Ak-Lösung durch mehrmaliges Waschen mit PBS während der nächsten 30 min entfernt. Bei Koimmunfluoreszenzen wurde dann der andere primäre Ak nach dem gleichen Verfahren gebunden. Zur Kopplung des oder der sekundären Ak wurden diese nach Herstellerangaben in PBS verdünnt und einzeln oder gemeinsam auf das Deckglas getropft. Bei Koimmunfluoreszenzen wurde der sekundäre -Maus-IgG-Ak aus Ziege, gekoppelt mit DTAF, in einer Verdünnung von 1:200 und der sekundäre -Kaninchen-IgG-Ak aus Ziege, gekoppelt mit RRX, in einer Verdünnung von 1:800 in PBS verwendet. Nach 45 min Inkubation bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln wurde der überschüssige Ak ebenfalls durch gründliches Waschen mit PBS entfernt. Als letztes wurde das Deckglas in Wasser getaucht um Salzkristallbildung beim Trocknen zu verhindern und vorsichtig an der Luft getrocknet. Nach dem Eindecken mit Histogel wurden die Zellen mit dem Immunfluoreszenzmikroskop (Leica DMRBE) untersucht.

2.2.5 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-(Y2H)-System (Abb. 6) basiert auf dem Befund, daß viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren aus zwei getrennten, funktionell unabhängigen Domänen bestehen. Das in dieser Arbeit eingesetzte Y2H-System verwendet den GAL4-Transkriptionsfaktor der Hefe *S. cerevisiae*, der aus einer DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und einer Transkriptionsaktivierungs-Domäne (AD) besteht. Die DNA-BD erkennt und bindet eine UAS-Sequenz (UAS: upstream activating sequence) in der strangaufwärts gelegenen Region von GAL4-regulierten Genen, während AD mit weiteren Faktoren der Transkriptionsmaschinerie interagiert. Diese leiten anschließend die Transkription der GAL4-regulierten Gene ein (Abb. 6 A). Werden diese beiden Domänen getrennt in einer Wirtszelle exprimiert, sind sie unfähig die Transkription der Gene, für deren Aktivierung sie verantwortlich sind, einzuleiten.

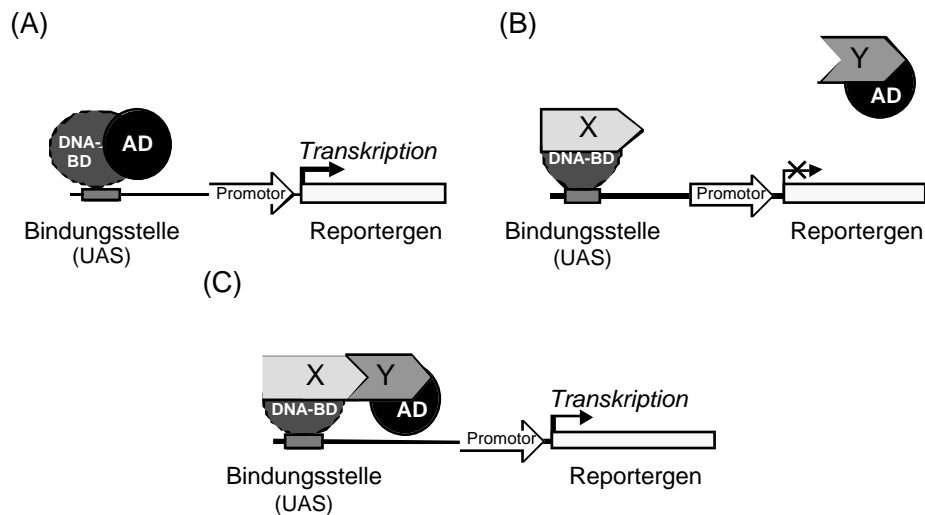


Abb. 6: **Prinzip des Y2H-Systems.** (A) Der Transkriptionsfaktor bindet mit seiner DNA-Bindungsstelle (DNA-BD) an die Bindungssequenz UAS, und die Aktivierungsdomäne (AD) aktiviert weitere Faktoren der Transkriptionsmaschinerie, die die Transkription einleiten. (B) Wenn Protein X nicht mit Protein Y interagiert, bindet zwar das DNA-BD.X-Protein (Fängerprotein) an die DNA-Bindungsstelle, kann aber in Abwesenheit des Fusionsproteins AD.Y die Transkription nicht initiieren, während die Interaktion zwischen X und Y *in vivo* die Transkription des Reportergens aktiviert (C).

Im Y2H-System werden zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen X und Y Expressionsvektoren für Fusionsproteine aus (1) DNA-BD mit X (DNA-BD.X) und aus (2) AD mit Y (AD.Y) konstruiert, die jeweils ein Kernlokalisierungssignal (NLS) tragen. Als Wirtszellen werden Histidin-auxotrophe Hefezellen verwendet, die zwei GAL4-regulierte Reportergene im Genom tragen. Das Reportergen LacZ kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, das Genprodukt des Reportergens HIS3 ist Teil des Histidin-Syntheseweges. Ohne Expression der Reportergene besitzen die Wirtszellen keine β -Galaktosidase-Aktivität und sind für Histidin auxotroph. Die Wirtszellen werden mit den zwei Expressionsvektoren transformiert und die rekombinanten Hybridproteine DNA-BD.X und AD.Y koexprimiert. Diese werden aufgrund ihres NLS zum Zellkern transportiert. Findet dort eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen X

und Y statt, gelangen DNA-BD und AD in räumliche Nähe und der GAL4-Transkriptionsfaktor wird funktionell rekonstituiert. DNA-BD bindet an UAS strangaufwärts des Reportergens (LacZ bzw. HIS3) und AD ermöglicht durch Interaktion mit weiteren Faktoren der Transkriptionsmaschinerie die Transkription der Reportergene (Abb. 6 C). Findet keine Interaktion zwischen den Proteinen X und Y statt, kann zwar das Fusionsprotein DNA-BD.X an UAS binden, die Transkription aber unterbleibt, da die Aktivierung durch AD.Y nicht stattfindet (Abb. 6 B). Eine Interaktion von X und Y kann durch den Nachweis der Reportergenprodukte in den Wirtszellen detektiert werden, indem die Hefezellen auf eine Histidin-Kompetenz untersucht werden bzw. ihre β -Galaktosidase-Aktivität durch einen geeigneten Test (2.2.5.4) nachgewiesen wird.

Das Y2H-System eignet sich ebenso für den Nachweis bisher unbekannter Interaktionspartner von einem Protein X. Es wird dann auch als Fängerprotein bezeichnet und dient als Köder auf der Suche nach Interaktionspartnern innerhalb der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, die durch eine cDNA-Bank repräsentiert wird, welche z.B. aus humanen Hepatozyten hergestellt wurde. Statt, wie oben beschrieben, nur ein Protein Y auf seine Wechselwirkung mit X zu untersuchen, wird die cDNA-Bank mit AD fusioniert (AD.cDNA) und mit DNA-BD.X koexprimiert. Anschließend werden die Hefezellen auf ihre HIS3-Reportergenexpression durch Anzucht auf His⁻-Selektionsmedium selektioniert. Dabei sind nur solche Wirtszellen lebensfähig, die AD.cDNA-Klone tragen, die mit DNA-BD.X interagieren. Diese Klone werden zusätzlich auf Expression des zweiten Reportergens, der β -Galaktosidase, untersucht. Die aus dem Y2H-Test resultierenden positiven Klone werden sequenziert und charakterisiert. Die Interaktion zwischen dem Fängerprotein und den neu identifizierten Proteinen muß dann in weiteren unabhängigen Tests verifiziert werden.

Das hier verwendete Y2H-System wurde von Clontech bezogen. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben. Die cDNA-Bank aus humanen Leberzellen stammte ebenfalls von Clontech. Als Wirtszellen wurden Y190-Hefezellen verwendet, die für Leucin, Tryptophan und Histidin auxotroph sind, sodaß nach einer Transformation Zellen, die das Plasmid trugen, durch ein entsprechendes Selektionsmedium identifiziert werden konnten. Der Ablauf eines Y2H-Tests ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

Zu Beginn des Y2H-Tests stand die Konstruktion des Fängerplasmids DNA-BD.X. unter Verwendung des Vektors pAS2-1 und der PräS1-Domäne des L-Proteins (2.2.5.1). Anschließend wurde die Expression der DNA-BD.X-Fusionsproteine untersucht. Dazu wurde das Fängerplasmid in Y190-Zellen transformiert und Kolonien mit Tryptophan-Kompetenz, die das Fängerplasmid vermittelt, selektioniert. Die β -Galaktosidase-Konzentration von transformierten- und Wildtyp-Y190-Zellen wurde vergleichend bestimmt (2.2.5.4), um eine mögliche autonome Reportergenexpression zu untersuchen. Diese sollte eigentlich nicht stattfinden, da das Fusionsprotein DNA-BD.X keine

Aktivierungsdomäne enthält. Allerdings besitzen einige Proteine die Fähigkeit, AD zu ersetzen und die Transkription der Reportergene zu aktivieren. Bei einer autonomen Reportergenexpression wurde bei DNA-BD.X die aktivierende Sequenz durch Deletion entfernt.

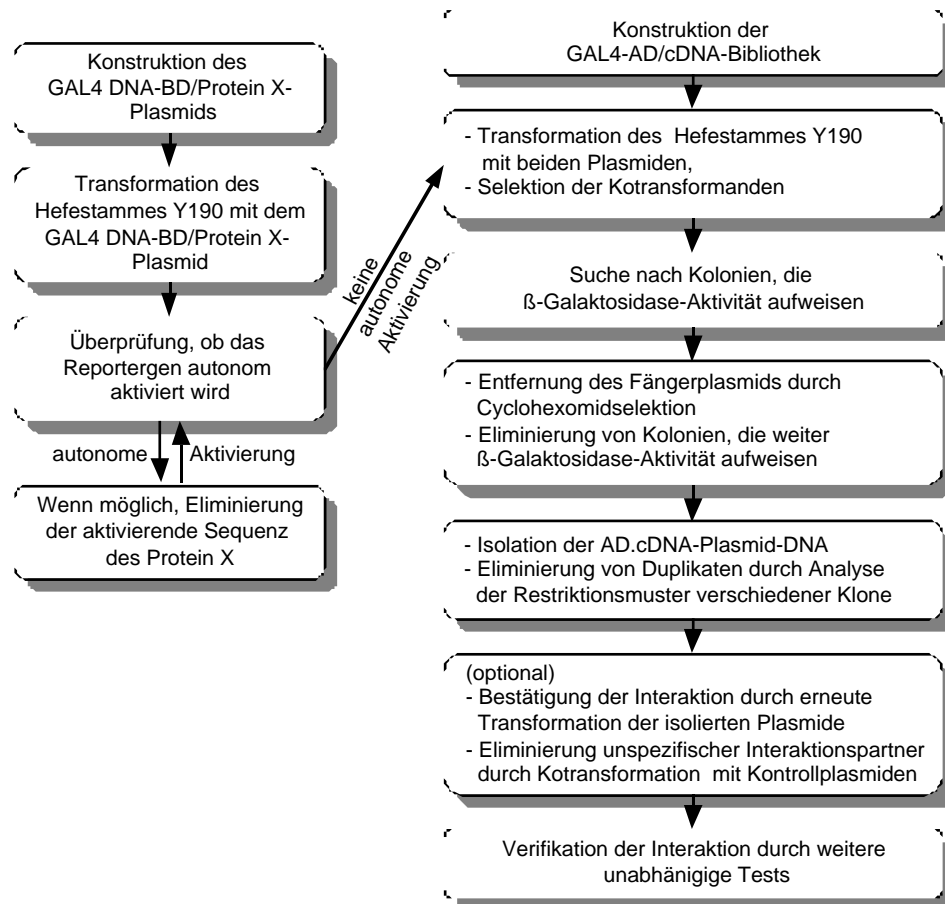


Abb. 7: Diagramm eines Y2H-Tests.

Da im Rahmen dieser Dissertation mit Hilfe des Y2H-Systems Interaktionspartner der PräS1-Domäne des L-Proteins identifiziert werden sollten, wurde eine AD.cDNA-Bank aus Hepatozyten verwendet, in der eine Leberzell-cDNA-Bank mit AD in pACT2 fusioniert worden war (2.2.5.2). Die erfolgreiche Transformation der Y190-Hefezellen mit AD.cDNA ließ sich kontrollieren, indem die damit vermittelte Leucin-Kompetenz der transformierten Zellen überprüft wurde.

War DNA-BD.X, wenn nötig, so weit modifiziert worden, daß keine autonome Aktivierung mehr vorlag, wurden Y190-Zellen mit DNA-BD.X und der AD.cDNA-Bank transformiert (2.2.3.4). Hefezellen, die auf Leu^- - Trp^- - His^- -SD-Medium Kolonien bildeten, wurden selektioniert, da sie (1) beide Plasmide trugen und (2) Reportergenaktivität des HIS3-Gens zeigten. Diese Kolonien wurden isoliert und auf ihre β -Galaktosidase-Konzentration, d.h. die Expression des zweiten Reportergens, untersucht (2.2.5.4). Aus positiven Kolonien, die sowohl eine Histidin-Kompetenz, als auch β -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen, wurde im Anschluß das Fängerplasmid entfernt. Dazu wurden die Zellen auf Leu^- -SD-Medium mit Cycloheximid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kultiviert.

Nur Zellen, die spontan das Fängerplasmid verloren haben, das auch das Gen für Cycloheximidsensitivität trägt, konnten sich vermehren. Diese Klone, die jetzt nur noch AD.cDNA tragen sollten, wurden wiederum auf ihre β -Galaktosidase-Konzentration untersucht und alle Klone verworfen, die eine β -Galaktosidase-Aktivität zeigten. Aus den verbleibenden Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (2.2.5.5), in *E. coli* transformiert (2.2.5.6) und amplifiziert. Diese DNA wurde nach Standardmethoden (Ausubel *et al.*, 1994) isoliert, gereinigt und einer Restriktionsanalyse (2.2.5.7) unterzogen, bei der die Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde und die Fragmente mittels Gel-Elektrophorese analysiert wurden. Klone, die ein ähnliches Restriktionsmuster aufwiesen, wurden als Duplikate identifiziert und nur ein Vertreter jeweils weiter untersucht. Die verbliebenen Klone wurden auf unspezifische Interaktion mit einem Kontrollprotein (murinem p53, das im Vektor pVA3-1 kodiert war) anstelle des Fängerproteins untersucht, indem sie mit den verschiedenen AD.cDNAs und pVA3-1 kotransformiert und auf ihre β -Galaktosidase-Konzentration untersucht wurden (2.2.5.8). Alle AD.cDNAs, die β -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen, wurden verworfen, da die Spezifität der Wechselwirkung zwischen Fängerprotein und dem cDNA-Klon nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Ebenso wurde durch einen β -Galaktosidase-Test überprüft, ob die aus der Hefe-Plasmid-DNA isolierten AD.cDNA-Klone weiterhin eine Interaktion mit DNA-BD.X aufwiesen, nachdem sie erneut zusammen mit dem Plasmid für das Fängerprotein in Y190-Zellen transformiert worden waren. Erfüllten die Klone alle Kriterien, wurden sie sequenziert und in weiteren unabhängigen Bindungsstudien untersucht.

2.2.5.1 Konstruktion der Plasmide, die das Fängerprotein exprimieren

Zur Konstruktion des Fusionsproteins DNA-BD.X wurde der Expressionsvektor pAS2-1 verwendet (Abb. 8). Er kann sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* autonom replizieren und trägt das *bla*-Gen, das in *E. coli* eine Ampicillinresistenz verleiht. Durch sein TRP1-Gen erlangen mit pAS2-1 transformierte Hefezellen die Fähigkeit auf Trp⁻ Selektionsmedium zu wachsen. Zur konstitutiven Expression der Hybridfusionsproteine DNA-BD.X auf einem hohen Niveau wird ein ADH1-Promotor verwendet. Die Transkription wird durch das ADH1-Transkriptions-Terminations-Signal beendet. Das Hybridprotein setzt sich aus GAL4 (AS1-147) mit einem intrinsischen NLS und dem Polylinker zusammen, in den die Sequenz von X eingefügt werden kann.

Im Y2H-System sollte das L-Protein von HBV als Fängerprotein eingesetzt werden. Dazu wurde die PräS1-Region des L-Gens in die SmaI-Schnittstelle von pAS2-1 kloniert (Abb. 8). Verschiedene Deletionsmutanten der PräS1-Domäne ($L_{AS\ 1-70}$, $L_{AS\ 44-108}$, $L_{AS\ 1-44,70-108}$, $L_{AS\ 1-62,95-108}$ und $L_{AS\ 1-62}$) wurden analog in pAS2-1 mit dem Ziel eingebaut, die vollständige bzw. mutierte PräS1-Region mit dem C-Terminus von DNA-BD zu fusionieren (Tab. 4, S. 17).

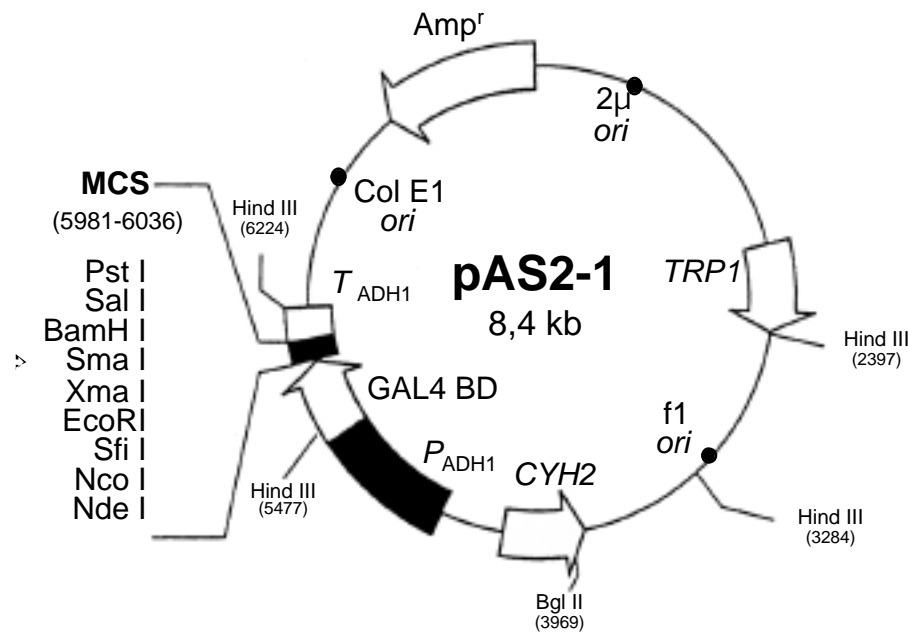


Abb. 8: **Schematische Darstellung des Vektors pAS2-1.** Expressionsvektor des Y2H-Systems, der die DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) trägt (P_{ADH1} : ADH1-Promotor; T_{ADH1} : ADH1-Transkriptions-Terminations-Signal; MCS: Polylinker; GAL4 BD₍₁₋₁₄₇₎: GAL4-Transkriptionsfaktor AS 1-147; TRP1: Gen für Tryptophan-Prototrophie; CYH2: Gen für Cycloheximidempfindlichkeit; Amp^r: Ampicillinresistenzgen; ori: Replikationsstartpunkt für *S. cerevisiae* [2 μ], *E. coli* [ColE1] und Einzelstrang-DNA [f1]). Die Schnittstelle SmaI, die für die Konstruktion der Fusionsproteine aus DNA-BD und der PräS1-Region des L-Proteins verwendet wurde, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

2.2.5.2 Die AD.cDNA-Bank

Als Quelle zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner der PräS1-Domäne diente eine cDNA-Bank aus humanen Leberzellen, die in die EcoRI/XhoI-Restriktionsschnittstelle des pACT2-Vektors kloniert wurde (Abb. 9). Die Fusionsproteine besitzen am N-Terminus das Kernlokalisierungssignal des SV40-T-Antigens, die Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors und C-terminal cDNAs der Genbank. Die Größe der eingefügten cDNAs betrug laut Herstellerangaben im Durchschnitt 1,3 kb, wobei die DNA-Längen zwischen 0,5 und 4,0 kb variierten. Die Anzahl der unabhängigen Klone war mit 3×10^6 Klonen angegeben.

Die Amplifizierung der AD.cDNA-Bank erfolgte nach Herstellerangaben (Clontech). Dabei wurden die Bakterien nach Bestimmung des Titers (Koloniezahl/ml) auf LB-Amp⁺-Agarplatten ausgestrichen, sodaß sie über Nacht bei Inkubation mit 37°C einen konfluenten Rasen bildeten (20.000 bis 50.000 Kolonien pro Petrischale mit ca. 150 mm). Es wurde die Anzahl an Kolonien amplifiziert, die dem zwei- bis dreifachen der Anzahl der unabhängigen Klone entsprach. Am nächsten Morgen wurden sie mit einem Gummiwischer mit LB-Amp⁺-Medium abgeschabt und anschließend in 3 L LB-Amp⁺-Medium unter Schütteln bei 37°C für 3 h inkubiert. Aus den Bakterien wurde dann die Plasmid-DNA nach der Lithium-Chlorid-DNA-Präparationsmethode und Polyethylenglykol-Fällung mit anschließender Reinigung durch eine Phenolextraktion hergestellt

(Ausubel *et al.*, 1994). Diese Vorgehensweise weist den Vorteil auf, daß schnell wachsende Klone schlechter wachsende Klone nicht so stark verdrängen, wie dies in einer reinen Flüssigkultur der Fall sein könnte. Sie gewährte die Erhaltung einer möglichst großen Zahl unabhängiger Klone der cDNA-Bank.

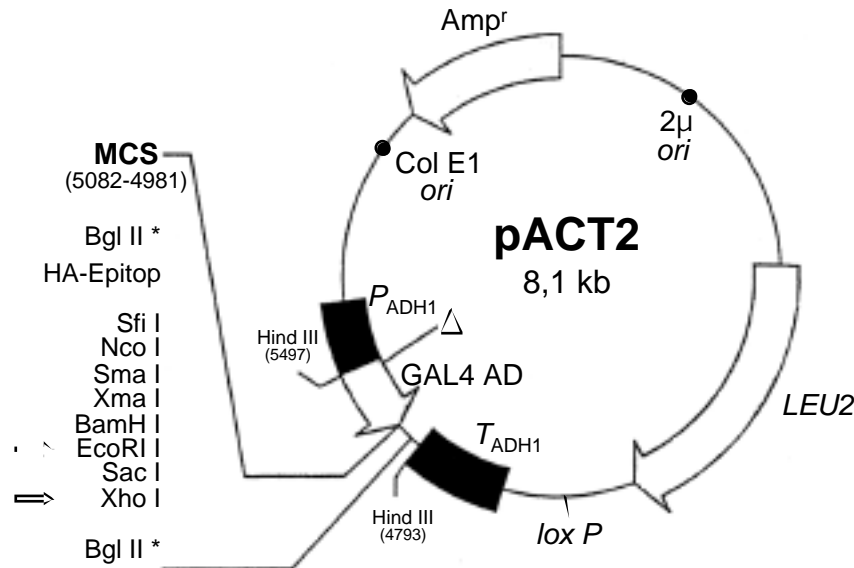


Abb. 9: **Schematische Darstellung des Vektors pACT2.** Expressionsvektor des Y2H-Systems, der die Transkriptionsaktivierungs-Domäne (AD) trägt (P_{ADH1} : ADH1-Promotor; T_{ADH1} : ADH1-Transkriptions-Terminations-Signal; MCS: Polylinker; GAL4 AD₍₇₆₈₋₈₈₁₎: GAL4-Transkriptionsfaktor AS 768-881; HA: Hämagglutinin-Epitop; : SV40-T-Antigen NLS; LEU2: Gen für Leucin-Prototrophie; Amp^r: Ampicillinresistenzgen; ori: Replikationsstartpunkt für *S. cerevisiae* [2 μ] und *E. coli* [ColE1]). Die Schnittstellen EcoRI/XhoI, die für die Konstruktion der Fusionsproteine aus AD und den cDNAs der humanen Hepatozyten-Genbank verwendet wurde, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

2.2.5.3 Transformation und Selektion positiver Klone

Der Hefestamm Y190 wurde nach der Lithium-Acetat-Methode (Ausubel *et al.*, 1994) mit dem Vektor, der das Fängerprotein exprimiert (z.B. pAS2-1/L1-70, der das Fängerprotein BD.L1-70 kodiert), transformiert. Durch Ausstreichen auf Trp⁻-Agarplatten wurden die Kolonien isoliert, die diesen Vektor trugen. Zur weiteren Überprüfung wurden Proteinextrakte aus diesen Kolonien hergestellt (2.2.3.6), in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und das Fängerprotein im Immunoblot mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen.

Die BD.L1-70⁺-Hefezellen wurden anschließend ebenfalls nach der Lithium-Acetat-Methode mit der AD.cDNA-Bank transformiert. Vor dem Ausplattieren der transformierten Zellen auf Leu⁻-Trp⁻-His⁻-Agarplatten wurden 100 μ l einer 1:1000, 1:100 und 1:10 Verdünnung auf Leu⁻-Trp⁻-Agarplatten zur Überprüfung der Transformationseffizienz ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 30°C über 3 Tage wurden Kolonien sichtbar, die beide Plasmide trugen. Diese wurden ausgezählt und die Anzahl der transformierten AD.cDNA-Klone pro μ g DNA nach folgender Formel berechnet.

$$\frac{\text{Kolonien} \times \text{Volumen transformierter Zellen (} \mu\text{l)}}{\text{ausplattiertes Volumen (} \mu\text{l)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{verwendete DNA (} \mu\text{g)}} \\ = \frac{\text{Anzahl der transformierten Klone}}{\mu\text{g DNA}}$$

Dieser Wert gab die erzielte Transformationseffizienz an. Durch Multiplikation mit der Menge der eingesetzten DNA konnte die Anzahl der unabhängigen Klone bestimmt werden, die in den einzelnen Y2H-Test untersucht worden waren. Dadurch ließ sich ermitteln, wie viele der unabhängigen Klone der cDNA-Bank auf eine Interaktion mit dem Fängerplasmid getestet worden waren.

Der Hauptteil der transformierten Hefezellen wurde auf Leu⁻-Trp⁻-His⁻-Agarplatten verteilt. Dadurch wurden Zellen selektioniert, die durch das Fängerprotein-Plasmid eine Tryptophan-Kompetenz, durch das Plasmid pACT2/cDNA eine Leucin-Kompetenz erworben hatten und durch die Interaktion der Genprodukte von pACT2/cDNA und pAS2-1/L1-70 eine Reporterexpression von HIS3 aufwiesen. Den Leu⁻-Trp⁻-His⁻-Agarplatten wurde noch zusätzlich 25 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) zugesetzt. Dies war notwendig, da in den verwendeten Y190-Zellen eine geringe natürliche Histidin-Kompetenz vorhanden war, die mit 3-AT unterdrückt werden mußte. Die Kolonien wurden erst nach 5-10 Tagen sichtbar, da die Zellen auf Leu⁻-Trp⁻-His⁻-Selektionsmedium unter Zusatz von 25 mM 3-AT etwas langsamer wachsen, als ohne 3-AT.

Als interne Y2H-System-Kontrollen wurden jeweils folgende Plasmide transformiert:

- 1) pCL1, das für den Wildtyp-GAL4-Transkriptionsfaktor kodiert, um die Reporterexpression in den Y190-Zellen zu überprüfen.
- 2) pTD1-1, das für das AD.SV40-T-Antigen kodiert, zusammen mit pVA3-1, das für DNA-BD.p53 kodiert. Da AD.SV40-T-Antigen und DNA-BD.p53 miteinander interagieren, konnte die funktionelle Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors durch eine Reporteraktivierung überprüft werden.
- 3) pTD1-1, das für das AD.SV40-T-Antigen kodiert, zusammen mit pLAM5'-1, das für DNA-BD.LaminC kodiert. Da das AD.SV40-T-Antigen und DNA-BD.LaminC nicht miteinander interagieren, fand keine Reporteraktivierung statt. Dies diente als Negativkontrolle.

2.2.5.4 β -Galaktosidase-Test

Die β -Galaktosidase-Aktivität von einzelnen Klonen wurde gemessen, indem den Hefezellen zur Metabolisierung 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) angeboten wurde. Die Enzymaktivität wurde anschließend durch Blaufärbung bestimmt.

Semiquantitativer β -Galaktosidase-Test:

Am Vortag wurden 3 ml Selektionsmedium mit zwei bis drei großen Kolonien angeimpft und bei 30°C geschüttelt. Nach 16 h wurde im Photometer der OD-Wert bei

einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt und ein Äquivalent der Flüssigkultur verwendet, das 200 µl Kultur mit einer $OD_{600} = 6$ entsprach. Die in diesem Volumen enthaltenen Hefezellen wurden mit Hilfe eines Dot-Blot-Gerätes auf Filterpapier aufgetragen. Um mögliche Fehler zu minimieren und die Farbentwicklung über verschieden lange Zeiträume zu messen, wurden von jedem Klon 6 Proben aufgetragen. Anschließend wurde das Filterpapier in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei RT aufgetaut. Der Filter wurde in drei Stücke geteilt und mit X-Gal-Puffer [pro 100 ml Puffer: 1,61 g $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,55 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, 0,075 g KCl, 0,0246 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,27% -Mercaptoethanol und 1,67 ml X-Gal (20 mg/ml in N,N-Dimethylformamid)] inkubiert. Die Reaktion wurde nach 2, 4 und 16 h gestoppt, indem je ein Filterstück getrocknet wurde. Die Auswertung erfolgte anhand einer Einschätzung der Stärke der Blaufärbung per Augenmaß. Zum Vergleich wurden die in 2.2.5.3 vorgestellten Kontrollen mitgeführt.

2.2.5.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die DNA wurde aus Hefezellen mit Hilfe von Glasperlen und einer Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Es wurden ein bis vier Tage alte Kolonien verwendet, die nach dem Pelletieren mit 2% SDS und 1% Triton-X-100 in einem Lysepuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA) denaturiert und mit Glasperlen unter Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) für 2 min auf dem Vortex geschüttelt wurden, um die Zellwände zu zerstören. Nach Zentrifugieren bei 13.000 U/min bei RT für 5 min wurde die obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Die in dieser Phase gelöste DNA wurde durch Zugabe von 1/10 des Volumens einer 3 M Ammoniumacetatlösung und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gefällt. Nach Zentrifugieren bei 13.000 U/min bei 4°C für 20 min wurde das Pellet mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in Aqua bidest aufgenommen.

2.2.5.6 Transformation von *E. coli* mit Hefe-Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA, die aus den Hefen isoliert worden war, wurde in *E. coli* transformiert. Da diese DNA stark mit chromosomaler Hefe-DNA und Proteinen verunreinigt war und die Plasmide in Hefen nicht in großen Kopienzahlen vorlagen, war es notwendig eine Transformationsmethode zu wählen, die eine hohe Effizienz aufwies. Dazu wurden *E. coli*-Zellen des Stammes HB101 durch Elektroporation mit DNA transfiziert (Marcil *et al.*, 1992). Die Durchführung erfolgte mit dem "Cellporator" und dem "Voltage Booster" (Gibco BRL/Life Technologies) nach Herstellerangaben unter Verwendung von 1/20 der Probe der in 2.2.5.5 hergestellten Hefe-Plasmid-DNA-Lösung. Die Kompetenz der verwendeten *E. coli*-Zellen betrug mindestens 10^7 Kolonien/µg (pUC18) Plasmid-DNA. Bei Transformation mit Hefe-Plasmid-DNA erhielt man 15 bis 50 Kolonien pro Transformation.

2.2.5.7 Restriktionsanalyse der Klone zur Auffindung von Duplikaten

Aus *E. coli*-Zellen, die das gewünschte Plasmid trugen, wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym HaeIII oder HinFI verdaut. Beide Enzyme erkannten eine Vier-Basen-Folge als Restriktionsschnittstelle, sodaß das eingesetzte Plasmid wahrscheinlich in viele Fragmenten zerschnitten wurde. Dabei entstanden bei jedem Klon ein charakteristisches Schnittmuster mit 20 bis 25 Fragmenten. Die einzelnen Fragmente wurden in einem 10%igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das Bandenmuster dokumentiert. Durch Vergleiche der Restriktionsmuster einzelner Klone konnten mehrfach vorhandene Klone aussortiert werden.

2.2.5.8 Eliminierung von falsch-positiven Klonen

Es besteht die Möglichkeit, daß verschiedene AD.cDNA-Klone das Reportergen aktivieren, obwohl sie mit dem Fängerprotein nicht spezifisch interagieren. Zur Überprüfung der Spezifität der Wechselwirkungen wurde jeder Klon zusammen mit einem irrelevanten Fängerprotein exprimiert und alle Klone, die -Galaktosidaseaktivität zeigten, als falsch-positive Klone verworfen. Als irrelevantes Fängerprotein diente murines p53, das von dem Plasmid pVA3-1 kodiert wurde.

2.2.6 Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen

2.2.6.1 *In Vitro*-Bindungstest von Proteinen

In Vitro-Bindungstest mit Zellysat aus COS-7-Zellen

Bakteriell synthetisierte, gereinigte Proteine (2.2.3.2), die mit ihrem Polyhistidinschwanz an Ni-NTA-Agarose gekoppelt und so immobilisiert waren, wurden zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen verwendet. Dabei wurden 37 µg gereinigtes Protein und 1000 µl Lysat aus COS-7-Zellen (2.2.3.9), in denen das zu untersuchende Protein exprimiert wurde, in einem Rotator bei 4°C für 3 h inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde die Agarose intensiv gewaschen (3 × mit SB-Puffer (2.2.3.2), 2 × mit PBS unter Zusatz von 0,1% Tween 20, 3 × mit PBS). Anschließend wurden die Polyhistidin-Proteine zusammen mit daran gebundenen Proteinen aus dem COS-7-Zellysat durch die Zugabe von 2 × 15 µl SB-Puffer mit 1 mM Imidazol eluiert. Die Eluate wurden jeweils durch kurzes Zentrifugieren (14.000 U/min, bei RT für 20 sek) von der Agarose getrennt und vereinigt. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und zur Denaturierung 10 min gekocht. Anschließend erfolgte ihre Analyse durch Gel-Elektrophorese (2.2.2.1), Westerntransfer und Immunoblot (2.2.2.2.4).

***In Vitro*-Bindungstest mit gereinigtem C1r**

Aus humanem Serum gereinigtes C1r erhielten wir als Gabe aus dem Labor M. Loos, Mainz (Storm *et al.*, 1997). Für den *In Vitro*-Bindungstest wurden 27 µg gereinigtes Protein [His]₆-L1-108 bzw. 7 µl Ni-NTA-Agarose-Lösung (Qiagen) und je 0,4 µg C1r eingesetzt. Die Inkubation erfolgte wie oben beschrieben. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde die Agarose intensiv gewaschen (3 × mit WB-Puffer [50 mM HEPES pH7,4, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerin] 2 × mit WB unter Zusatz von 0,1% Triton X-100, 7 × mit WB). Anschließend wurde der Versuch wie oben beschrieben fortgesetzt.

2.2.6.2 Overlay-Assay

In einem Overlay-Assay werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wird die Wechselwirkung mit anderen Proteinen durch deren Bindung an die membrangekoppelten Proteine untersucht.

In *E. coli* wurde die Expression der gewünschten Proteine induziert und die Zellsate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde vor dem Transfer zur besseren Renaturierung der Proteine bei 4°C für 1 h in PBS inkubiert. Nach dem Western-Blot erfolgte über Nacht eine weitere Renaturierung der Proteine in Renaturierungspuffer (50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,1% NP-40). Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit 5% MMP (in PBS) blockiert. Dann wurde der Blot mit 18 µl [His]₆-L1-108 ([His]₆-L1-108-Ni-NTA-Agarose in PBS; 3,8 µg/µl) in 15 ml 1% MMP in PBS bei 4°C für 2 Stunden inkubiert. Er wurde 5 × 10 Minuten mit PBS (0,1% Triton, 0,2% SDS) gewaschen und mit 0,5% Formaldehyd in PBS bei RT fixiert. Zur Detektion des gebundenen His-PräS1 wurde wie beim Immunoblot verfahren (2.2.2.4).

2.2.6.3 Nachweis der Bindung von HBV-Virionen an C1r durch ELISA

Zum Nachweis einer Bindung von HBV-Virionen an C1r wurden als Reaktionsgefäß eine 96-Loch-Platte verwendet. An die Oberfläche der einzelnen Löcher wurden 50 ng C1r (gereinigt aus humanem Serum) gebunden und unspezifische Proteinbindungsstellen mit 5% MMP in PBS blockiert. Als nächstes wurden die Löcher mit 10⁸ Virionen in WB-Puffer (2.2.6.1) für 2 h inkubiert und anschließend mit WB-Puffer unter Zusatz von 0,2% Tween-20 gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Virionen erfolgte mit HRPO-gekoppeltem S-spezifischem Ak (Abbott) und der HRPO-katalysierten Farbreaktion von OPD (Ortho-Phenyldiamindihydrochlorid)/H₂O₂, das als Substrat photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm quantifiziert werden konnte.

2.2.6.4 Koimmunpräzipitation

Für die Koimmunpräzipitation wurde Protein-G-Sepharose (Virofem) eingesetzt, an die spezifischer Ak (polyklonaler α -S-Kaninchen-Ak K37) gekoppelt war. Zu 1000 μ l Lysat aus COS-7-Zellen (2.2.2.9), in denen die zu untersuchenden Proteine exprimiert wurden, wurde die Protein-G-Sepharose-Ak-Lösung in einer Endkonzentration von 1% zugesetzt. Nach Inkubation bei 4°C im Rotator für 3 h wurden die Immunkomplexe durch kurzes Zentrifugieren (7000 U/min bei RT für 20 sek) sedimentiert und 3 \times mit eiskaltem PBS gewaschen. Die pelletierte Protein-G-Sepharose wurde mit Laemmli-Puffer für SDS-PAGE versetzt und 10 min gekocht. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden 50 μ l der einzelnen Lysate vor und nach der Immunpräzipitation verwendet. Alle Proben wurden anschließend durch Gel-Elektrophorese (2.2.2.1) aufgetrennt und mit Hilfe von Westerntransfer und Immunoblot (2.2.2.2.4) analysiert.

3 Ergebnisse

Das L-Hüllprotein übernimmt im Lebenszyklus von HBV vielfältige Funktionen. Es vermittelt die Bindung und Aufnahme in die Leberzelle, die Verpackung der Nukleokapside in die Virushülle, die Regulation der cccDNA-Amplifikation und eine transkriptionelle Transaktivierung in der Wirtszelle. Bei den Aufgaben, die das L-Protein und insbesondere seine PräS1-Domäne übernimmt, ist anzunehmen, daß es spezifisch mit verschiedenen zellulären Proteinen von Hepatozyten interagiert, um seinen vielfältigen Funktionen gerecht zu werden. Da die meisten dieser zellulären Interaktionspartner noch unbekannt sind, wurde zu ihrer Identifizierung das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Anschließend wurden die isolierten Interaktionspartner und ihre Wechselwirkung mit dem L-Protein weiterführend charakterisiert.

3.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H-System)

Mit dem Y2H-System können interagierende Proteine identifiziert werden, indem das gewünschte Fängerprotein (X) mit der Bindungsdomäne (BD) eines Transkriptionsfaktors (GAL4) fusioniert wird (BD.X). Anschließend wird es zusammen mit cDNAs einer Genbank (cDNA), die jeweils mit der Aktivierungsdomäne (AD) des Transkriptionsfaktors fusioniert sind (AD.cDNA), in Hefezellen exprimiert. Bei einer Interaktion von X mit cDNA-Expressionsprodukten kommen die Bindungs- und die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe. Der funktionell rekonstituierte Transkriptionsfaktor bewirkt dann die Translation eines oder mehrerer Reportergene. Interagierende cDNA-Produkte werden dadurch identifiziert, daß die Hefezellen auf Expression der Reportergene untersucht werden.

3.1.1 Konstruktion des Fängerproteins

Zu Beginn dieser Studien standen die Etablierung des Y2H-Systems und die Suche nach einem geeigneten Fängerprotein aus der PräS1-Region des L-Proteins. Dazu wurde zunächst ein semiquantitativer β -Galaktosidase-Test entwickelt, mit dem das Reporterprotein β -Galaktosidase nachweisbar war. Als negative Kontrollen dienten untransformierte Y190-Hefezellen oder Y190-Zellen, die GAL4-BD exprimierten. Diese wurden auf ihre β -Galaktosidase-Konzentration hin untersucht und zeigten erwartungsgemäß keine β -Galaktosidase-Aktivität; statt dessen behielten sie ihre typische Rosafärbung bei (Abb. 10 A, Reihen 1 und 3). Nur in Y190-Zellen, die den Wildtyp-GAL4-Transkriptionsfaktor exprimierten, ließ sich β -Galaktosidase nachweisen, da GAL4 das Reportergen wie gewünscht aktivierte. Dabei färbten sich die Zellen aufgrund der Umsetzung von X-Gal durch die β -Galaktosidase blau (Abb. 10 A, Reihe 2).

Zur Konstruktion des Fängerproteins wurde BD zunächst mit der vollständigen PräS1-Region (BD.L1-108) fusioniert. Y190-Zellen wurden mit diesem Konstrukt transformiert. Anschließend wurden die Hefezellen auf eine unerwünschte, potentielle

autonome Reporterexpression überprüft, indem ihre β -Galaktosidase-Konzentration bestimmt wurde. Da in diesen Hefezellen keine Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors synthetisiert wurde und somit der GAL4-Transkriptionsfaktor funktionell nicht rekonstituiert werden konnte, sollte keine Reporterexpression meßbar sein. Bemerkenswerterweise ließ sich jedoch in BD.L1-108-transformierten Y190-Zellen eine erhöhte β -Galaktosidase-Konzentration feststellen (Abb. 10 C, Reihe 1). Die an GAL4-BD-fusionierte AS-Sequenz 1-108 des L-Proteins war offensichtlich in der Lage, selbst ohne ein interagierendes AD-Fusionsprotein das Reportergen autonom zu aktivieren. Aufgrund dieser eigenständigen Transkriptionsaktivierung konnte das Konstrukt im Y2H-Test nicht als Fängerprotein eingesetzt werden, sodaß alternative Konstrukte erstellt werden mußten. Da nicht bekannt war, welche Aminosäuren der PräS1-Region für die transaktivierenden Eigenschaften verantwortlich waren, wurden Fängerproteine mit verschiedenen Bereichen der PräS1-Domäne konstruiert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das Reportergen autonom zu aktivieren. Die verschiedenen Konstrukte sind in Abb. 10 B schematisch dargestellt.

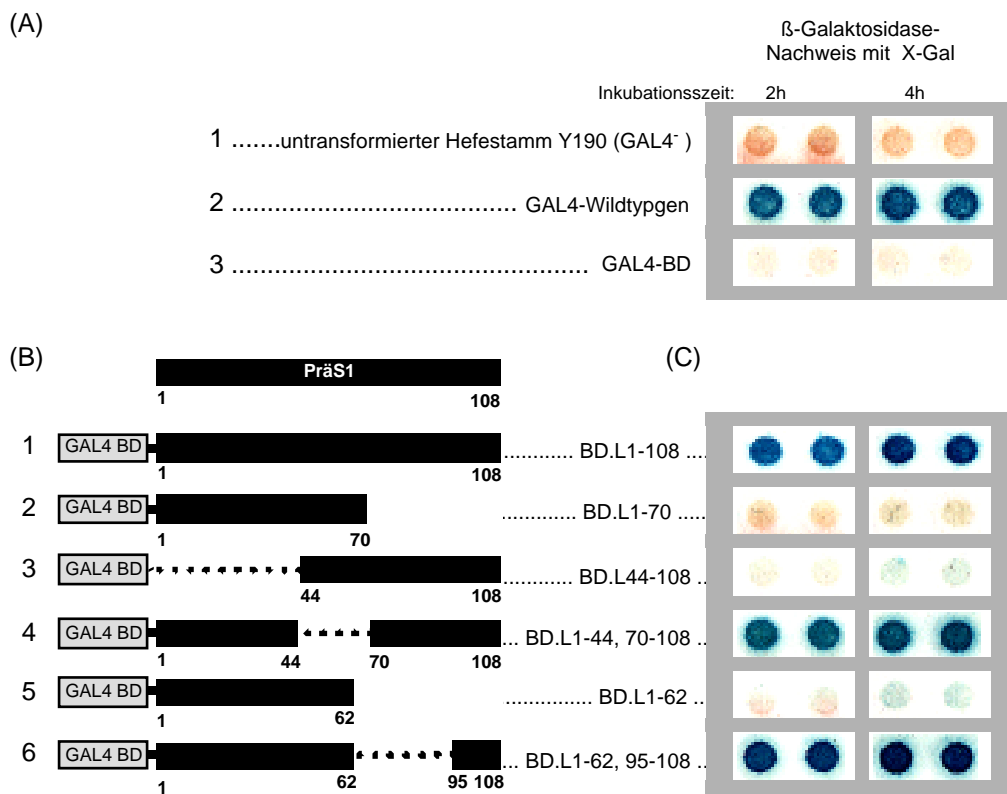


Abb. 10: **Konstruktion von Fängerproteinen und Charakterisierung ihrer Transaktivierungseigenschaften.** (A) Semiquantitativer β -Galaktosidase-Test: Nachweis der β -Galaktosidase-Konzentration bei untransformierten sowie GAL4-Wildtypgen- und GAL4-BD-transformierten Y190-Hefezellen durch Blaufärbung. (B) Schematische Darstellung der BD.PräS1-Konstrukte (Die Zahlen kennzeichnen die entsprechenden AS-Positionen, die gepunkteten Linien geben Deletionen an). (C) β -Galaktosidase-Test der BD.PräS1-Konstrukte: Nachweis der β -Galaktosidase-Konzentration in Y190-Zellen, die mit den in (B) dargestellten BD.PräS1-Konstrukten transformiert waren.

In Abb. 10 C ist der β -Galaktosidase-Nachweis für Y190-Zellen gezeigt, welche die verschiedenen BD.PräS1-Konstrukte exprimierten. Dabei wiesen sowohl die im PräS1-Zentrum deletierten Konstrukte BD.L1-44,70-108 und BD.L1-62,95-108 als auch das Fusionsprotein BD.L1-108 mit der vollständigen PräS1-Domäne eine vergleichbare Blaufärbung und damit eine ähnliche starke β -Galaktosidase-Expression wie das GAL4-Wildtyp-Konstrukt auf (Abb. 10 C Reihen 1, 4 und 6). Die Konstrukte, die N-terminal (BD.L44-108) oder C-terminal (BD.L1-70 und BD.L1-62) verkürzt waren, zeigten keine autonome Transkriptionsaktivierung und konnten deshalb für die Suche nach Interaktionspartnern verwendet werden. Da BD.L1-62 dem Konstrukt BD.L1-70 sehr ähnlich ist, wurde nur BD.L1-70 verwendet. Um möglichst alle Bereiche der PräS1-Domäne im Y2H-System einzusetzen, wurde neben BD.L1-70 auch das Konstrukt BD.L44-108 als Fängerprotein verwendet.

3.1.2 Y2H-Test

HBV ist neben seiner Wirtsspezifität auch für seine Gewebespezifität bekannt. Es repliziert und persistiert fast ausschließlich in humanen Hepatozyten. Deshalb wurde im Y2H-System eine humane Leberzell-cDNA-Bank eingesetzt, um die Wechselwirkung des L-Proteins, insbesondere seiner PräS1-Domäne, mit Hepatozyten-spezifischen Proteinen zu untersuchen. Als Fängerproteine wurden die oben genannten Konstrukte BD.L1-70 und BD.L44-108 verwendet.

3.1.2.1 Y2H-Test mit BD.L1-70

Zu Beginn wurden BD.L1-70-transformierte Y190-Zellen mit der AD.cDNA-Genbank transformiert, dabei wurden mit dem N-terminalen PräS1-Konstrukt 2×10^7 AD.cDNA-Klone auf Interaktion mit der PräS1-Domäne untersucht. In Abb. 11 ist der Ablauf des Y2H-Tests mit dem Fängerprotein BD.L1-70 schematisch skizziert. Es wurden 171 Klone mit $\text{Leu}^- \text{Trp}^- \text{His}^-$ -Medium selektiert. Dabei zeigte die $\text{Leu}^+ \text{Trp}^+$ -Kompetenz der isolierten Klone an, daß sie sowohl das AD.cDNA-Plasmid als auch das BD.L1-70-Plasmid trugen. Ihre His^+ -Kompetenz war auf eine Aktivierung des HIS3-Reportergens zurückzuführen, die eine Interaktion zwischen AD.cDNA und BD.L1-70 signalisierte. Zusätzlich wurde bei der Transformation auch die Gesamtzahl der Transformanden bestimmt, die 2×10^7 betrug und somit der mehr als sechsfachen Anzahl der unabhängigen Klone der eingesetzten cDNA-Bank (3×10^6) entsprach. Anschließend wurden die 171 isolierten Klone auf Expression des zweiten Reportergens, der β -Galaktosidase, untersucht. Lediglich zwei Klone zeigten keine β -Galaktosidase-Aktivität und wurden verworfen. Aus den verbleibenden Klonen wurde durch Cycloheximid-Selektion das Fängerplasmid spezifisch eliminiert, da das Grundgerüst dieses Plasmids Sensitivität gegenüber Cycloheximid kodiert und folglich nur Zellen überlebten, die das Plasmid spontan verloren hatten. Nach einem erneuten β -Galaktosidase-Test wurden

alle Klone entfernt, die weiterhin enzymatische Aktivität aufwiesen, da sie das Reporteragen offensichtlich autonom aktivierten.

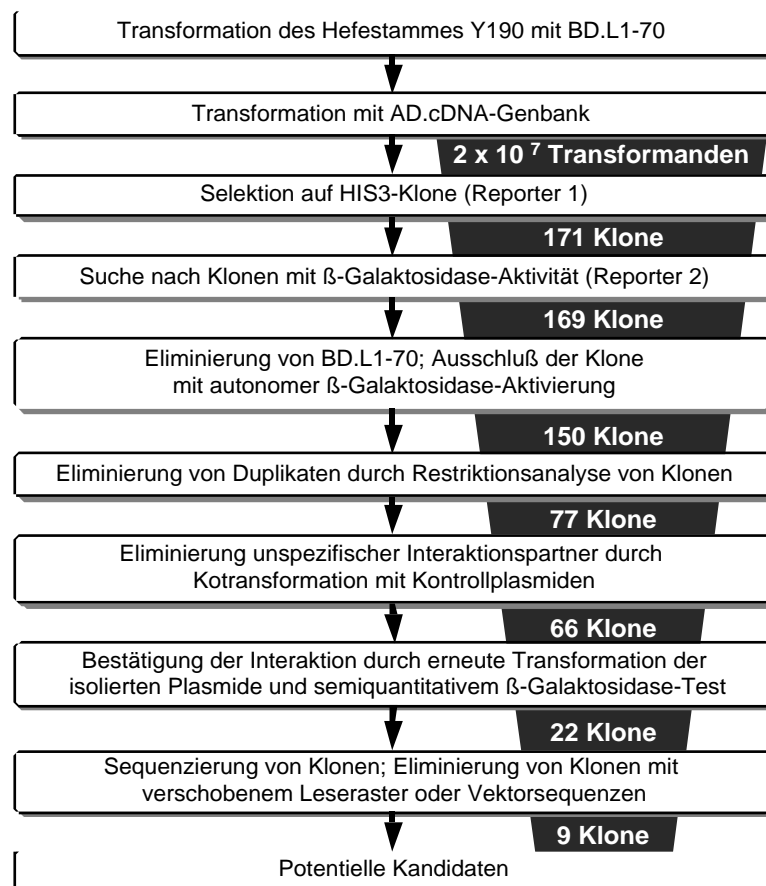


Abb. 11: **Schematische Darstellung eines Y2H-Tests anhand von BD.L1-70 als Fängerprotein.** Mit Hilfe der gezeigten Kontrollschritte konnte die anfängliche Zahl von 171 His⁺-positiven Klone auf neun potentielle Interaktionspartner eingegrenzt werden.

Es verblieben 150 Klone, aus denen jeweils die AD.cDNA-Plasmid-DNA isoliert wurde. Diese wurde anschließend in *E. coli* transformiert und amplifiziert. Durch Restriktionsanalyse mit dem statistisch häufig schneidenden Restriktionsenzym HaeIII entstand für jeden AD.cDNA-Klon nach elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente ein charakteristisches Muster. Durch Vergleich dieser Muster konnten Klone mit ähnlichen Fragmenten zu Familien zusammengefaßt werden, von denen jeweils ein Stellvertreter weiter untersucht wurde. Abb. 12 zeigt Fragmentmuster von 13 zufällig aus der Gesamtpopulation ausgewählten Klone. Am rechten Rand der Abb. 12 sind die Fragmente angegeben, die bei der Restriktion des AD-Plasmids (pACT2) entstehen und die somit in jedem Klon vorhanden sind. Die Klone AD.X4, AD.Y6, AD.Y5, AD.Q2, AD.V6, AD.W1 und AD.W2 sind einfach vorhanden, da sie neben den allen gemeinsamen AD-Plasmid-Fragmenten zusätzlich spezifische Fragmente aufweisen. Im Gegensatz dazu gehören die Klone AD.M3, AD.O1, AD.P1, AD.T4, AD.T9 und AD.U5 zu einer gemeinsamen cDNA-Familie, weil sie alle gleiche charakteristische Fragmente mit Größen von 24 bp, 66 bp, 72 bp, 100 bp und 120 bp

zeigen (in Abb. 12 mit roten Pfeilen markiert). Im Fragmentmuster dieser Klone waren noch weitere Fragmente zu beobachten, die nicht jeder Klon dieser cDNA-Familie besaß (in Abb. 12 mit blauen Pfeilen gekennzeichnet). Aus deren Existenz folgte, daß die Klone nicht vollständig identisch waren, aber große Ähnlichkeit besaßen. Sie repräsentierten verschiedene cDNAs desselben Proteins, das als Interaktionspartner der PräS1-Domäne im Y2H-Test identifiziert wurde.

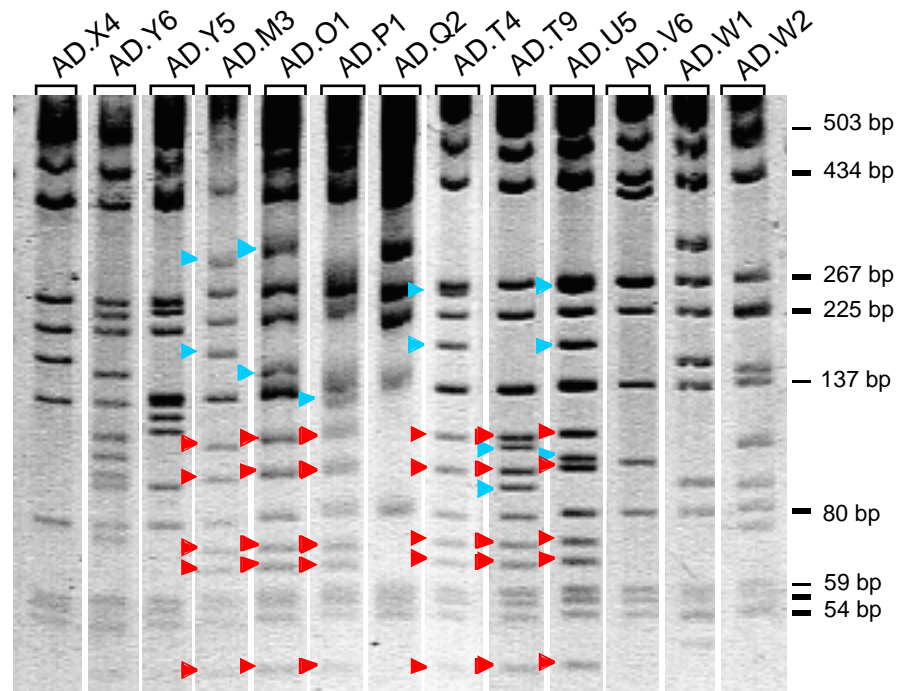


Abb. 12: **Restriktionsanalyse zur Eliminierung von Duplikaten.** Die Plasmid-DNAs verschiedener Klone wurden mit dem Restriktionsenzym HaeIII geschnitten und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Rechts sind die Fragmente angezeigt, die bei der Restriktion des Wildtyp-Vektors pACT2 entstehen. Rote Pfeile markieren gleiche Fragmente verschiedener Klone, die deshalb zu einer cDNA-Familie zusammengefaßt werden. Die blauen Pfeile innerhalb dieser Familie kennzeichnen zusätzlich auftretende Restriktionsfragmente, die für den jeweiligen Klon spezifisch sind.

Durch Restriktionsanalysen konnten die 150 Klone in 77 Familien zusammengefaßt werden. Jeweils ein Stellvertreter wurde dann daraufhin überprüft, ob seine Interaktion mit BD.L1-70 spezifisch war oder durch ein unrelevantes Protein ersetzt werden konnte. Dazu wurden Hybridproteine aus DNA-BD und murinem p53 (BD.p53) verwendet. Zeigten die Klone bei Koexpression von BD.p53 und AD.cDNA eine Transkription des Reportergens β -Galaktosidase, interagierte der cDNA-Klon unspezifisch mit p53. Deshalb wurde er als falsch-positiv verworfen.

Von den verbleibenden 66 Klonen wurden jeweils die AD.cDNA-Plasmide erneut mit BD.L1-70 in Hefen koexprimiert. Bei 22 der Klone wurde die Interaktion durch den Nachweis von β -Galaktosidase bestätigt. Diese Klone wurden dann sequenziert und homologe Sequenzen mittels Genbank-Recherche identifiziert. Klone, die Vektorsequenzen enthielten oder bei denen der Leserahmen des identifizierten homologen Gens

im falschen Raster lag, wurden verworfen. Letztlich konnte die Anzahl auf folgende neun potentielle Interaktionspartner eingegrenzt werden: AD.Ä2, AD.C1, AD.G3, AD.L2, AD.L3, AD.P4, AD.T4, AD.W3 und AD.W5. Im Diagramm der Abb. 13 ist die Häufigkeit des Auftretens dieser Klone dargestellt, wobei auffällt, daß der Klon AD.T4 überproportional häufig isoliert wurde. Alle weiteren Klone kamen in ähnlicher Frequenz von 2 bis 5 Klonen vor.

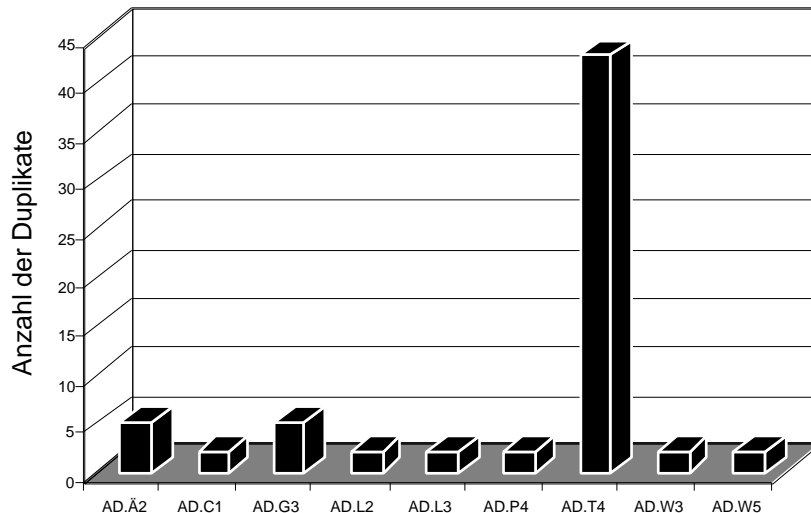


Abb. 13: **Anzahl der Duplikate der neun verschiedenen AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L1-70 interagierten.** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Klone aufgetragen; auf der Y-Achse ist die Häufigkeit ihres Auftretens dargestellt.

Um auszuschließen, daß während der Amplifizierung der cDNA-Bank die cDNA-Familie von AD.T4 überproportional vermehrt worden war, wurden zufällig ausgewählte Klone der cDNA-Bank ebenfalls mit HaeIII geschnitten und ihre Fragmente analysiert. Wie Abb. 14 (S. 44) zeigt, ist das für AD.T4 charakteristische Schnittmuster (durch Pfeilspitzen am linken Rand gekennzeichnet) bei keinem der Klone zu sehen. Ebenso zeigten alle Klone erwartungsgemäß ein unterschiedliches Fragmentmuster.

Die DNA-Sequenz der neun isolierten cDNA-Klone wurde, soweit möglich, durch eine Genbank-Recherche mit BLAST (National Center for Biotechnology Information [NCBI], USA) identifiziert. Es wurden die DNA-Sequenzen in die entsprechenden AS-Sequenzen übersetzt und das Stoppkodon bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Klone mit dem Restriktionsenzym BglIII geschnitten, dessen Schnittstellen im AD.cDNA-Plasmid so angeordnet sind, daß anhand des entstehenden Fragments die Größe der eingefügten cDNA bestimmt werden konnte (Abb. 9, S. 32). Bei Präsenz von BglIII-Schnittstellen innerhalb der cDNA-Sequenz wurde die Gesamtgröße durch Summierung der einzelnen Fragmentgrößen berechnet. Darüber hinaus wurden diese neun Klone im Y2H-Test auf Interaktion mit dem C-terminalen Konstrukt BD.L44-108 untersucht. Die Charakterisierung und Identität der neun Klone sowie die Stärke ihrer Interaktion mit dem N- und C-terminalen PräS1-Konstrukt, die im semiquantitativen -Galaktosidase-Test ermittelt wurde, ist in Tab. 6 (S. 44) gezeigt.

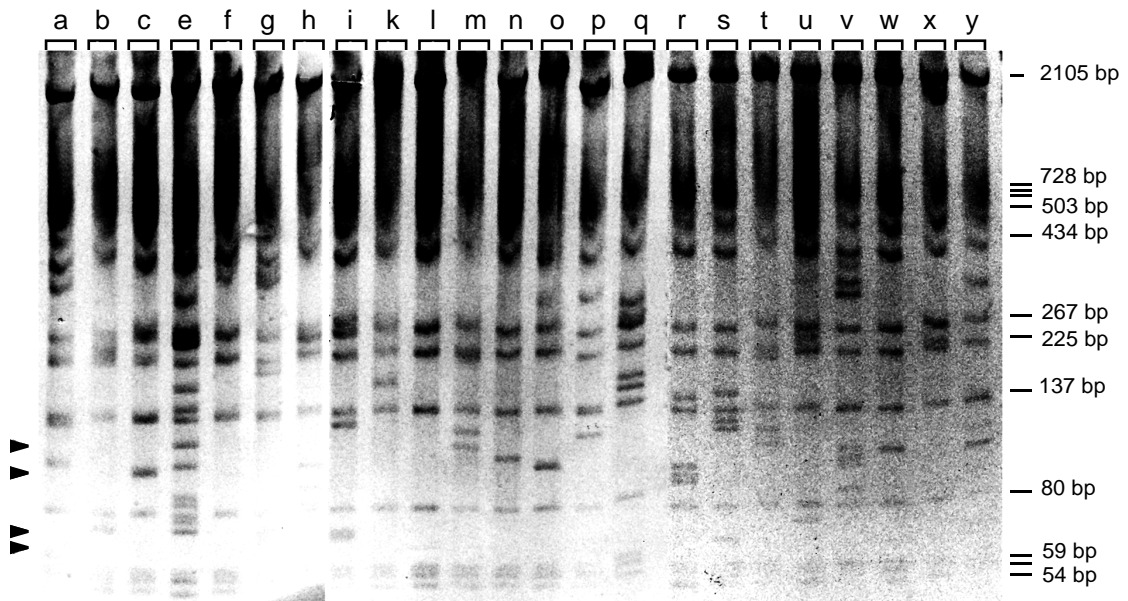


Abb. 14: **Restriktionsanalyse zufällig ausgewählter Klone.** Die Plasmide verschiedener Klone wurden mit dem Restriktionsenzym HaeIII geschnitten und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. In dieser willkürlich ausgewählten Population konnten keine mehrfach vorhandenen Klone identifiziert werden. Die Pfeilspitzen am linken Rand markieren die für AD.T4 charakteristischen Fragmente, die bei keinem anderen Klon zu beobachten waren. Am rechten Rand sind die Fragmente aufgetragen, die bei der Restriktion des Originalvektors pACT2 entstehen.

Tab. 6: **Auflistung der AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L1-70 isoliert wurden.** Neben der Bezeichnung der Klone, ihrer homologen Sequenz und der Größe des eingefügten cDNA-Fragments ist auch die Stärke ihrer Interaktion mit BD.L1-70 und BD.L44-108 im Y2H-Test anhand ihrer β -Galaktosidase-Aktivität (mit +) angegeben.

Klon	β -Gal-Test : Interaktion mit BD.L1-70	β -Gal-Test : Interaktion mit BD.L44-108	Identifizierte Sequenz laut Genbank	Länge der cDNA- Sequenz (bp)
AD.Ä2	++	+++	Hämopexin	1600
AD.C1	+++	+++	Protein E der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese (MCBPE)	3400
AD.G3	++++	++	C1r	550
AD.L2	++	+++	Elongationsfaktor 2 (EF2)	1100
AD.L3	+++	+++	nicht in der Genbank vorhanden	1600
AD.P4	++	++	mitochondriale Thioredoxin-abhängige-Peroxidase	1600
AD.T4	++++	++	H4-Protein der Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Familie	850
AD.W3	+++	+++	3'-flankierende Region des humanen -1-Antitrypsin-Gens	2100
AD.W5	+	+	"Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase 3 (HIPK3)	700

Der Klon AD.Ä2 enthielt eine 1600 bp-lange Sequenz, die mit dem Gen des Serumproteins Hämopexin homolog war. Im Y2H-Test interagiert er mit dem PräS1-Konstrukt BD.L44-108 etwas stärker als mit dem ursprünglich als Fängerprotein eingesetzten BD.L1-70-Konstrukt. Die 3400 bp-lange cDNA von AD.C1 umfaßte Sequenzen des Proteins E der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese und zeigte mit beiden PräS1-Konstrukten eine vergleichbare Interaktion im Y2H-Test. AD.G3 kodiert mit seiner 550 bp-langen Sequenz für Bereiche von C1r und wies im Y2H-Test eine deutlich stärkere Interaktion mit dem N-terminalen Konstrukt BD.L1-70 als mit dem C-terminalen Konstrukt BD.L44-108 auf. Der Klon AD.L2 zeigte mit seiner 1100 bp-langen cDNA eine eindeutige Homologie zum ribosomalen Elongationsfaktor 2. Im Y2H-Test waren die Wechselwirkungen zwischen AD.L2 und dem ursprünglichen Fängerprotein BD.L1-70 schwächer als mit BD.L44-108. Bei der Genbank-Recherche konnten keine homologen Sequenzen zum Klon AD.L3, dessen cDNA-Fragment eine Länge von 1600 bp aufwies, identifiziert werden. Er interagiert im Y2H-Test mit beiden PräS1-Konstrukten gleich stark. AD.P4 kodiert mit seiner 1600 bp-langen cDNA für Abschnitte der mitochondrialen Thioredoxin-abhängigen-Peroxidase und wies eine vergleichbar starke Interaktion mit beiden PräS1-Fängerproteinen auf, wenn diese auch etwas geringer als bei den anderen Klonen ausfiel. Der Klon AD.T4 enthielt eine 850 bp-lange Sequenz, die mit der Sequenz der H4-Kette der Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Familie homolog war. Im Y2H-Test interagiert er mit BD.L1-70 sehr stark, während die Wechselwirkung mit BD.L44-108 deutlich schwächer war. Die 2100 bp-lange cDNA von AD.W3 umfaßte Sequenzen der 3'-flankierenden Region des humanen α -1-Antitrypsin-Gens. Im Y2H-Test interagiert AD.W3 mit dem N-terminalen PräS1-Konstrukt BD.L1-70 deutlich stärker als mit dem C-terminalen Konstrukt BD.L44-108. Der Klon AD.W5 kodiert mit seiner 700 bp-langen Sequenz für Bereiche der "Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase 3. Im Vergleich zu den anderen Klonen zeigte er im Y2H-Test eine deutlich schwächere, aber trotzdem signifikante α -Galaktosidaseaktivität, die bei beiden PräS1-Konstrukten vergleichbar war.

3.1.2.2 Y2H-Test mit BD.L44-108

Mit dem Fängerprotein BD.L44-108 wurden $3,3 \times 10^6$ AD.cDNA-Klone auf ihre Interaktion mit der PräS1-Domäne untersucht. Dies entsprach in etwa der Anzahl der unabhängigen Klone der eingesetzten cDNA-Bank (3×10^6). Von ursprünglich 69 isolierten Klonen blieben nach Ausschluß unspezifisch bindender Klone und Restriktionsanalyse zur Identifizierung von Duplikaten noch acht Klone übrig, die spezifisch mit der N-terminal verkürzten PräS1-Domäne interagierten. Diese acht potentiellen Interaktionspartner wurden mit AD.1C, AD.27P, AD.36P, AD.46P, AD.48P, AD.49P, AD.50P und AD.60P bezeichnet.

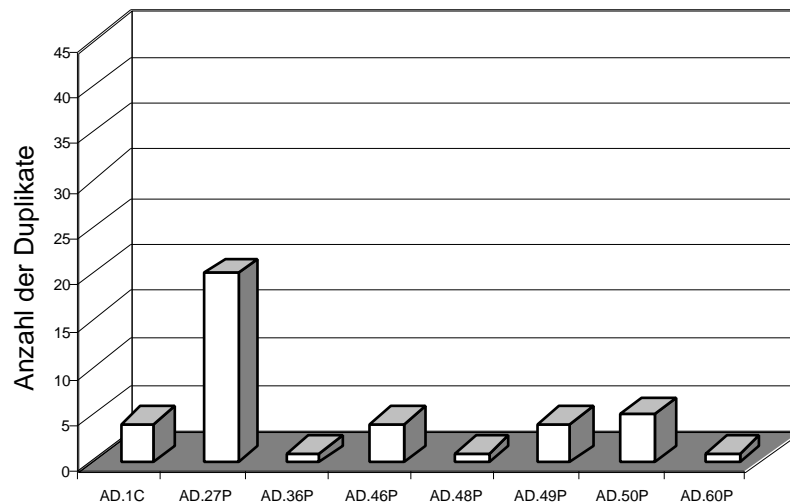


Abb. 15: **Anzahl der Duplikate der acht verschiedenen AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L44-108 interagierten.** Auf der X-Achse sind die verschiedenen Klone aufgetragen; auf der Y-Achse ist die Häufigkeit ihres Auftretens dargestellt.

Die Anzahl der Duplikate, die von jedem dieser Klone identifiziert wurde, sind in Abb. 15 dargestellt. Auch hier trat mit AD.27P wieder ein Klon überproportional häufig auf, während das Vorkommen der anderen Klone mit 1 bis 5 Duplikaten relativ ähnlich war. Die acht Klone wurden sequenziert und durch Genbank-Recherche identifiziert (Tab. 7).

Tab. 7: **Auflistung der AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L44-108 isoliert wurden.** Neben der Bezeichnung der Klone, ihrer homologen Sequenz und der Größe des eingefügten cDNA-Fragments ist auch die Stärke ihrer Interaktion mit BD.L1-70 und BD.L44-108 im Y2H-Test anhand ihrer β -Galaktosidase-Aktivität (mit +) angegeben.

Klon	β -Gal-Test : Interaktion mit BD.L1-70	β -Gal-Test : Interaktion mit BD.L44-108	Identifizierte Sequenz laut Genbank	Länge der cDNA- Sequenz (bp)
AD.1C	++	+++	2-Adaptin	1700
AD.27P	nicht unter- sucht	+++	mitochondriale Eisen-Schwefel-Untereinheit der humanen Succinat-Ubichinon-Dehydrogenase	600
AD.36P	nicht unter- sucht	+++	3'-untranslatierte Region der großen Form der mRNA für die humane mitochondrialen Aldehyd-Dehydrogenase 4	1000
AD.46P	-	++	leichte Kette von Ferritin	800
AD.48P	+	+++	hypothetisches Protein PRO1038	600
AD.49P	++	+++	Elongationsfaktor 2 (EF2)	1000
AD.50P	++	+++	Hämopexin	1000
AD.60P	++	++	Dolichol-Phosphat-Mannose-Transferase- Polypeptid 3 (DPM3)	2500

AD.1C kodierte mit seiner 1700 bp-langen Sequenz für Bereiche von 2-Adaptin und wies im Y2H-Test eine deutlich stärkere Interaktion mit dem C-terminalen Konstrukt BD.L44-108 als mit dem N-terminalen Konstrukt BD.L1-70 auf. Die 600 bp-lange cDNA von AD.27P umfaßte Sequenzen der Eisen-Schwefel-Untereinheit der humanen Succinat-Ubichinon-Dehydrogenase, einem mitochondrialen Protein, und zeigte mit BD.L44-108 eine starke Interaktion. Der Klon AD.36P enthielt eine 1000 bp-lange Sequenz, die mit der Sequenz der 3'-untranslatierten Region der großen Form der mRNA für die humane mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase 4 homolog war. Im Y2H-Test waren die Wechselwirkungen zwischen AD.36P und dem ursprünglichen Fängerprotein BD.L1-70 deutlich zu detektieren, während sie mit BD.L44-108 nicht untersucht wurden. Der Klon AD.46P zeigte mit seiner 800 bp-langen cDNA eine eindeutige Homologie zur leichten Kette von Ferritin. Im Y2H-Test interagierte er mit dem PräS1-Konstrukt BD.L44-108 etwas stärker als mit dem als Fängerprotein eingesetzten BD.L1-70. Dabei fiel die Interaktion insgesamt geringer aus als bei einem Großteil der anderen Klone. Für den Klon AD.48P, dessen cDNA-Fragment eine Länge von 600 bp aufwies, konnten bei einer Genbank-Recherche nur Sequenzen eines hypothetischen Proteins PRO1038 als homolog identifiziert werden. Im Y2H-Test interagierte er mit BD.L44-108 stark, während damit verglichen die Wechselwirkung mit BD.L1-70 deutlich schwächer war. AD.49P kodierte mit seiner 1000 bp-langen cDNA ebenso wie AD.L2 (3.1.2.1) für Abschnitte des Elongationsfaktors 2 und wies mit dem ursprünglichen Fängerprotein BD.L44-108 eine stärkere Interaktion als mit dem N-terminal verkürzten BD.L1-70 auf. Der Klon AD.50P zeigte mit seiner 1000 bp-langen cDNA eine eindeutige Homologie zu Hämopexin, ebenso wie der oben beschriebene Klon AD.Ä2. Im Y2H-Test waren die Wechselwirkungen zwischen AD.Ä2 und BD.L1-70 schwächer als mit BD.L44-108. AD.60P kodierte mit seiner 2500 bp-langen cDNA für Abschnitte des Dolichol-Phosphat-Mannose-Transferase-Polypeptids 3 und wies eine vergleichbare Interaktion mit beiden PräS1-Fängerproteinen auf. Sie fiel insgesamt geringer aus als bei einem Großteil anderer Klone, war aber trotzdem signifikant.

3.2 Charakterisierung der Klone

Im Y2H-System konnten Proteine mit verschiedenen Funktionen, die in unterschiedlichen Bereichen der Zelle lokalisiert sind, als Interaktionspartner der PräS1-Region identifiziert werden. Sie gehören zu Serumproteinen (AD.G3, AD.T4, AD.Ä2, AD.50P, AD.W3), mitochondrialen Proteinen (AD.P4, AD.27P, AD.36P), ribosomalen Proteinen (AD.L2, AD.49P) und ER-Proteinen (AD.60P). Daneben wurden auch zytosolische Proteine (AD.46P, AD.1C) identifiziert. Desweiteren wurden zwei Proteinkinasen (AD.W5 und AD.48P) und ein Enzym der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese (AD.C1) gefunden, deren genaue zelluläre Lokalisation nicht bekannt sind. Zu der aus AD.L3 isolierten cDNA konnte keine homologe Sequenz identifiziert werden.

3.2.1 Eliminierung weiterer falsch-positiver Klone

Die Klone AD.W3 und AD.P4 enthielten DNA-Sequenzen, die in untranslatierten Regionen der homologen Gene lagen. Da die im Y2H-System von diesen Sequenzen translatierten Polypeptide wahrscheinlich keine physiologische Relevanz als funktionelle Proteine haben, wurden diese cDNA-Klone als falsch-positiv verworfen. Ebenso wurde die Untersuchung von AD.L3 zurückgestellt, bis durch Voranschreiten des "Humanen-Genom-Projekts", bei dem das menschliche Genom komplett sequenziert wurde, die humanen DNA-Sequenzen vollständig in Genbanken veröffentlicht sind. Ergibt eine erneute Recherche keine homologen DNA-Sequenzen zu AD.L3, kann der Klon ebenfalls als falsch-positiv eliminiert werden.

In einer Studie zur Charakterisierung von falsch-positiven Ergebnissen von Y2H-Systemen wurden über 100 Y2H-Tests analysiert, bei denen die unterschiedlichsten Fängerproteine verwendet wurden (Golemis, 1996). Dabei zeigte sich, daß, unabhängig von dem eingesetzten Fängerprotein, häufig die gleichen Proteine als falsch-positive Interaktionspartner identifiziert wurden. Vor allem Ferritin, ribosomale Elongationsfaktoren und mitochondriale Proteine gehörten neben Chaperonen zur Gruppe falsch-positiver Interaktionspartner. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Klone AD.46P (Ferritin), die Klone AD.P4, AD.27P, AD.36P, die für mitochondriale Proteine kodieren, und AD.L2 bzw. AD.49P (ribosomaler Elongationsfaktor 2) als falsch-positive Interaktionspartner der PräS1-Domäne verworfen.

Im Folgenden werden die cDNA-Klone AD.Ä2, AD.C1, AD.G3, AD.L3, AD.T4, AD.W5, AD.1C, AD.48P, AD.50P und AD.60P, die als positive Interaktionspartner der PräS1-Domäne verbleiben, in alphabetischer Reihenfolge vorgestellt. Dabei werden, soweit möglich, die Struktur und Funktion des identifizierten Proteins kurz beschrieben und der Bereich näher charakterisiert, in dem Protein und der cDNA-Klon homologe Sequenzen besitzen.

3.2.2 AD.Ä2 und AD.50P: Hämopexin

Hämopexin wird in der Leber synthetisiert und ins Serum abgegeben. Es bindet mit hoher Affinität Hämgruppen und transportiert sie zur Leber. Dort werden diese abgebaut, und das enthaltene Eisen wird der Wiederverwertung zugeführt. Das freie Hämopexin kehrt wieder in den Kreislauf zurück. Hämopexin ist ein Serunglykoprotein und gehört zu den Globulinen. Es besitzt ein MW von 63 kD und besteht aus zwei homologen Domänen I und II (siehe Abb. 16), die von einer histidinreichen Scharnierregion getrennt werden (Muller-Eberhard, 1988).

Interessanterweise wurde Hämopexin als Interaktionspartner der PräS1-Domäne sowohl mit dem N-terminalen als auch dem C-terminalen PräS1-Konstrukt im Y2H-Test identifiziert. Einer der im Y2H-Test identifizierten Klone, AD.Ä2, kodierte für das vollständige Hämopexin-Gen, der andere Klon, AD.50P, kodierte für ein N-terminal

verkürztes Hämopexin (Abb. 16). Der N-terminale Bereich von Hämopexin wird für die Interaktion zwischen der PräS1-Domäne und Hämopexin deshalb vermutlich nicht benötigt. Im Y2H-Test zeigte das C-terminale PräS1-Fängerprotein BD.L44-108 eine etwas stärkere Wechselwirkung mit Hämopexin als BD.L1-70 (Tab. 6, S. 44 und Tab. 7, S. 46).

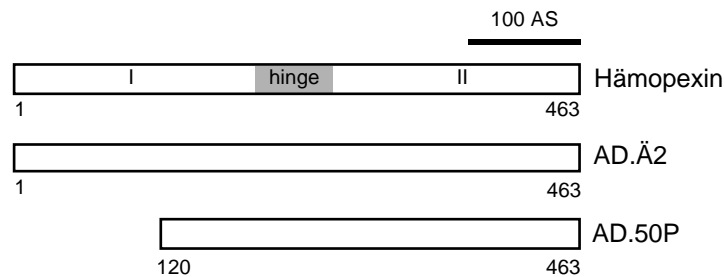


Abb. 16: **Schematische Darstellung von Hämopexin und Vergleich mit den cDNA-Sequenzen aus AD.Ä2 und AD.50P.** Hämopexin besteht aus zwei homologen Domänen (I und II) und einer verbindenden Scharnierregion (hinge). Der cDNA-Klon AD.Ä2 trägt die vollständige Hämopexin-Sequenz, der zweite Klon AD.50P ist N-terminal um 120 AS verkürzt. Die Zahlen geben die entsprechenden AS-Positionen an.

3.2.3 AD.C1: Protein E der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese

Der Syntheseweg des Molybdän-Kofaktors (Moko), eines wichtigen Kofaktors für Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren, ist im Menschen nur spärlich untersucht. Moko besteht aus Molybdopterin mit einem kovalent-gebundenen Molybdän-Atom. Das Molybdopterin wird dabei durch eine Molybdopterin-Synthetase aus einem Vorläufer Z synthetisiert. Der Moko-Biosyntheseweg ist stark konserviert und vor allem in Prokaryonten untersucht worden (Rieder *et al.*, 1998). Erst in den letzten Jahren sind die entsprechenden Gene in Pflanzen erforscht worden (Mendel, 1997). Das Gen des humanen Protein E der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese (MCBPE) wurde vor kurzem der Gendatenbank des NCBI übermittelt (GenBank-Acc.Nr. AF155659). Es bildet die kleinere Untereinheit der Molybdopterin-Synthetase. Die aus AD.C1 isolierte cDNA kodiert für das fast vollständige MCBPE, nur die N-terminalen 38 AS fehlen. Im Y2H-Test waren diese AS für die Wechselwirkung mit der PräS1-Region nicht notwendig. AD.C1 interagierte mit den Fängerproteinen BD.L1-70 und BD.L44-108 gleich stark (Tab. 6, S. 44).

3.2.4 AD.G3: C1r

Die Serinprotease C1r kommt im Serum vor und ist Teil des Proteinkomplexes C1. Dieser C1-Komplex ist die erste Komponente des klassischen Komplementsystems, das wesentlicher Bestandteil der humoralen Immunabwehr ist. C1 besteht aus einem nicht-katalytischen Protein C1q und dem Tetramer C1s-C1r-C1r-C1s, das sich aus zwei homologen Serinprotease-Zymogenen C1r und C1s zusammensetzt (Abb. 17 A). Durch die Bindung von C1q an Antigen-Antikörper-Komplexe kommt es zu einer

Konformationsänderung innerhalb von C1, die eine autokatalytische Spaltung von C1r zur Folge hat. Durch die Spaltung in eine separate A- und B-Kette, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind, wird C1r aktiviert und spaltet anschließend C1s. Der nun vollständig aktivierte C1-Komplex spaltet die Komplementkomponenten C4 und C2 und löst die weitere Aktivierung der Komplementkaskade aus. C1 wird anschließend durch Bindung an den C1-Inhibitor inaktiviert. Dieser Komplex wird von Makrophagen aufgenommen und abgebaut (Arlaud *et al.*, 1993; Storm *et al.*, 1997; Thielens *et al.*, 1999). C1r ist ein Glykoprotein mit einer Länge von 705 AS und einem MW von 83 kD. Es bildet eine hantelförmige Struktur aus, da sowohl sein N-Terminus als auch sein C-Terminus, die beide eine globuläre Tertiärstruktur aufweisen, durch eine Scharnierregion verbunden sind.

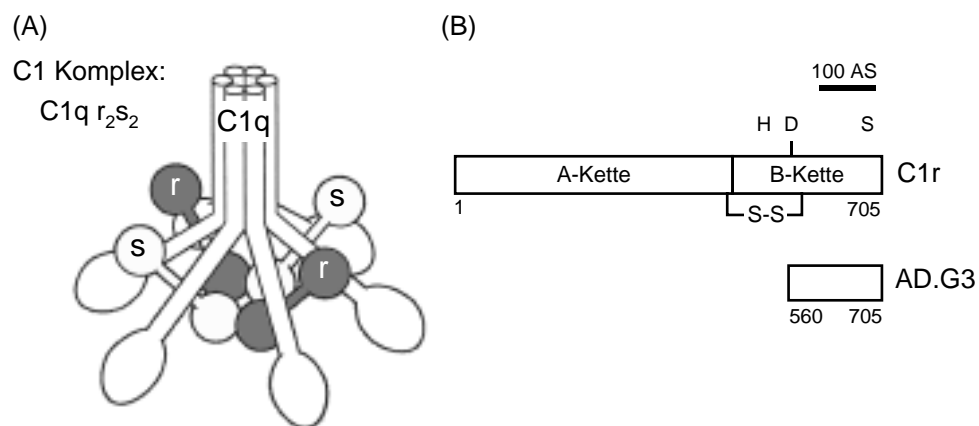


Abb. 17: **Struktur der C1-Komplementkomponente und schematische Darstellung von C1r im Vergleich zu der cDNA-Sequenz aus AD.G3.** (A) C1 besteht aus C1q, einem blumenstraubartigen Komplex aus sechs Monomeren, das mit einem Tetramer aus je zwei Molekülen C1r (graue Hanteln) und C1s (weiße Hanteln) assoziiert ist (entnommen aus: Abbas *et al.*, 1994). (B) C1r besteht aus einer A- und einer B-Kette. Diese werden bei Aktivierung gespalten, wobei die beiden Ketten durch einer Disulfidbrücke (S-S) miteinander verbunden bleiben. Die B-Kette trägt das für Serinproteasen typische katalytische Zentrum, das aus den drei Aminosäuren H, D und S besteht. Die aus AD.G3 isolierte cDNA ist mit dem N-Terminus (AS 560-705) der B-Kette von C1r homolog. Die Zahlen geben die entsprechenden AS-Positionen an.

Der im Y2H-Test identifizierte Klon AD.G3 war mit dem C-terminalen Bereich der B-Kette von C1r homolog (Abb. 17 B). Die B-Kette enthält das katalytisch aktive Zentrum von C1r, eine für Serinproteasen typische AS-Triade aus Histidin (H), Asparagin (D) und Serin (S). Die PräS1-Domäne interagiert im Y2H-Test mit der B-Kette von C1r, wobei das N-terminale Konstrukt von PräS1 eine stärkere Wechselwirkung mit C1r als das C-terminale Konstrukt zeigte (Tab.6, S. 44).

3.2.5 AD.L3

Der Klon AD.L3 kodiert für eine bisher noch nicht identifizierte cDNA. Auch eine ausgedehnte Homologie-Recherche, sowohl mit der DNA- als auch der translatierten AS-Sequenz, erbrachte keine Ergebnisse. Die sequenzierte Basenfolge von L3 umfaßte 488 Nukleotide und ist in Abb. 18 A dargestellt. Der ORF besaß eine Länge von 126 AS

und zeigte keine Ähnlichkeit mit bisher charakterisierten Proteinen. Das Polypeptid enthielt mit 14% einen ungewöhnlich hohen Anteil an Prolinen (Abb. 18 B). Sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Konstrukt der PräS1-Fängerproteine interagierten gleich stark mit AD.L3 im Y2H-Test (Tab. 6, S. 44).

(A)

```
GGTGACTTAA CGCCTTTTCC GGCCCTAGCT CCAGGCGTTT TGAGGCGTCT GGTGCCTGAT
GGTAGGTATG GTGTGTTTGT TCTGTCCCCC AGGGGCTGGA GTCACCTGGT GCCCCTGAAG
GACAGATTTT TGGCTGTTAA AGGATGGCAT TTTCCTGCTG TCTTCTGTGC GTTTAGTTTT
CTTGCTGAGC GGGAGCTCAG TATGACTTGC CACCCACCTG ATACCTCAGG GCAAGGCCCT
TTTTCCCTCC AGCCAGGTGA GTGTTTTCTT CAGGCAGCTG AgGGTCTCGG GGGAGCTGAG
GCTCTGTGCT GCACCCCCAG CCCACAGCTG GGGCATCTCA CTGGAGCTGT TCCAGGCCCC
ACTGGAGAGC AGAGGACCTG ATCCCCCACT AGAGAGGTCC GGTGTGCACA GCCCGCTCCC
AGTGTGCCAA AATGAACTGC TCTCAGCTGA TGGCTGTATT CTGACTTTGA GCCTGTAGAG
GTACAAGG
```

(B)

```
GDLTPFPALA PGVLRRLVDP GRYGVFVLSR RGWSHLVPLK DRFLAVKQWH
FPAVFCAFSF LAERELSMTC HPPDTSQGQP FSLQPGECFL QAAEGPGGAE
ALCCTPSPQL GHLTGAVPGP TGEQRT
```

Abb. 18: Nukleotidsequenz von AD.L3 mit translaterter AS-Folge des ORF. (A) Abfolge der 488 sequenzierten Nukleotide von AD.L3. (B) Translatiertes Polypeptid des Leserahmens; die ungewöhnlich häufig vorkommende AS Prolin (P) ist durch Fettdruck hervorgehoben.

3.2.6 AD.T4: H4 der Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Familie

H4 ist eine schwere Kette der Inter- α -Trypsin-Inhibitor-Familie (ITI_H) mit einem MW von 120 kD (Choi-Miura *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1995). Es wird in der Leber synthetisiert und bei der "Akute-Phase-Reaktion", die einer Entzündung folgt, vermehrt ins Serum entlassen (Daveau *et al.*, 1998). Mitglieder der ITI_H-Familie setzen sich normalerweise aus einer leichten und einer schweren Kette zusammen. Die leichte Kette besteht immer aus Bikunin, einem Polypeptid mit einer Protease-Inhibitor-domäne, während die schwere Kette aus den ITI_H-Mitgliedern H1, H2 oder H3 besteht. Die genaue Funktion der Proteine der ITI_H-Familie ist noch nicht bekannt, sie besitzen aber die Fähigkeit, Proteasen zu inhibieren und Heparin zu binden. Dabei mehren sich die Hinweise, daß sie durch diese Eigenschaften dazu beitragen, die extrazelluläre Matrix zu stabilisieren (Chen *et al.*, 1994; Bost *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu H1, H2 und H3 kommt H4 nicht im Komplex mit Bikunin vor, da die charakteristische Bindungsstelle fehlt. Trotzdem ist H4 aufgrund seiner Homologie mit den anderen schweren Ketten eng verwandt und besitzt auch deren Bindungseigenschaften für Heparin. Der C-Terminus von H4 unterscheidet sich allerdings deutlich. Er trägt eine „von-Willebrand“-Domäne, der in anderen Proteinen die Funktion einer Interaktionsdomäne nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich besitzt der C-Terminus von H4 eine Bradykinin-homologe Domäne, die eine hohe Übereinstimmung mit einer AS-Sequenz von Bradykinin zeigt (Abb. 19). Von Bradykinin ist bekannt, daß es innerhalb dieser Domäne durch die Plasma-Protease Kallikrein gespalten wird, die eine bedeutende Rolle im Blutgerinnungsprozeß, in der Fibrinolyse und im Komplementsystem spielt. So wird vermutet, daß auch H4 an dieser

Stelle von Kallikrein prozessiert werden kann und die entstehenden Spaltprodukte bisher unbekannte Funktionen erfüllen (Nishimura *et al.*, 1995).

Im Y2H-Test mit BD.L1-70 waren zwei Drittel der identifizierten Klone der Sequenz des C-Terminus von H4 homolog. Die aus AD.G4 isolierte cDNA enthielt mit dem AS-Bereich 785-929 von H4 die kürzeste Sequenz, AD.T4 kodierte für die längste C-terminale Sequenz von H4. Die Interaktion von AD.T4 mit BD.L1-70 war deutlich stärker als die Wechselwirkung mit BD.L44-108 (Tab. 6, S. 44). Obwohl beim Y2H-Test mit dem N-terminalen-Konstrukt BD.L1-70 Klone mit H4-homologe Sequenzen dominierten, konnten bei der Untersuchung mit BD.L44-108 keine Sequenzen identifiziert werden, die mit H4 identisch waren.

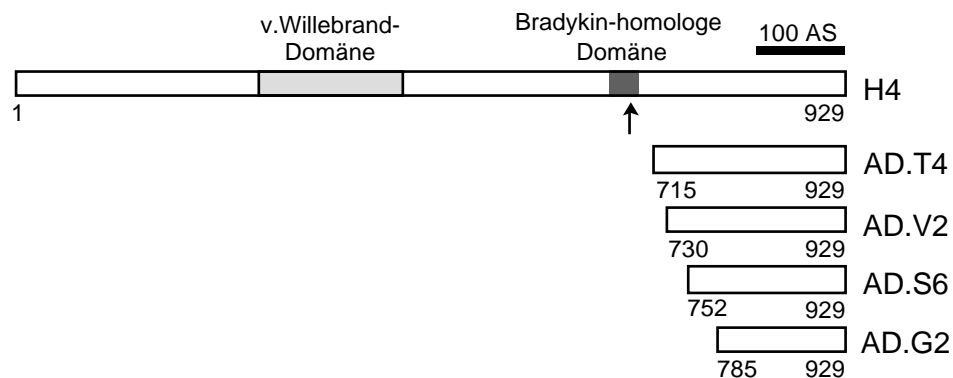


Abb. 19: Schematische Darstellung von H4 im Vergleich mit cDNA-Sequenzen aus AD.T4, AD.V2, AD.S6 und AD.G2. H4 besitzt N-terminal eine "von-Willebrand"-Domäne, die wahrscheinlich für die Fähigkeit wichtig ist, mit anderen Proteinen zu interagieren. In seinem C-terminalen Drittel liegt eine Bradykinin-homologe Domäne, die vermutlich auf Höhe des Pfeiles von Plasma-Kallikrein prozessiert werden kann. Alle im Y2H-Test isolierten cDNAs sind mit dem C-Terminus von H4 homolog, wobei die cDNA von AD.T4 für den größten Sequenzbereich von H4 kodiert.

3.2.7 AD.W5: "Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase 3

Die "Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase 3 (HIPK3) gehört zu den Serin/Threonin Kinasen und wurde von Begley *et al.* (1997) identifiziert. Sie zeigt in ihrer katalytischen Kernregion eine 54%ige Homologie zu der Hefe-Protein-Kinase YAK1. Kim *et al.* (1998) identifizierten HIPK1 und HIPK2 neben HIPK3 als Mitglieder einer neuen "Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase-Familie (HIPK), die im Zellkern lokalisiert sind. Die Proteine dieser Familie sind Ko-Repressoren für den "Homeodomain"-Transkriptionsfaktor. Die Ko-Repressoraktivität ist sowohl von der "Homeodomain-Interacting"-Domäne, die in der C-terminalen Hälfte liegt, als auch von einer für HIPK3 noch nicht genauer definierten Ko-Repressordomäne, die in der N-terminalen Hälfte lokalisiert ist, abhängig.

Die aus AD.W5 isolierte cDNA ist mit der Sequenz AS 560-790 von HIPK3 homolog (Abb. 20). Interessanterweise liegt genau in dieser Region die Interaktionsdomäne von HIPK3, die somit die Interaktion mit der PräS1-Region im Y2H-Test vermittelt. Sowohl

das C-terminale als auch das N-terminale Konstrukt der PräS1-Fängerproteine wiesen eine gleich starke Interaktion im Y2H-Test auf (Tab. 6, S. 44).

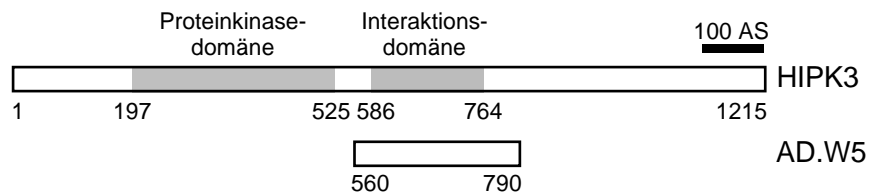


Abb. 20: **Schematische Darstellung von HIPK3 im Vergleich mit der cDNA-Sequenz aus AD.W5.** HIPK3 besitzt eine Proteinkinasedomäne, die das enzymatisch aktive Zentrum enthält und eine Interaktionsdomäne, die für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen verantwortlich ist. Der isolierte cDNA-Klon AD.W5 kodiert für den Bereich AS 560-790 von HIPK3, der der Interaktionsdomäne homolog ist. Die Zahlen geben die entsprechenden AS-Positionen an.

3.2.8 AD.1C: γ 2-Adaptin

Das zytosolische Protein γ 2-Adaptin ist wahrscheinlich eine schwere Kette eines heterotetrameren Adaptorkomplexes und wurde erst vor kurzer Zeit identifiziert (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998). Die Adaptorkomplexe (AP) sind für intrazelluläre Membrantransportprozesse verantwortlich (Kirchhausen *et al.*, 1997). Bei diesem Transport knospen umhüllte Frachtvesikel von einer Spendermembran und fusionieren mit der Membran des Zielkompartiments. Die am besten untersuchten Adaptorkomplexe AP1 und AP2 vermitteln den Transport Clathrin-umhüllter Vesikel. In Abb. 21 ist der Aufbau eines Clathrin-umhüllten Vesikels im Modell dargestellt. Dabei binden APs sowohl an die Spendermembran als auch an die Clathrin-Hülle und verknüpfen diese miteinander. Zusätzlich vermitteln sie durch Bindung an Fracht-rezeptoren die Verpackung spezifischer Frachtmoleküle in den sprossenden Vesikel.

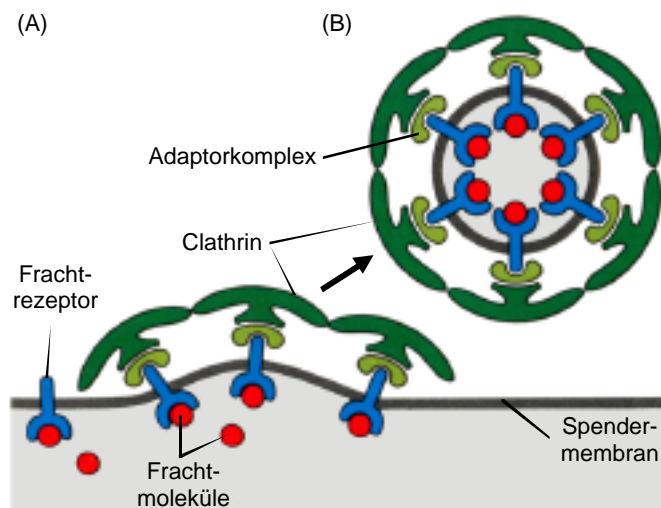


Abb. 21: **Modell zur Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel.** (A) Membran-assoziierte Adaptorkomplexe (AP) binden Clathrin und Frachtrezeptoren und leiten dadurch die Vesikelbildung ein. (B) Durch Knospung entsteht der fertige Clathrin-umhüllte Vesikel, der anschließend im Zytosol transportiert wird (entnommen aus Alberts *et al.*, 1994).

AP1 ist für den Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zum Endosom verantwortlich, während AP2 die Endozytose und den Transport zum Endosom vermittelt. AP1 besteht aus zwei schweren Ketten $\gamma 1$ und $\beta 1$, einer mittleren Kette $\mu 1$ und einer leichten Kette $\sigma 1$ (Abb. 22 A), während AP2 aus $\beta 2$ und $\sigma 2$, $\mu 2$ und $\sigma 2$ aufgebaut ist.

2-Adaptin ähnelt in seinem Aufbau den schweren AP-Ketten und teilt deren typische Domänenstruktur mit einer Kopf-, einer Scharnier- und einer Ohrregion. Von allen bekannten schweren AP-Ketten weist 1-Adaptin zu 2-Adaptin die größte Homologie mit 60% identischen AS auf (Abb. 22 B). 2-Adaptin ist 785 AS lang und besitzt ein MW von 90 kD. Entsprechend seiner vermutlich grundlegenden Funktion im internen Membrantransport von Zellen konnte es ubiquitär in vielen Geweben wie Leber, Niere, Muskel, Gehirn nachgewiesen werden (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998).

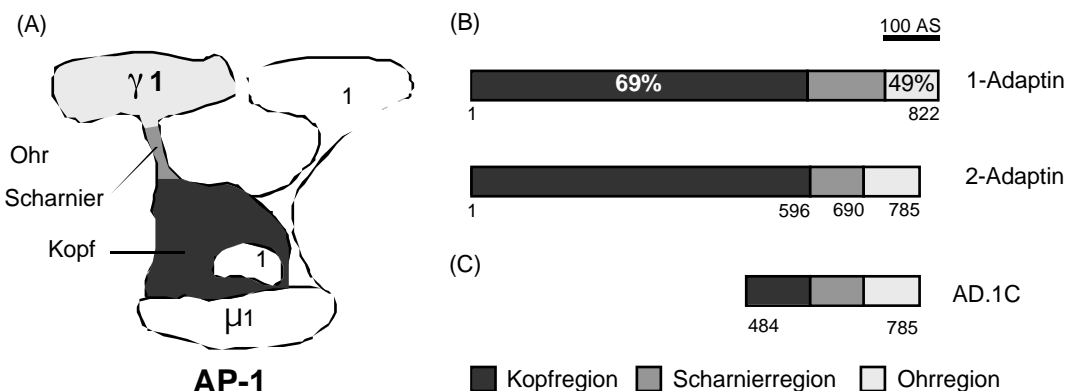


Abb. 22: $\gamma 2$ -Adaptin: Struktur und Vergleich mit $\gamma 1$ -Adaptin, einer schweren Kette des AP1-Komplex. (A) Der Aufbau eines heterotetrameren AP1-Komplexes aus $\beta 1$, $\beta 1$, $\mu 1$ und $\sigma 1$ und die typische Struktur von $\beta 1$, bestehend aus einer Kopf-, Scharnier- und Ohrregion, sind gezeigt. (B) Schematische Darstellung von 2-Adaptin im Vergleich zu 1-Adaptin: auch hier ist die Unterteilung in eine Kopf-, Scharnier- und Ohrregion bei beiden Proteinen zu sehen. Die Prozentzahlen geben dabei die Anzahl homologer AS innerhalb einer Domäne an, die auf eine enge Verwandtschaft zwischen 1- und 2-Adaptin schließen läßt. Nur die Scharnierregion zeigt keine signifikante Konservierung (Takatsu *et al.*, 1998). (C) Die cDNA-Sequenz aus AD.1C ist im Vergleich zu 2-Adaptin mit ihren einzelnen Domänen dargestellt. Die Zahlen geben jeweils die entsprechenden AS-Positionen an.

Obwohl die genaue Funktion von 2-Adaptin noch nicht bekannt ist, konnte gezeigt werden, daß sich seine Rolle im Membrantransport von 1-Adaptin deutlich unterscheidet. Da beide β -Proteine keine zelluläre Kolo-kalisation aufweisen, wird vermutet, daß 2-Adaptin eine von 1-Adaptin abweichende Funktion übernimmt. Beide Proteine lassen sich nur in Gegenwart von GTP mit Membranen assoziieren. Die Bindung von 1-Adaptin wird dabei vom ADP-Ribosylierungs-Faktor 1 (ARF1), einer GTPase, initiiert (Stamnes *et al.*, 1993) und kann durch Brefeldin A-Behandlung, die ARF-GTPasen inaktiviert, inhibiert werden. 2-Adaptin hingegen zeigt bei Inkubation mit Brefeldin A keine Sensitivität in seiner Membranbindungsaktivität. Es wird deshalb angenommen, daß die Rekrutierung von 2-Adaptin zu Membranen durch andere Proteine als ARF-GTPasen erfolgt (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998); diese wurden aber noch nicht identifiziert. Auch kann 2-Adaptin die Funktion von

1-Adaptin in 1-Adaptin-Knock-out-Mäusen nicht übernehmen, sodaß diese Mäuse in einem frühen Embryonalstadium sterben (Zizioli *et al.*, 1999).

Bei Analyse des im Y2H-Test identifizierten cDNA-Klons AD.C1, zeigte sich, daß er Teile der Scharnier- und die Ohrregion von 2-Adaptin kodiert (Abb. 22 C). Da das Fängerprotein BD.L44-108 eine stärkere Interaktion im -Galaktosidase-Test aufwies als BD.L1-70 (Tab. 7, S. 46), liegt der Teil der PräS1-Region, der in die Wechselwirkung mit 2-Adaptin involviert ist, vermutlich im C-terminalen Bereich der PräS1-Domäne.

3.2.9 AD.48P

AD.48P enthält Sequenzen eines hypothetischen Gens von 1730 bp Länge, das durch cDNA-Sequenzierung entdeckt worden ist und erst im Juli 2000 der Genbank des NCBI übermittelt wurde. Es enthält vermutlich einen ORF von bp 217-1059 und wird unter dem Namen PRO1038 geführt. Weder die Existenz eines translatierten Proteins ist nachgewiesen, noch ist dessen Funktion bekannt. Interessanterweise trägt es aber wahrscheinlich eine funktionelle Protein-Kinase-Domäne und ist damit die zweite identifizierte Sequenz in diesem Y2H-Test, die zu einem Gen mit einer Kinase-Domäne gehört. Allerdings kodiert der im Y2H-Test interagierende Klon AD.48P nach bisherigem Kenntnisstand für die untranslatierte Region bp 1134-1730 des hypothetischen Proteins. Sollte sich diese Tatsache durch weitere Erkenntnisse über PRO1038 bestätigen, kann AD.48P als falsch-positiver Klon verworfen werden.

3.2.10 AD.60P: Dolichol-Phosphat-Mannose-Transferase Polypeptid 3

Dolichol-Phosphat-Mannose-Transferase (DPM) ist ein ER-Protein, das Mannose-Reste zur Glykosylierung von Proteinen zur Verfügung stellt. Die humane DMP besteht aus drei Untereinheiten: (1) der katalytisch aktiven Untereinheit DPM1, (2) der regulatorischen Untereinheit DPM2 und (3) DPM3, das für die stabile Expression des Komplexes im ER verantwortlich ist. DPM3 umfaßt 92 AS und ist im DPM-Komplex mit seiner C-terminalen Domäne mit DPM1 und mit seinem N-Terminus mit DPM2 assoziiert (Maeda *et al.*, 2000). Der Klon AD.60P ist homolog mit der AS-Sequenz von DPM3, nur dessen 12 N-terminale AS fehlen. Im Y2H-Test wurde AD.60P mit BD.L44-108 isoliert (Tab. 7, S. 46.), allerdings ist seine Interaktion mit dem Konstrukt BD.L1-70 vergleichbar stark.

3.3 Verifizierung von Protein/L-Protein Interaktionen durch weitere biochemische Methoden

Das Y2H-System ist dafür bekannt, daß es zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Deshalb wurden alle identifizierten Interaktionspartner der PräS1-Domäne zusätzlich mit weiteren unabhängigen Methoden auf ihre Wechselwirkung mit dem L-Protein überprüft. Aufgrund der begrenzten Zeit wurden nur vielversprechende Interaktionspartner weiter untersucht.

Als Quelle für rekombinante PräS1-Polypeptide wurde die AS-Sequenz 1-108 aus dem L-Gen durch Restriktion mit den Endonukleasen BglIII und EcoRI entnommen und in den vorbereiteten Expressionsvektor pQE11 (Qiagen) eingefügt. Dieser war mit HindIII geschnitten, die Restriktionsstelle mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und der Vektor anschließend mit BamHI nachgeschnitten worden. Die Ligation des Insert- mit dem Vektorfragment führte zu dem Plasmid pQE11-L₁₋₁₀₈, in dem N-terminal an die kodierende Region der PräS-Region noch Sequenzen für einen Polyhistidinschwanz angefügt wurden. Die Expression des PräS1-Polypeptids [His]₆-L1-108 unterlag in diesem Konstrukt dem hybriden bakteriellen Tac-Promotor und war durch Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induzierbar. [His]₆-L1-108 wurde durch die Bindung der sechsfachen Histidin-Abfolge (His₆) an Ni-NTA-Agarose affinitätschromatographisch gereinigt und konnte im Western-Blot mit dem -PräS1-Ak MA18/7 gut nachgewiesen werden (Abb. 23).

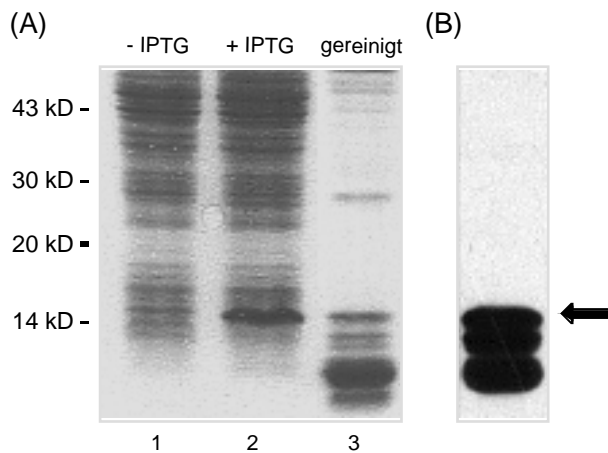


Abb. 23: **Expression und Reinigung von [His]₆-L1-108.** Das Zellysate nicht-induzierter (-) oder IPTG-induzierter (+) Bakterien (Spalten 1 und 2) und die Reinigung von [His]₆-L1-108 durch Bindung an Ni-NTA-Agarose (Spalte 3) sind durch SDS-PAGE dargestellt. Der Pfeil markiert die [His]₆-L1-108-spezifische Bande. (Tieferliegende Banden stellen Abbauprodukte von [His]₆-L1-108 dar). (A) zeigt die Ponceau-Färbung der Nitrozellulose-Membran und (B) die Western-Blot-Analyse mit dem PräS1-spezifischen AK MA18/7. Die Zahlen am rechten Rand der Abb. kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine.

3.3.1 Die H4/PräS1-Interaktion

Im Y2H-Test war der Klon AD.T4 überproportional häufig als Interaktionspartner der PräS1-Domäne isoliert worden. Er kodiert für C-terminale Bereiche von H4 (AS 715-929), einer schweren Kette der ITIH-Familie (3.2.6). Über die Funktionen dieses Bereiches ist bisher wenig bekannt, da der C-Terminus von H4 wenig Ähnlichkeit mit den anderen Mitgliedern der ITIH-Familie aufweist.

3.3.1.1 *In Vitro*-Bindung von PräS1 und H4

Zur Untersuchung einer Bindung an die PräS1-Region *in vitro* wurde nun die H4-cDNA (H4₇₁₅₋₉₂₉) in einen prokaryontischen Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde das H4-Fragment aus dem Y2H-Expressionsvektor AD.T4 (entspricht pACT2.H4₇₁₅₋₉₂₉) durch Restriktion mit der Endonuklease BglIII entnommen. Als Expressionsvektor wurde pGEX.3x (Pharmacia) eingesetzt, der zuvor mit BamHI linearisiert worden war. Nach Ligation des Insert- und des Vektorfragments wurden aus dem neu entstandenen Plasmid zusätzlich mit NheI und BamHI nicht benötigte Sequenzen ausgeschnitten, die aus dem pACT2-Vektor stammten; anschließend wurde das Plasmid erneut religiert. Dies war erforderlich, da die Expressioneffizienz in *E. coli* unter anderem von der Länge des translatierten Polypeptids abhängt. In dem neu konstruierten Plasmid pGEX.3x-H4₇₁₅₋₉₂₉ wurde die Expression durch den IPTG-induzierbaren Tac-Promotor gesteuert. Nach Induktion mit IPTG wurde in *E. coli* das Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsprotein GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ mit einem MW von 50 kD exprimiert, das durch Bindung an Glutathion-Sepharose affinitätschromatographisch gereinigt werden sollte. Es zeigte sich aber, daß das GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ nicht in löslicher Form in den lysierten Bakterienzellen vorlag, sondern in sog. Einschlusskörperchen lokalisiert war, die beim Zentrifugieren zusammen mit dem Zelldebris pelletierten.

Da eine Reinigung des GST.H4₇₁₅₋₉₂₉-Polypeptids folglich auf diese Weise nicht möglich war, wurde ein Overlay-Assay verwendet, um eine *In Vitro*-Bindung zwischen der PräS1-Domäne und GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ nachzuweisen. GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ wurde in *E. coli* exprimiert und die Bakterien nach Zugabe von Laemmli-Puffer unter Kochen aufgeschlossen. Dieser Zellextrakt wurde durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, und die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach Renaturierung der gebundenen Proteine in einem geeigneten Puffer wurde die Membran mit PräS1-Polypeptiden ([His]₆-L1-108) inkubiert. Anschließend wurden spezifisch gebundene PräS1-Polypeptide mit dem -PräS1-Ak MA18/7 detektiert. Es zeigte sich, daß [His]₆-L1-108 spezifisch an rekombinantes GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ bindet, das in einer Bande auf der Höhe von 50 kD lokalisiert ist (Abb. 24 A, Spalte 1).

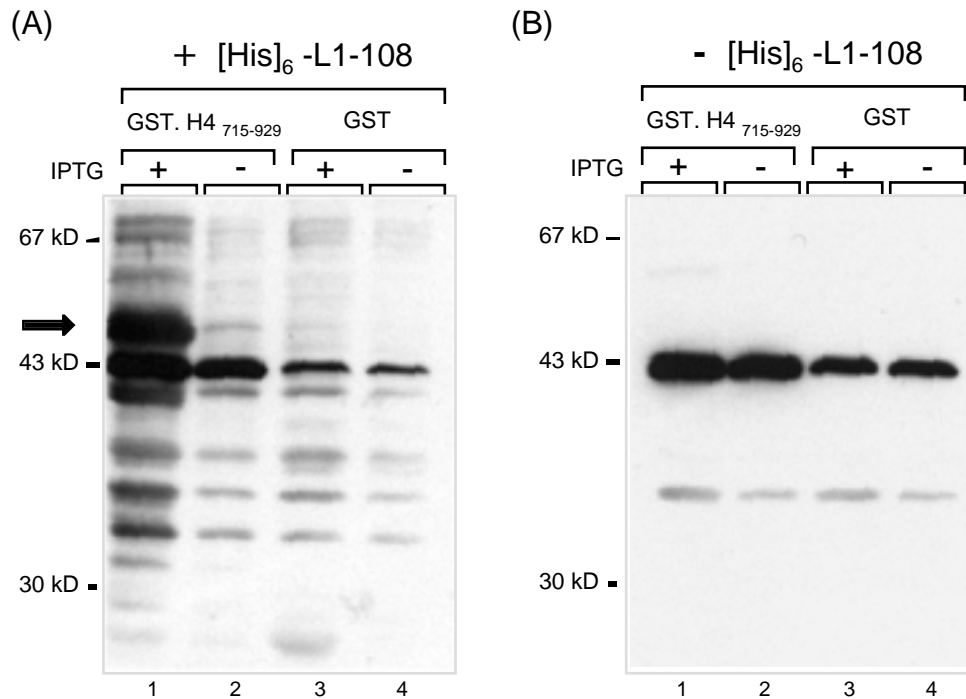


Abb. 24: *In Vitro*-Bindungsstudie zwischen der PräS1-Domäne des L-Proteins und H4₇₁₅₋₉₂₉. Zellextrakte IPTG-induzierter (+) oder nicht-induzierter (-) Bakterien, die entweder GST.H4₇₁₅₋₉₂₉-Fusionsproteine (Spalten 1 und 2) oder GST (Spalten 3 und 4) exprimierten, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und (A) mit [His]₆-L1-108 oder (B) mit PBS als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde gebundenes [His]₆-L1-108 mit dem PräS1-spezifischen Ak MA18/7 nachgewiesen. In (A) Spalte 1 ist die spezifische Bindung von [His]₆-L1-108 an GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ durch die Anfärbung einer Bande in Höhe von 50 kD zu beobachten (→). Neben der spezifischen Bindung zwischen der PräS1-Domäne und dem C-Terminus von H4 sind noch unspezifische Bindungen von [His]₆-L1-108 an verschiedene bakterielle Proteine zu erkennen, die in allen Zellextrakten zu beobachten sind (Spalte 1 bis 4). Die Kontrolle in (B) diente der Überprüfung der unspezifischen Bindung des PräS1-spezifischen Ak MA18/7 an bakterielle Proteine. Dabei zeigte sich, daß MA18/7 an bakterielle Proteine mit Größen von 43 kD und 37 kD unspezifisch assoziierte. Die Zahlen links neben den Bildern kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine.

Als Kontrolle diente der Zellextrakt von Bakterien, die die unfusionierte Gluthation-S-Transferase (GST) mit einem MW von 26 kD exprimierten. Hier war keine Bindung zwischen [His]₆-L1-108 und dem Kontrollprotein GST zu beobachten (Abb. 24 A, Spalte 3). Auch wurde überprüft, ob eine unspezifische Bindung zwischen dem PräS1-spezifischen Ak MA18/7 und Proteinen des Zellextrakts die Anfärbung der Banden verursachte. Dazu wurden Zellextrakte elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine zweite Membran transferiert und renaturiert. Die Inkubation mit PräS1-Polypeptid-Lösung wurde durch Inkubation mit PBS ersetzt. Anschließend wurde der Versuch wie oben beschrieben fortgesetzt. In Abb. 24 B ist zu sehen, daß der PräS1-spezifische Ak ohne die Anwesenheit von [His]₆-L1-108 unspezifisch an zelluläre Proteine mit einem MW von 43 und 36 kD bindet. Die Kontrollen zeigen deutlich, daß das Signal auf der Höhe von 50 kD in Abb. 24 A (Spalte 1) auf einer spezifischen Bindung zwischen GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ und [His]₆-L1-108 beruht.

Da aus Bakterien H4₇₁₅₋₉₂₉ nur in denaturierter Form gewonnen werden konnte, wurde ein *In Vitro*-Translationssystem zur Expression von nativem H4₇₁₅₋₉₂₉ in einem zellfreien System verwendet. Um die C-terminale H4-Sequenz unter die Kontrolle des benötigten Promotors der SP6-RNA-Polymerase zu stellen, wurde diese Sequenz durch SalI und PstI aus dem Plasmid pGEX.3x-H4₇₁₅₋₉₂₉ ausgeschnitten. Der pSP64-Vektor wurde durch die Restriktion mit HindIII und PstI linearisiert und das H4₇₁₅₋₉₂₉-Fragment durch Ligation eingefügt. Anschließend wurden von diesem Konstrukt, pSP64.H4₇₁₅₋₉₂₉, *in vitro* [³⁵S]-markierte Proteine translatiert und ihre Wechselwirkung mit dem L-Protein untersucht. [³⁵S]-markierte L-Proteine wurde durch *In Vitro*-Translation und -Translokation in Mikrosomen hergestellt (Abb. 25 A).

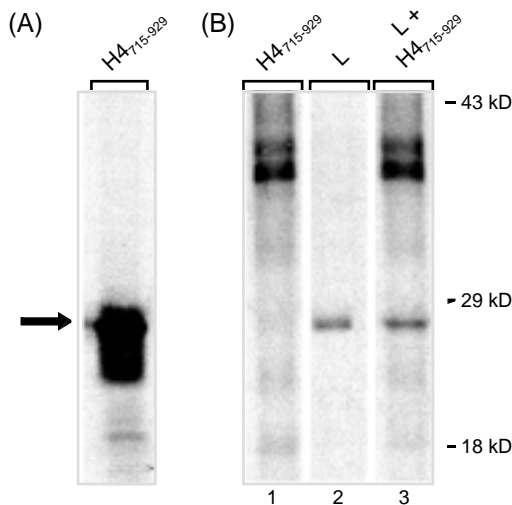


Abb. 25: **Bindungsstudie zwischen *in vitro*-translatiertem H4₇₁₅₋₉₂₉ und L-Protein.** (A) Nachweis von *in vitro*-translatiertem [³⁵S]-markiertem H4₇₁₅₋₉₂₉ durch SDS-PAGE (→). (B) Koimmunpräzipitation von H4₇₁₅₋₉₂₉ und L-Protein: Nach Inkubation von [³⁵S]-markierten H4₇₁₅₋₉₂₉ mit L-beladenen Mikrosomen (L-Proteine waren ebenfalls [³⁵S]-markiert) wurden diese mit Hilfe eines Antiserums, das spezifisch für HBV-Hüllproteine ist, immunpräzipitiert und die Immunkomplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt. In der Abb. sind oberhalb jeder Spalte die jeweils eingesetzten Proteine angegeben. Die Zahlen am rechten Rand der Abb. kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine.

Diese mit L-Proteinen beladenen Mikrosomen wurden mit *in vitro*-translatiertem H4₇₁₅₋₉₂₉ inkubiert und anschließend mit einem polyklonalen K37-Antiserum gegen HBV-Hüllproteine immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden nach elektrophoretischer Auftrennung durch SDS-PAGE autoradiographisch dargestellt. In Abb. 25 A ist *in vitro*-translatiertes H4₇₁₅₋₉₂₉ gezeigt, das eine dem berechneten MW entsprechende elektrophoretische Beweglichkeit von 27 kD aufwies. Das L-Protein zeigte sich nach Immunpräzipitation mit dem K37-Antiserum in seiner typischen Doppelbande bei 39 kD und 42 kD, die die unglykosylierte und glykosylierte Form darstellen (Abb. 25 B, Spalte 1). Leider war bei den Immunpräzipitationsversuchen zu beobachten, daß sich H4₇₁₅₋₉₂₉ ausgeprägt adhäsiv verhielt. Es interagiert mit dem an Sepharose-gekoppelten HBV-Hüllprotein-spezifischen Antiserum (Abb. 25 B, Spalte 2), wobei es Hinweise gab, daß vor allem die Bindung an die Sepharose zur Präzipitation von H4₇₁₅₋₉₂₉ führte. Deshalb konnte auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob H4₇₁₅₋₉₂₉ zusätzlich zu seiner Bindung an den Sepharose-gekoppelten K37-Ak zusammen mit dem L-Protein koimmunpräzipitiert worden war (Abb. 25 B, Spalte 3).

3.3.1.2 Herstellung von polyklonalem Antiserum gegen H4

H4 wurde erst vor kurzem identifiziert, sodaß es nicht möglich war, H4-spezifische Ak zur Detektion käuflich zu erwerben. Deshalb wurden polyklonale Ak gegen den C-Terminus von H4 in Kaninchen generiert. Als Quelle für das Antigen sollten gereinigte, bakteriell hergestellte H4₇₁₅₋₉₂₉-Polypeptide dienen. Das Konstrukt pGEX.3x-H4₇₁₅₋₉₂₉ (3.3.1) wies für diesen Zweck zwei Nachteile auf: (1) Die exprimierten Fusionsproteine waren in Einschlußkörperchen lokalisiert und ließen sich schlecht affinitätschromatographisch reinigen. (2) Sie besaßen einen GST-Anteil, der aufgrund seiner Antigenität im Kaninchen zusätzlich Ak gegen GST generiert, die möglicherweise spätere Untersuchungen stören konnten. Um diese Schwierigkeiten zu vermeiden, wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das für H4₇₁₅₋₉₂₉ mit einem N-terminalen sechsfachen Histidin kodierte. Dazu wurde das H4-Fragment aus pACT2.H4₇₁₅₋₉₂₉ durch Restriktion mit der Endonuklease BglIII entnommen. Als Expressionsvektor wurde pQE11 (Qiagen) eingesetzt, der zuvor mit BamHI linearisiert worden war. Die Ligation des Insert- und des Vektorfragments führte zu dem Plasmid pQE11.H4₇₁₅₋₉₂₉. Ungünstigerweise war bei der Expression des rekombinanten [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ festzustellen, daß es ebenso wie das längere Polypeptid GST.H4₇₁₅₋₉₂₉ in den Bakterienzellen denaturiert in Einschlußkörperchen vorlag. Weder durch Lyse mit SB-Puffer und anschließender Behandlung durch Ultraschall noch durch Aufschluß mit einer "French-Press" konnte es in Lösung überführt werden. Deshalb wurde [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ unter denaturierenden Bedingungen mit einer hohen Harnstoffkonzentration gelöst und durch Bindung an Ni-NTA-Agarose gereinigt (Abb. 26 A).

Dieses denaturierte [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ wurde als Antigen in Kaninchen appliziert und das Serum entnommen. Das polyklonale Serum (-H4-Ak) wurde im Western-Blot getestet und seine Spezifität für die Erkennung von [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ überprüft. In Abb. 26 B ist gezeigt, daß der -H4-Ak den in *E. coli* hergestellten C-Terminus von H4 spezifisch bindet. Die weiteren sichtbaren Banden zeigen Abbauprodukte von [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ und entstehen infolge einer Degradierung durch Proteasen während des Reinigungsprozesses.

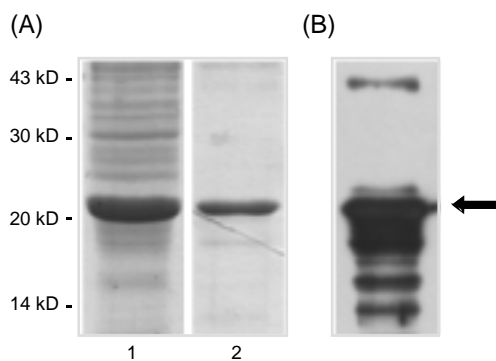


Abb. 26: **Expression und Reinigung von [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉.** (A) Zellysats IPTG-induzierter (+) Bakterien, die [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ exprimieren (Spalte 1), und eluiertes [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ nach Reinigung durch Bindung an Ni-NTA-Agarose (Spalte 2) durch Nachweis der Proteine mit Coomassie-Blau-Färbung. (B) Nachweis von gereinigtem [His]₆-H4₇₁₅₋₉₂₉ (←) mit dem neu generierten -H4-Ak im Western-Blot. Die Zahlen am linken Rand der Abb. kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine.

3.3.1.3 Expression von H4 *in vivo*

Aufgrund seiner kürzlichen Entdeckung ist H4 bisher nicht gut charakterisiert. Deshalb wurde die komplette H4-cDNA im Vektor pBluescriptII-KS⁻.PK120 (Nishimura *et al.*, 1995) C-terminal durch PCR-Mutagenese mit einem HA-Epitop versehen und in einen eukaryontischen Expressionsvektor (pcDNA3.1) kloniert. Nach transienter Transfektion von COS-7-Zellen mit dem Konstrukt pcDNA3.1-H4-HA wurde H4-HA exprimiert, das durch den Einbau von [³⁵S]-Methionin/Cystein radioaktiv markiert war. Die Zellysate und Überstände wurden entweder mit α -H4-Antiserum oder α -HA-Ak immunpräzipitiert und die Ak/Proteinkomplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert. Es war zu beobachten, daß H4 in COS-7-Zellen stabil hergestellt und effizient in den Überstand sezerniert wurde, da es in den Zellysaten nur in geringer Menge detektiert werden konnte (Abb. 27 A/B, Spalten 3 und 4). Das H4-Protein mit einem MW von 120 kD ist mit beiden Antikörpern präzipitierbar. In Abb. 27 A (Spalte 3) ist zusätzlich zu beobachten, daß der α -H4-Ak neben dem vollständigen Protein noch weitere, vermutlich degradierte, Spaltprodukte von H4 erkennt, da diese Banden im Überstand untransfizierter Zellen nicht gefunden werden konnten (Abb. 27 A, Spalte 1).

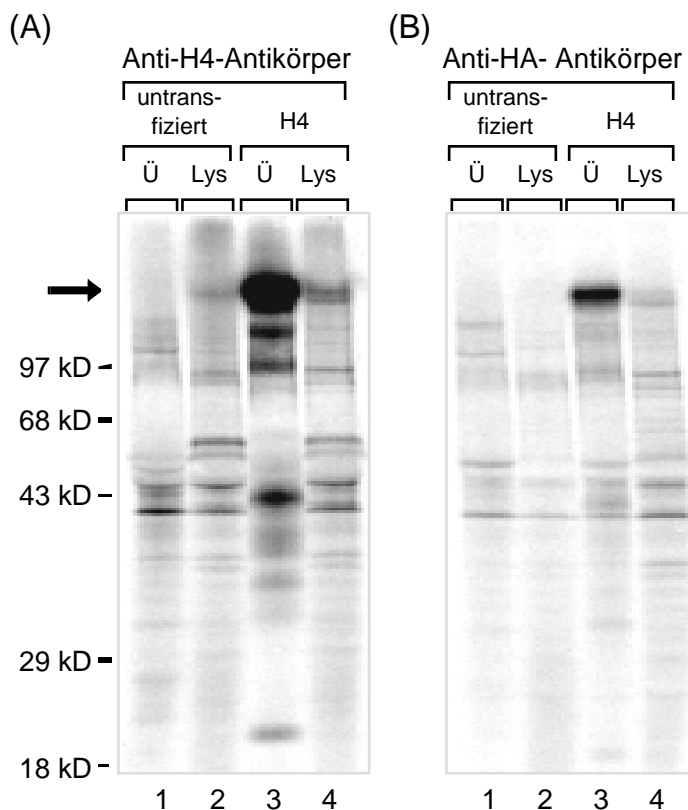


Abb. 27: **Charakterisierung der H4-Expression in transfizierten COS-7-Zellen.** In transient transfizierten COS-7-Zellen wurde H4 mit einem am C-Terminus angefügten HA-Epitop exprimiert, radioaktiv markiert und mit verschiedenen Antikörpern immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert. Es sind jeweils die Überstände (Ü) oder Zellysate (Lys) untransfizierter (Spalten 1 und 2) oder transfizierter (Spalten 3 und 4) Zellen aufgetragen. Die Proteinbande bei 120 kD (➔) stellt das H4-Produkt dar. Die Immunpräzipitation erfolgte (A) mit polyklonalem α -H4-Antiserum oder (B) mit α -HA-Ak. Die Zahlen am linken Rand der Abb. kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine.

3.3.1.4 *In Vitro*-Bindung von PräS1 und H4-HA

Da die Spezifität der *In Vitro*-Bindung der PräS1-Region mit dem C-Terminus der H4-Kette nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, sollte die Untersuchung der *In Vitro*-Interaktion von [His]₆-L1-108 mit H4-HA zur Klärung dieser Frage beitragen. Dazu wurden COS-7-Zellen mit H4-HA transfiziert und der Überstand, in dem sich das sezernierte H4-HA befand, in einem *In Vitro*-Bindungstest mit [His]₆-L1-108 eingesetzt. Die Expression von H4-HA wurde vor Versuchsbeginn durch eine Western-Blot-Analyse mit -HA-Ak überprüft. Als Negativkontrolle ([His]₆-Kontrolle) wurde das E7-Protein von HPV33 verwendet. Zum Nachweis einer Wechselwirkung von H4-HA mit der PräS1-Domäne *in vitro* wurden die PräS1-Polypeptide nach Immobilisation an Ni-NTA-Agarose mit H4-HA-Überstand inkubiert. Die anschließende Western-Blot-Analyse der Eluate mit -HA-Ak zeigte H4-HA sowohl in der Anwesenheit von [His]₆-L1-108 als auch bei Verwendung der [His]₆-Kontrolle. Auch bei Änderung der Wasch- und Pufferbedingungen konnte keine spezifische Bindung zwischen PräS1-Polypeptiden und H4 nachgewiesen werden. Eine möglicherweise spezifische Bindung wurde immer durch die unspezifische Interaktion mit unbeladener Ni-NTA-Agarose bzw. mit an Ni-NTA-Agarose gekoppelten Kontrollproteinen überlagert. (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.5 *In Vivo*-Bindung von L-Protein und H4-HA

Parallel dazu wurde die Interaktion des kompletten L-Proteins und H4 *in vivo* untersucht. Dazu wurden COS-7-Zellen mit pcDNA3.1-H4, pMSV.L und einem Überschuß pMSV.S transfiziert und im Überstand der Zellen die Expression der Proteine nachgewiesen. H4 wurde auch in Anwesenheit von L- und S-Proteinen effektiv sezerniert. L-Proteine, die normalerweise in der Zelle zurückgehalten werden, wurden unter dem Einfluss der S-Proteine als Bestandteil subviraler Partikel in den Überstand abgegeben. Der Nachweise der *In Vivo*-Interaktion erfolgte durch Koimmunpräzipitation des Überstandes mit Ak gegen HBV-Hüllproteine. Zur Fällung der Immunkomplexe waren diese Ak an Protein-G-Sepharose bzw. an Dynabeads (Dyna) gekoppelt. Der Nachweis einer *In Vivo*-Bindung durch Koimmunpräzipitation von Überständen H4, L- und S-Protein exprimierender COS-7-Zellen mittels einem HBV-Hüllprotein-spezifischen Antiserum scheiterte jedoch wiederum an den unspezifischen Bindungseigenschaften von H4. Es konnten auch hier keine Pufferbedingungen ermittelt werden, mit denen die unspezifische Bindung von H4 an Protein-G-Sepharose bzw. an Dynabeads und HBV-Hüllprotein-spezifische Ak eingeschränkt werden konnte.

Die spezifische Bindung zwischen H4 und der PräS1-Domäne des L-Proteins ist bisher nur im Overlay-Assay *in vitro* nachweisbar. Eine weitergehende Analyse der Bindung zwischen dem L-Protein und H4 müßte in Zukunft noch fortgeführt werden.

3.3.2 Die C1r/PräS1-Interaktion

Im Y2H-Test war der Klon AD.G3 als Interaktionspartner der PräS1-Domäne isoliert worden, der für den C-Terminus der Serinprotease C1r kodiert (3.2.4). Diese besteht aus einer A- und B-Kette, wobei die B-Kette das katalytische Zentrum trägt. AD.G3 war mit Bereichen der B-Kette identisch.

3.3.2.1 *In Vitro*-Bindung von PräS1 und C1r

Für die Untersuchung einer Interaktion zwischen C1r und der PräS1-Region des L-Proteins wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zur Herstellung von rekombinanten C1r-Polypeptiden wurde aus dem Y2H-Expressionsvektor AD.G3 (entspricht pACT2.C1r₅₆₀₋₇₀₅) das C1r₅₆₀₋₇₀₅-Fragment durch Restriktion mit BglII entnommen. Als Expressionsvektor wurde pGEX.3x eingesetzt, der mit BamHI linearisiert worden war. Nach Ligation des Insert- und des Vektorfragments wurde das entstandene Plasmid mit NheI und BamHI geschnitten, die Schnittstellen durch das Klenow-Enzym aufgefüllt und das Plasmid religiert. Dies diente der Verringerung der Polylinkersequenzen aus dem Hefevektor pACT2. In dem neu konstruierten Plasmid pGEX.3x-C1r₅₆₀₋₇₀₅ wurde die Expression des C1r₅₆₀₋₇₀₅-GST-Fusionsproteins durch den IPTG-induzierbaren Tac-Promotor gesteuert. Bei Expression von GST.C1r₅₆₀₋₇₀₅ zeigte sich, daß das rekombinante Protein denaturiert in Einschlußkörperchen der Bakterienzellen lokalisiert war. Es war weder durch Lyse mit SB-Puffer und Behandlung durch Ultraschall noch durch Aufschluß mit einer "French-Press" in Lösung zu überführen. Da es folglich nicht für einen direkten *In Vitro*-Bindungstest nicht verwendet werden konnte, wurde in einem Overlay-Assay die Bindung von rekombinanten PräS1-Polypeptiden ([His]₆-L1-108) an GST.C1r₅₆₀₋₇₀₅ untersucht. Dazu wurde der Extrakt GST.C1r₅₆₀₋₇₀₅-exprimierender Bakterienzellen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und die Interaktion zwischen GST.C1r₅₆₀₋₇₀₅ und PräS1-Polypeptiden durch Inkubation mit [His]₆-L1-108 untersucht. Der Nachweis von gebundenem [His]₆-L1-108 erfolgte mit einem -PräS1-Ak. Es war jedoch leider keine spezifische Bindung zwischen GST.C1r₅₆₀₋₇₀₅ und [His]₆-L1-108 im Overlay-Assay zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Da die Größe des Fusionsproteins GST.C1r₅₆₀₋₇₀₅ mögliche Ursache für seine Speicherung in bakteriellen Einschlußkörperchen war, wurde alternativ ein C1r-Polypeptid mit einem Polyhistidinschwanz konstruiert, das sich aus (1) der B-Kette von C1r, (2) einem HPV33-spezifischem L1₁₋₇-Epitop zur immunologischen Detektion und (3) einem C-terminalen sechsfachen Histidin zur Affinitätschromatographie zusammensetzte. Ungünstigerweise war jedoch auch bei Expression von C1r₄₆₄₋₇₀₅-L1₁₋₇-[His]₆ festzustellen, daß es ebenfalls in denaturiertem Zustand in Einschlußkörperchen von Bakterienzellen vorlag.

Alternativ wurde daher C1r verwendet, das aus humanem Serum gereinigt worden war (Gabe des Labors von M. Loos). Zum Nachweis von C1r wurde ein monoklonaler -C1r-Ak eingesetzt, der die B-Kette von C1r erkennt. Bei elektrophoretischer Auftrennung von humanem C1r durch SDS-PAGE teilt es sich unter reduzierenden Bedingungen in seine A- und B-Kette. Der -C1r-Ak detektiert die B-Kette von C1r auf einer Höhe von 33 kD (Abb. 28 A).

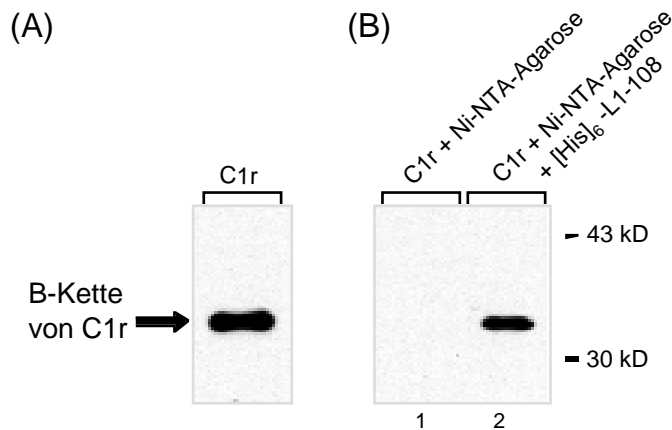


Abb. 28: *In Vitro*-Bindungstest mit [His]₆-Präs1 und C1r.

(A) Darstellung der B-Kette von C1r aus humanem Serum durch SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit C1r-spezifischem Ak. (B) *In Vitro*-Bindungstest: Immobilisiertes [His]₆-L1-108 bzw. Ni-NTA-Agarose (Kontrolle) wurden mit gereinigtem C1r aus humanem Serum inkubiert. Nach Elution mit Imidazol wurden die Eluate im Western-Blot mit -C1r-Ak analysiert. C1r bindet spezifisch an die Präs1-Region des L-Proteins (Spalte 2). Die Zahlen am rechten Rand der Abb. kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine.

Das C1r wurde in einem *In Vitro*-Bindungstest mit Präs1-Polypeptiden ([His]₆-L1-108), die an Affinitätsträger gekoppelt waren, inkubiert und die Eluate nach verschiedenen Waschschritten durch SDS-PAGE mit anschließendem C1r-spezifischen Western-Blot analysiert. C1r zeigt unter speziellen Pufferbedingungen, die denen des Serums ähneln, eine Interaktion mit der Präs1-Domäne des L-Proteins (Abb. 28 B, Spalte 2), während in der Negativkontrolle keine Bindung von C1r an unbeladene Ni-NTA-Agarose nachgewiesen werden konnte (Abb. 28 B, Spalte 1). Zusammenfassend zeigt dieser Versuch eine spezifische *In Vitro*-Bindung zwischen C1r und der Präs1-Domäne des L-Proteins.

Die Infektion von HBV erfolgt durch Blut, Blutprodukte und Körpersekrete. Interessanterweise ist C1r Bestandteil des humanen Serums, sodaß C1r möglicherweise eine Rolle bei der Infektion bzw. der Aufnahme der Virionen in die Leberzelle spielen könnte. Ein weiterer Hinweis zur möglichen Bedeutung von C1r im Infektionszyklus von HBV waren Untersuchungen von Lu *et al.* (1996), die zeigten, daß eine proteolytische Prozessierung des L-Proteins eine mutmaßliche virale Fusionssequenz im N-Terminus der S-Domäne freilegt, die zur Penetration der Virionen beiträgt. Die verantwortliche Protease wurde zwar bisher nicht identifiziert, jedoch könnte die Serinprotease C1r ein möglicher Kandidat sein. Zur Klärung dieser Frage wurde die Interaktion von HBV-Virionen mit C1r in einem ELISA untersucht. Dazu wurde C1r an die Oberfläche der Vertiefungen einer 96-Loch-Platte gekoppelt und mit Virionen inkubiert, die aus dem Blut infizierter Patienten gewonnen worden waren (Gabe des

Labors Gerken, Essen). Der Nachweis der gebundenen Virionen erfolgte mit HRPO-gekoppeltem S-spezifischem Ak (Abbott) und einer HRPO-katalysierten Farbreaktion mit OPD als Substrat. Bisher gelang es allerdings noch nicht mit diesem Ansatz, eine spezifische Bindung zwischen C1r und Virionen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Die L-Protein/ γ 2-Adaptin-Interaktion

2-Adaptin gehört wahrscheinlich zu einem Adaptorkomplex (AP), der für intrazelluläre Membrantransportprozesse verantwortlich ist. Im Y2H-Test wurde die C-terminale Region von 2-Adaptin als Interaktionspartner der PräS1-Domäne identifiziert (3.2.8).

3.3.3.1 *In Vitro*-Bindung der PräS1-Domäne und γ 2-Adaptin

In weiteren Untersuchungen sollte nun geprüft werden, ob diese Interaktion nur auf das Y2H-System beschränkt ist oder ob auch das vollständige 2-Adaptin zur Interaktion mit der PräS1-Domäne fähig ist. Es wurde ein *In Vitro*-Bindungstest entwickelt, um die Wechselwirkung von vollständigem 2-Adaptin mit dem L-Protein zu verifizieren. Zur Überprüfung der Bindungskapazität der PräS1-Region wurde das rekombinante Polypeptid [His]₆-L1-108 (3.3) verwendet. Als Negativkontrolle ([His]₆-Kontrolle) wurde das E7-Protein von HPV33 verwendet, das ebenfalls an seinem N-Terminus einen Polyhistidinschwanz trägt. Zur Überprüfung der Expressions-effizienz wurden die Proteine in *E. coli* synthetisiert, affinitätschromatographisch gereinigt und durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung dargestellt (Abb. 29 A). Beide Proteine wurden effizient in *E. coli* produziert und zeigten im Gel die erwarteten elektrophoretischen Beweglichkeiten, die dem errechneten MW von 14 kD ([His]₆-L1-108) bzw. 12 kD ([His]₆-Kontrolle) entsprachen. Als Quelle für 2-Adaptin oder 1-Adaptin wurden COS-7-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3-HA. 2 oder pcDNA3-HA. 1 transient transfiziert und unter nicht denaturierenden Bedingungen mit CHAPS-HBS-Puffer lysiert. Das am N-Terminus von 2- bzw. 1-Adaptin angefügte HA-Epitop diente der Detektion der Proteine. 1-Adaptin wurde als Kontrolle mitgeführt, obwohl es im Y2H-Test nicht als interagierendes Protein identifiziert worden war. Aufgrund seiner signifikanten Homologie mit 2-Adaptin bestand jedoch die Möglichkeit, daß L-Protein auch mit dieser -Adaptin-Isoform Wechselwirkungen zeigte. COS-7-Zellysate wurden durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot mit -HA-Ak analysiert, um eine Synthese der Proteine nachweisen zu können. In Abb. 29 B ist 2-Adaptin mit seiner erwarteten Bande bei ~ 90 kD (Spur 2) und das 37 AS längere 1-Adaptin bei ~ 100 kD (Spur 3) zu sehen.

Zum Nachweis einer Wechselwirkung von 2-Adaptin mit der PräS1-Domäne *in vitro* wurden die PräS1-Polypeptide nach Immobilisation an Ni-NTA-Agarose mit 2-Adaptin- bzw. 1-Adaptin-Zellysat inkubiert. Die anschließende Western-Blot-

Analyse der Eluate mit γ 2-Adaptin in der Anwesenheit von $[\text{His}]_6$ -L1-108, während bei Verwendung des Kontrollproteins E7 ($[\text{His}]_6$ -Kontrolle) nur ein schwaches Hintergrundsignal sichtbar war (Abb. 29 C, Spalten 3 und 4).

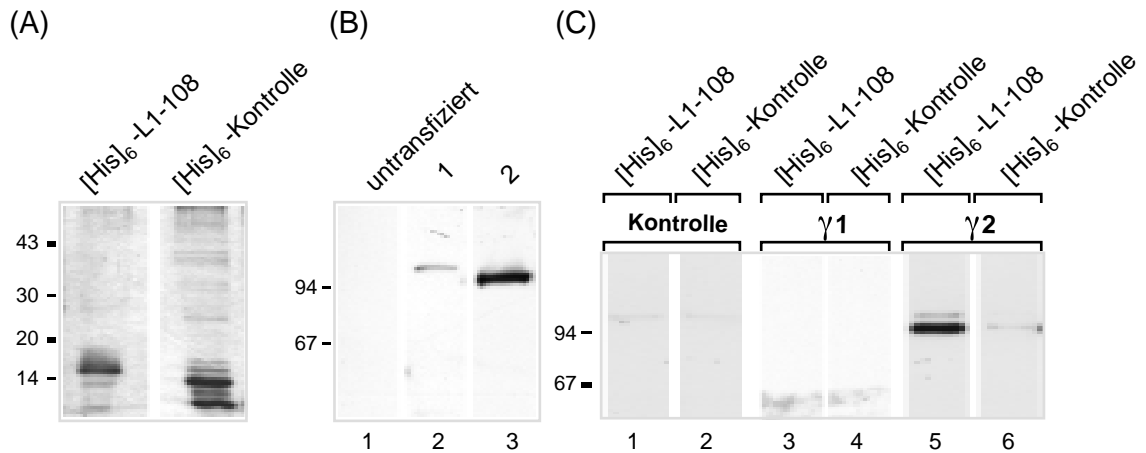


Abb. 29: **In Vitro-Bindungsstudie zwischen der PräS1-Domäne des L-Proteins und γ 2-Adaptin.** (A) Analyse der Expression in *E. coli* und Reinigung von $[\text{His}]_6$ -PräS1 und E7 als $[\text{His}]_6$ -Kontrolle durch SDS-PAGE und Nachweis der Proteine durch Coomassie-Blau-Färbung. (B) Analyse der Lysate von γ 2- bzw. γ 1-Adaptin-transient-transfizierten COS-7-Zellen im SDS-Gel mit anschließendem HA-spezifischem Western-Blot. (C) *In Vitro*-Bindungstest: Immobilisierte PräS1-Polypeptide mit einem Polyhistidinschwanz wurden mit Lysaten untransfizierter Zellen (Kontrolle) oder γ 1- bzw. γ 2-Adaptin-exprimierender Zellen inkubiert. Nach Elution mit Imidazol wurden die Eluate im Western-Blot mit γ 2-Adaptin analysiert. Die Zahlen links neben den einzelnen Bildern kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine in kD.

Wurde statt γ 2-Adaptin-Lysat das Lysat untransfizierter Zellen verwendet, so ließ sich keine Bindung nachweisen (Abb. 29 C, Spalten 1 und 2). Auch bei Verwendung des in seiner Sequenz ähnlichen γ 1-Adaptins konnte keine Interaktion mit der PräS1-Region nachgewiesen werden (Abb. 29 C, Spalten 3 und 4). Zusammenfassend zeigt dieser Versuch eine spezifische *In Vitro*-Bindung zwischen γ 2-Adaptin und der PräS1-Domäne des L-Proteins.

3.3.3.2 *In Vivo*-Bindung von L-Protein und γ 2-Adaptin

Zur Bestätigung dieser Daten (3.3.3.1) wurde mit Hilfe von Koimmunpräzipitationsstudien eine *In Vivo*-Interaktion des kompletten L-Proteins mit γ 2-Adaptin untersucht. Zur besseren Detektion war das L-Protein an seinem C-Terminus gleichfalls mit einem HA-Epitop versehen worden. Es wurden COS-7-Zellen mit γ 2-Adaptin und L-Protein (ko)transfiziert und mit dem milden Detergenz CHAPS in HBS-Puffer lysiert. Da eine Koimmunpräzipitation eine ausreichende Proteinmenge voraussetzt, wurde die effiziente Expression der Proteine vor Versuchsbeginn überprüft. Die COS-7-Lysate wurden mittels ELISA auf eine Expression der HBV-Hüllproteine untersucht. Außerdem wurde durch eine Western-Blot-Analyse mit γ 2-Adaptin die Proteinexpression von γ 2-Adaptin, γ 1-Adaptin und der HBV-Hüllproteine überprüft. Erwartungsgemäß ließ sich, wie oben gezeigt, γ 2-Adaptin bei 90 kD nachweisen (Abb. 30 A, Spalte 1). Das L-Protein zeigte

sich mit seiner typischen Doppelbande bei 39 kD und 42 kD, die seine unglykosylierte und glykosylierte Form repräsentieren (Abb. 30 A, Spalten 2 und 3). Zusätzlich traten in Zellen, die L-Protein exprimierten, noch beide Formen des S-Proteins bei 24 und 27 kD auf, die durch interne Initiation der Translation entstehen (Abb. 30 A, Spalten 2 und 3). Diese beiden Banden sind auch in Zellysaten zu beobachten, die aus Kontrollgründen nur mit dem S-Gen transfiziert wurden (Abb. 30 A, Spalten 4 und 5).

Nach Analyse der Zellysate wurden diese mit polyklonalem K37-Antiserum gegen HBV-Hüllproteine koimmunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden dann mit einem HA-spezifischen Western-Blot analysiert. Dabei konnte ein stabiler Komplex aus L-Protein und γ 2-Adaptin beobachtet werden (Abb. 30 B, Spalte 3). Nur Lysate von COS-7-Zellen, in denen L-Protein und γ 2-Adaptin koexprimiert worden waren, zeigten eine effiziente Koimmunpräzipitation des L-Proteins und γ 2-Adaptin.

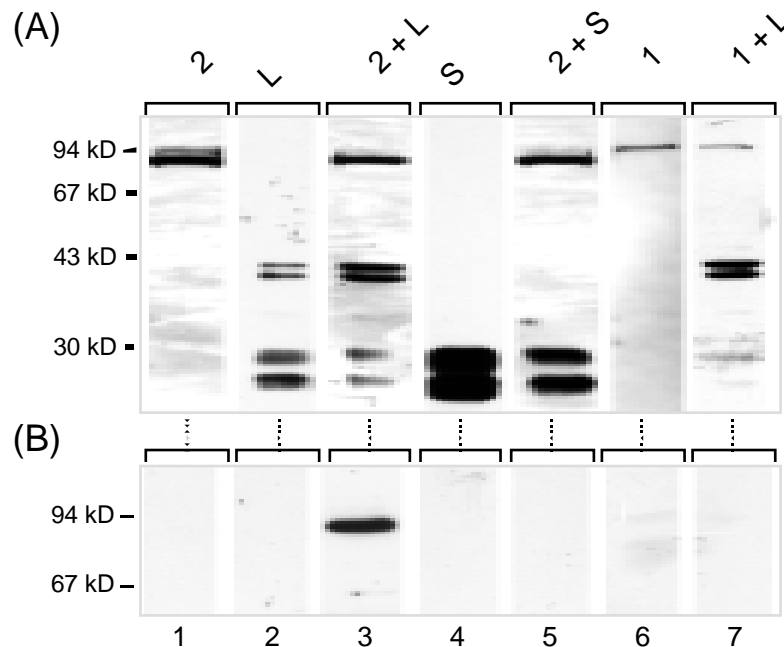


Abb. 30: ***In Vivo*-Interaktion zwischen dem L-Protein und γ 2-Adaptin.** COS-7-Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten (ko)transfiziert. (A) Die stabile Expression der L- und S-Proteine von HBV, γ 2- und γ 1-Adaptin (alle Proteine waren mit einem HA-Epitop versehen) wurde durch SDS-PAGE der Lysate mit anschließendem HA-spezifischen Western-Blot überprüft. (B) Zellysate wurden mit Antiserum, das spezifisch für HBV-Hüllproteine war, immunpräzipitiert und die Immunkomplexe im SDS-Gel und anschließend Western-Blot mit dem monoklonalen γ -HA-Ak analysiert. Die Zahlen am linken Rand der Abb. kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine.

Um eine Interaktion mit dem S-Protein auszuschließen, das bei Transfektion der COS-7-Zellen mit dem L-Gen durch Nutzung eines internen Startkodons entsteht, wurden auch Lysate untersucht, in denen γ 2-Adaptin und das S-Protein koexprimiert wurden. Wie in Abb. 30 B zu sehen ist, war das S-Protein nicht in der Lage, γ 2-Adaptin zu binden (Spalte 5). Auch zeigte sich, ähnlich wie im *In Vitro*-Bindungstest, daß eine Interaktion zwischen L-Protein und γ 1-Adaptin, trotz der signifikanten Ähnlichkeit der

beiden γ -Adaptin-Isoformen, nicht nachweisbar war (Abb. 30 B, Spalte 7). Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß γ 2-Adaptin und das L-Protein *in vivo* spezifisch miteinander interagieren.

3.3.3.3 Intrazelluläre Lokalisation von L-Protein und γ 2-Adaptin

Neben dem Nachweis einer Interaktion des L-Proteins und γ 2-Adaptin war es auch wichtig, die physiologische Relevanz dieser Wechselwirkung zu klären. Dazu wurde die intrazelluläre Lokalisation der beiden Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz verglichen. Das L-Wildtyp-Gen (d.h. ohne HA-Markierung) und γ 2-Adaptin, versehen mit einem HA-Epitop, wurden einzeln oder zusammen in COS-7-Zellen transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit γ -L- oder γ -HA-spezifischem Ak markiert. L-Protein wurde mit einem sekundären Ak, gekoppelt mit rotem Fluoreszenzfarbstoff, und γ 2-Adaptin mit einem sekundären Ak, gekoppelt mit grünen Fluoreszenzfarbstoff, gefärbt. Im Einklang mit früheren Veröffentlichungen (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998) zeigte γ 2-Adaptin eine Färbung in Vesikeln, die perinukleären Golgi-ähnlichen Strukturen entsprechen (Abb. 31 A, S. 69). Im Gegensatz dazu ist das L-Protein in einer punktförmigen Struktur im Golgi-Komplex lokalisiert (Abb. 31 B, S. 69), wie durch Doppelfärbung mit einem cis-medialen Golgi-Marker bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise veränderte sich die zelluläre Lokalisation von γ 2-Adaptin nach einer Kotransfektion zusammen mit L-Protein in COS-7-Zellen. γ 2-Adaptin befand sich nun ebenfalls in der L-Protein-spezifischen punktförmigen Struktur. Große Anteile von γ 2-Adaptin zeigten mit L-Proteinen eine auffallende Kolo-kalisation, wie durch Doppelfärbung sichtbar ist (Abb. 31 C, Spalte 3, S. 69).

Zur Untersuchung der Lokalisation von γ 2-Adaptin in humanen Leberzellen wurde die humane Hepatomzelllinie HUH-7 verwendet. Für den Nachweis von γ 2-Adaptin wurde ein polyklonales Antiserum in Kaninchen gegen den C-Terminus von γ 2-Adaptin (AS 803-822) hergestellt; allerdings ließ sich damit endogenes γ 2-Adaptin von HUH-7-Zellen nicht in Immunfluoreszenzfärbungen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration in HUH-7-Zellen lag wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze. In transient transfizierten HUH-7-Zellen, die γ 2-Adaptin exprimierten, ließ sich das externe γ 2-Adaptin sehr gut nachweisen und zeigte eine ähnliche Lokalisation wie in COS7-Zellen (Abb. 32 A, S. 70). Auch das exprimierte L-Protein in HUH-7-Zellen war in ähnlichen zellulären Strukturen lokalisiert wie in COS7-Zellen, wenn auch die punktförmige Anordnung in cis-Golgi-Strukturen nicht ganz so eindeutig ausfiel. Es ordnete sich in punkt- oder sichelförmiger Form an (Abb. 32 B, S. 70). Bei einer Doppelfärbung von L-Protein und γ 2-Adaptin in kotransfizierten Zellen war aber ebenfalls die Rekrutierung von γ 2-Adaptin durch das L-Protein zu dessen Aufenthaltsort in der Zelle zu beobachten (Abb. 32 C, S. 70). Das L-Protein ist offenbar dafür verantwortlich, daß

γ 2-Adaptin zu seinem spezifischen Aufenthaltsort rekrutiert wird, so daß vermutet werden kann, daß die L-Protein/ γ 2-Adaptin-Interaktion eine funktionell wichtige Rolle spielt.

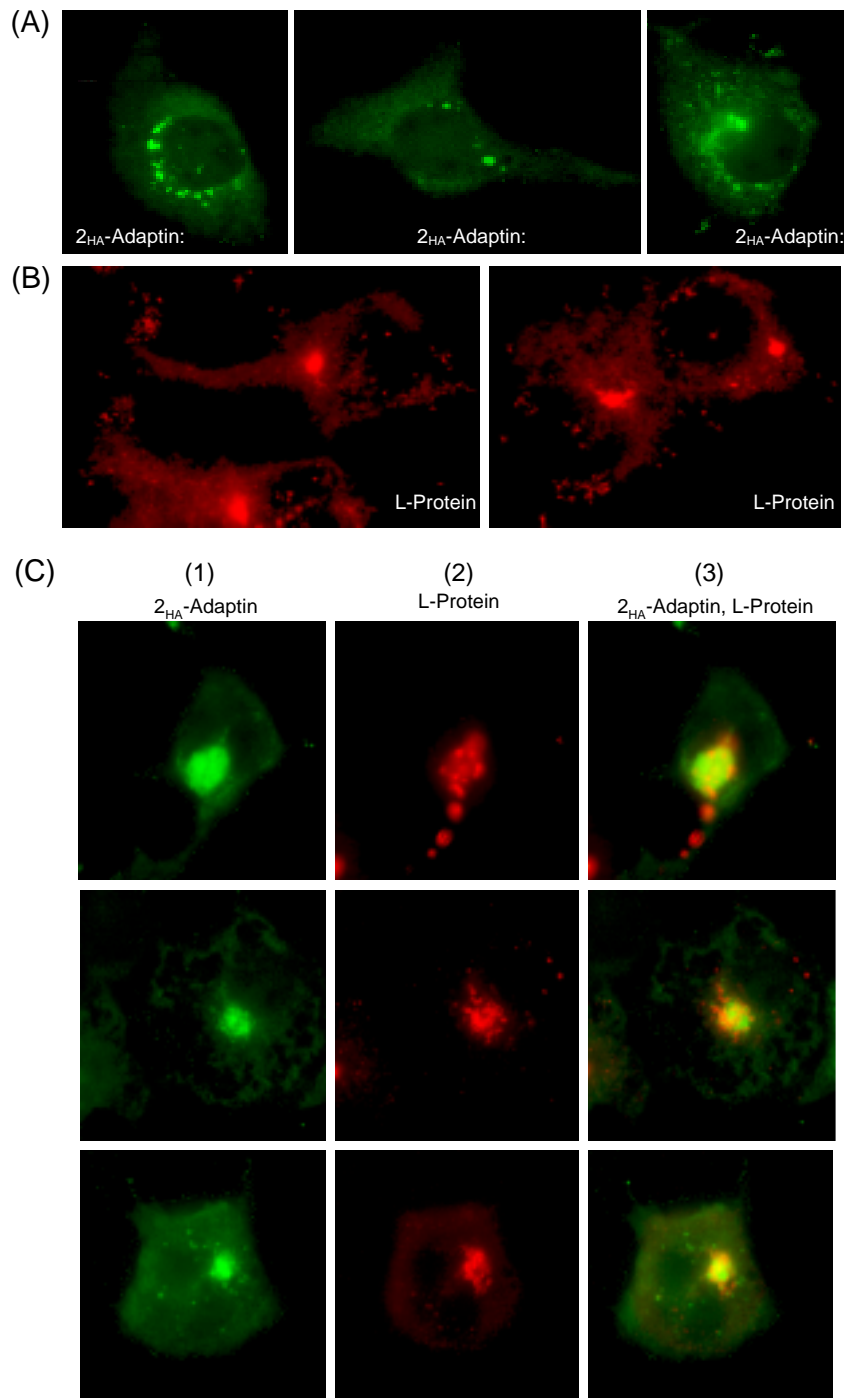


Abb. 31: **Kolokalisation von L-Proteinen und γ 2-Adaptin in COS7-Zellen.** Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von COS-7-Zellen, die (A) γ 2-Adaptin (mit HA-Epitop), (B) L-Protein oder (C) beide Proteine exprimieren. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit γ 2-HA-Ak (A; 2. Ak markiert mit DTAF), γ 2-L-Ak (B; 2. Ak markiert mit Rhodamin) oder mit beiden Ak zusammen gefärbt (C). In (C) ist die Färbung von γ 2-Adaptin in Spalte 1 und des L-Proteins in Spalte 2 zu sehen; Spalte 3 zeigt eine Überlagerung, wobei Punkte, die sowohl grün als auch rot gefärbt sind, gelb erscheinen.

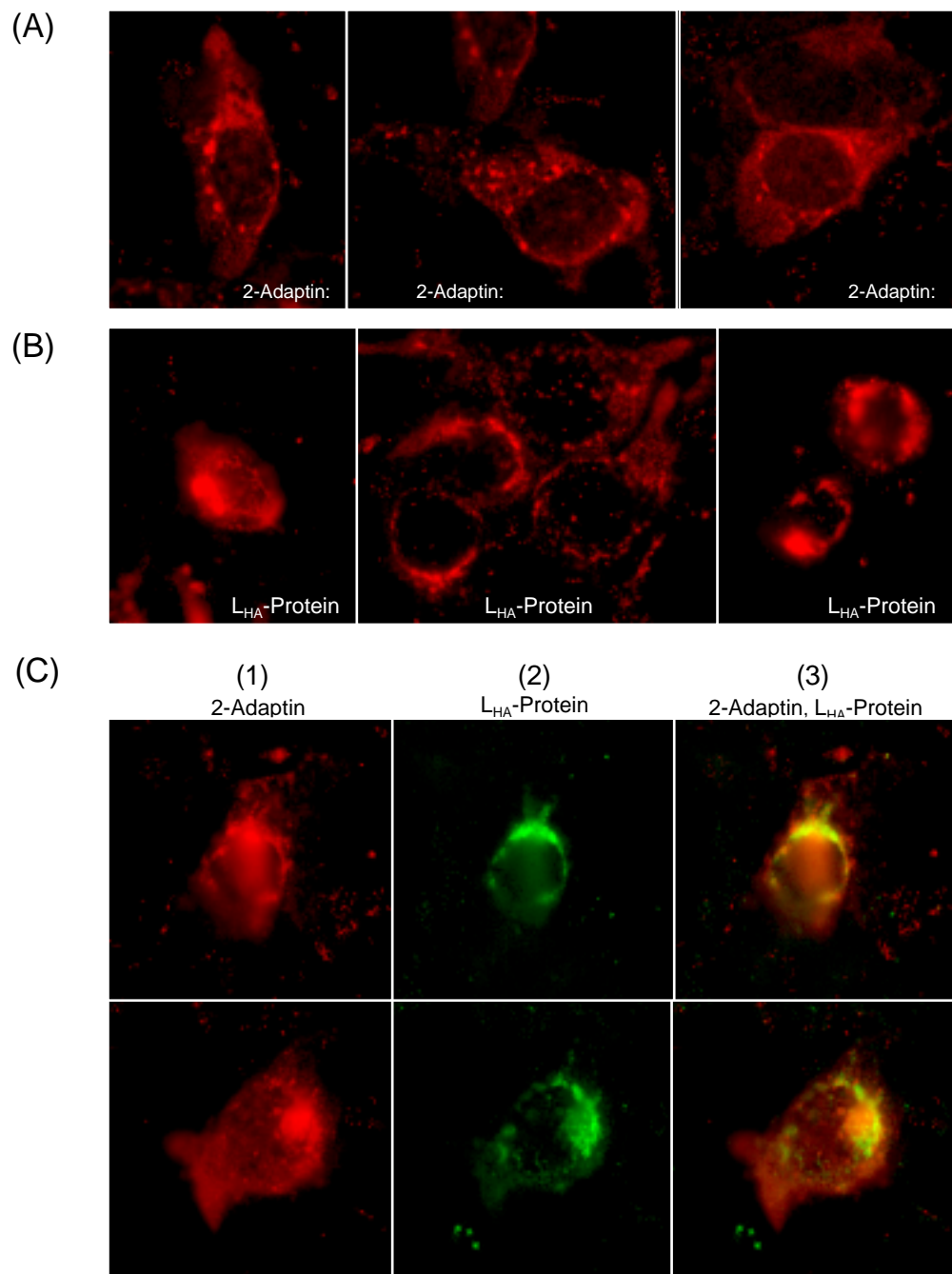


Abb. 32: **Kolokalisation von L-Proteinen und γ 2-Adaptin in HUH-7-Zellen.** Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von HUH-7-Zellen, die (A) 2-Adaptin (mit HA-Epitop), (B) L-Protein oder (C) beide Proteine exprimieren. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit - 2-Adaptin-Ak (2. AK markiert mit Rhodamin) (A), -L-Ak (2. AK markiert mit Rhodamin) (B) oder mit - 2-Adaptin-Ak und -HA-Ak gegen L_{HA} zusammen gefärbt (C). In (C) ist die Färbung von 2-Adaptin in Spalte 1 (2. AK mit Rhodamin markiert) und des L-Proteins (2. AK mit DTAF markiert) in Spalte 2 zu sehen; Spalte 3 zeigt eine Überlagerung, wobei Punkte, die sowohl grün als auch rot gefärbt sind, gelb erscheinen.

3.3.3.4 Die L-Protein/ γ 2-Adaptin-Interaktion beruht auf der zytosolisch ausgerichteten PräS-Domäne des L-Proteins

Adaptorkomplexe sind dafür bekannt, daß sie Signalsequenzen erkennen, die in den zytosolischen Domänen der Transmembranproteine liegen, die als Frachtmoleküle in die Transportvesikel eingeschlossen werden sollen. Dies ließ vermuten, daß γ 2-Adaptin bei seiner Interaktion mit dem L-Protein vor allem dessen zytosolisch ausgerichtete PräS1-Domäne erkennt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine L-Protein-Mutante verwendet, deren PräS1-Domäne sich ausschließlich im Lumen des ER befindet. Eine solche Mutante muß an ihrem N-Terminus eine heterologe Signalsequenz tragen, die eine kotranslationale Translokation der PräS-Region herbeiführt (Bruss *et al.*, 1995; Gallina *et al.*, 1995). Bei der hier verwendeten Mutante Ile-9::L induzierte die Signalsequenz von Interleukin-9 die einheitlich luminal Ausrichtung der PräS-Domäne, die mit der N-Glykosylierung *de novo* an zwei potentiellen Glykosylierungsstellen in der PräS-Region verbunden war. In Abweichung vom L-Wildtyp-Protein wies daher die Ile-9::L-Mutante neben der unglykosylierten auch eine einfach-, zweifach und dreifachglykosylierte Form auf, wie durch enzymatische Deglykosylierung mittels PNGase F gezeigt werden konnte (Abb. 33 A).

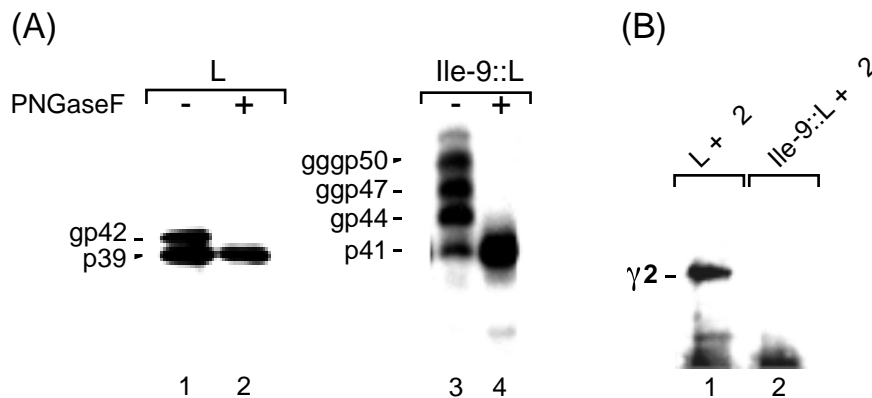


Abb. 33: **L-Protein-Mutante mit einheitlicher luminaler Ausrichtung der PräS1-Domäne kann γ 2 Adaptin nicht binden.** Synthese, N-Glykosylierung und γ 2-Adaptin-bindende Eigenschaften von L-Wildtyp-Protein oder der Mutante Ile-9::L in transfizierten COS-7-Zellen. (A) Für die Analyse der N-Glykane wurden die Lysate von L- oder Ile-9::L-transfizierten Zellen geteilt und entweder direkt (-) oder nach Behandlung mit PNGaseF (+) durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit dem Hüllprotein-spezifischen Ak H166 untersucht. Nichtglykosylierte (p) und glykosylierte (gp, ggp, gggp) Formen des L-Wildtyp-Proteins oder der L-Protein-Mutante sind jeweils links neben den Bildern gekennzeichnet. (B) Die Analyse der Koimmunpräzipitation wurde wie in Abb. 30 (B) beschrieben durchgeführt.

Untersuchte man durch Koimmunpräzipitation die Interaktion zwischen Ile-9::L und γ 2-Adaptin in kotransfizierten COS-7-Zellen, so konnte festgestellt werden, daß Ile-9::L, im Gegensatz zum L-Wildtyp-Protein, γ 2-Adaptin nicht präzipitieren kann (Abb. 33 B). Um auszuschließen, daß die vierfache Glykosylierung des L-Proteins im Ile-9::L-Konstrukt eine sterische Behinderung der γ 2-Adaptin/Ile-9::L-Interaktion darstellt, wurde das Experiment wiederholt und die Glykosylierung von Ile-9::L durch

Tunicamycin-Behandlung der Zellen verhindert. Dabei zeigte sich eindeutig, daß auch unglykosyliertes Ile-9::L nicht in der Lage ist $\gamma 2$ -Adaptin zu binden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die L-Protein/ $\gamma 2$ -Adaptin-Interaktion in zytosolischer Umgebung stattfindet.

3.3.3.5 Kartierung der Bindungsdomäne von $\gamma 2$ -Adaptin, die für die Interaktion mit dem L-Protein notwendig ist

Zur genaueren Aufklärung der Interaktion zwischen dem L-Protein und $\gamma 2$ -Adaptin wurde die Region von $\gamma 2$ -Adaptin identifiziert, die mit dem L-Protein interagiert. Als potentielle Sequenzen für die Bindungsdomäne galten die Ohr- bzw. die Scharnierregion, da dieser Bereich in den Klonen kodiert war, die im Y2H-Test isoliert worden waren (3.2.8). Entsprechend dieser Hypothese wurden zwei C-terminale Deletionsmutanten von $\gamma 2$ -Adaptin konstruiert. Der Mutante $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ fehlt die Ohrregion, der Mutante $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ fehlten neben der Ohrdomäne zusätzlich Bereiche der Scharnierregion. Beide Mutanten tragen ebenfalls das N-terminale HA-Epitop. In transient transfizierten Zellen konnten beide Proteine stabil exprimiert werden. Die Mutanten $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ wiesen im SDS-Gel eine elektrophoretische Beweglichkeit entsprechend ihrem errechneten MW von 68 kD bzw. 57 kD auf (Abb. 34 A).

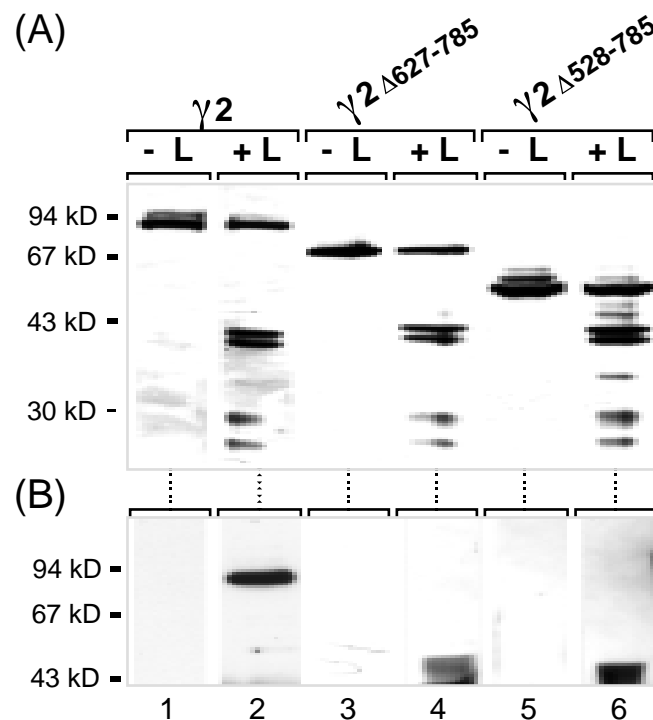


Abb. 34: **C-terminal verkürztes $\gamma 2$ -Adaptin kann L-Protein nicht binden.** (A) Stabile (Ko)Expression von $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtyp oder C-terminal deletierten $\gamma 2$ -Adaptin-Mutanten und L-Protein (alle Proteine mit HA-Epitop) in COS-7-Zellen wurde durch einen HA-spezifischen Western-Blot nachgewiesen. (B) Die Analyse der Koimmunpräzipitation wurde wie in Abb. 30 B durchgeführt. Die Zahlen am linken Rand der Abb. kennzeichnen die Positionen der mitgeführten Markerproteine. Anzumerken ist, daß die schwarzen Flecken in der 43 kD Region in den Spalten 4 und 6 von immunpräzipitiertem L-Protein stammten, das mit einem HA-Epitop versehen ist.

Es wurden wieder Koimmunpräzitationsversuche durchgeführt, die zeigten, daß im Gegensatz zu L-Wildtyp-Protein, bereits bei der weniger stark verkürzten Mutante 2⁶²⁷⁻⁷⁸⁵ keine Wechselwirkung mit dem L-Protein stattfand. Die Mutante 2⁵²⁸⁻⁷⁸⁵ interagiert ebenfalls nicht mehr mit dem L-Protein (Abb. 34 C). Daraus folgt, daß vermutlich die Ohrdomäne von 2-Adaptin als spezifischer Ligand für das L-Protein dient.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß 2-Adaptin spezifisch mit dem L-Protein *in vitro* und *in vivo* interagiert. Verantwortlich für diese Wechselwirkung sind wahrscheinlich die PräS1-Region des L-Proteins sowie die Ohrdomäne von 2-Adaptin. Die gezeigte Interaktion führt zu einer zellulären Kolokalisation von L-Protein und 2-Adaptin in einer punktförmigen Struktur im Golgi-Komplex, wobei vermutlich das L-Protein für die Rekrutierung von 2-Adaptin in dieses Kompartiment verantwortlich ist.

4 Diskussion

Im Vergleich der drei viralen Hüllproteine von HBV übernimmt das L-Protein im viralen Lebenszyklus das größte Spektrum konstruktiver und regulatorischer Aufgaben. Seine PräS1-Region, die weder das M- noch das S-Protein besitzen, verleiht dem L-Protein seine charakteristischen Fähigkeiten. Die Multifunktionalität des L-Proteins beruht auf seiner ungewöhnlichen dualen Topologie, bei der die N-terminale PräS-Sequenz der Hälfte der Proteine auf der zytosolischen Seite (auf der Innenseite des Virus; i-PräS) und bei der anderen Hälfte auf der luminalen Seite der (Post)-ER-Membran (auf der Außenseite des Virus; e-PräS) lokalisiert ist. Die verschiedenen Funktionen des L-Proteins sind vor allem in dessen PräS-Region kodiert und beruhen auf einem engen Zusammenspiel mit Wirtszellfaktoren. Ziel dieser Untersuchung war die Identifizierung zellulärer Interaktionspartner des L-Proteins, um die Kenntnisse über den viralen Infektionszyklus von HBV zu vertiefen.

Als Methode wurde das Y2H-System gewählt, welches ein leistungsfähiges Werkzeug darstellt, um bisher unbekannt Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu identifizieren. Mit der Y2H-Technik war es möglich, eine cDNA-Bank nach Interaktionspartnern eines Fängerproteins zu durchsuchen. Als Fängerprotein wurde die PräS1-Domäne des L-Proteins eingesetzt, da in ihr wichtige Funktionen des L-Proteins kodiert liegen. Als Quelle für zelluläre Proteine wurde eine humane Leberzell-cDNA-Bank verwendet, um neben ubiquitär exprimierten Proteinen insbesondere leberspezifische Proteine auf ihre Wechselwirkung mit der PräS1-Domäne zu untersuchen. Die Entscheidung, eine Hepatozyten-cDNA-Bank zu verwenden, begründete sich in der Tatsache, daß HBV vor allem humane Hepatozyten infiziert und somit spezifische Proteine von Leberzellen in den Infektions- und Replikationszyklus von HBV involviert sind. Da das Y2H-System relativ komplex ist, besteht die Notwendigkeit, die mit dieser Methode erzielten Daten differenziert zu betrachten:

- (1) Das Y2H-System identifiziert sehr sensitiv Wechselwirkungen zwischen Proteinen, die teilweise nicht mit anderen Methoden detektiert werden können. So wurde beispielsweise die Interaktion zwischen dem Ras-Protein und der Proteinkinase Raf im Y2H-Test beobachtet; es war aber nicht möglich diese durch Koimmunpräzipitation nachzuweisen (Van Aelst *et al.*, 1993).
- (2) Andererseits muß den im Y2H-Test gezeigten Wechselwirkungen zwischen Fängerprotein und cDNA-kodiertem Protein nicht notwendigerweise eine *In vivo*-Interaktion zugrunde liegen. Möglicherweise kommen die beiden Partner nie in demselben Zellkompartiment bzw. während desselben Entwicklungs- oder Zellzyklus-Stadiums vor. Ebenso ist es möglich, daß in den Hybridproteinen AS-Sequenzen zugänglich sind, die normalerweise nicht an der Oberfläche des

nativen Proteins liegen. Deshalb muß die Interaktion durch zusätzliche biologische oder biochemische Methoden verifiziert werden.

- (3) Das Y2H-System ist auf Proteine begrenzt, die in den Kern importiert werden können, so daß komplette Transmembranproteine nicht untersucht werden können. Lediglich die Interaktion von zytosolischen oder luminalen Domänen von Transmembranproteinen können analysiert werden. Ebenso kritisch ist die Untersuchung von extrazellulären Proteinen oder von Bindungspartnern, deren Interaktion auf posttranslationalen Modifikationen beruht, die in Hefezellen nicht vorkommen.

Aus den oben genannten Punkten ist ersichtlich, daß das Y2H-System zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Für den weiteren Ablauf der Untersuchungen war es notwendig, falsch-positive Interaktionspartner auszuschließen oder zumindest nur aussichtsreiche Interaktionspartner in den folgenden, meist aufwendigen, biochemischen Interaktionstests zu überprüfen. Ein Vergleich von falsch-positiven Interaktionspartnern des Y2H-Test im Rahmen einer Studie, die die Ergebnisse von ca. 100 Y2H-Tests analysierte, zeigte, daß häufig die gleichen Proteine, unabhängig von den eingesetzten Fängerproteinen, als falsch-positive Interaktionspartner identifiziert wurden (Golemis, 1996). Vor allem Ferritin, Ubiquitin, ribosomale Elongationsfaktoren und mitochondriale Proteine gehörten neben Chaperonen zur Gruppe der falsch-positiven Interaktionspartner. Teilweise kann das häufige Auftreten als falsch-positiver Interaktionspartner durch die physiologische Rolle des entsprechenden Proteins begründet werden. So ist es die Aufgabe von Chaperonen, bei der Faltung anderer Proteine zu assistieren oder von Ubiquitin durch Bindung an Proteine, diese für den Abbauweg zu markieren. Dadurch ist es wahrscheinlich, daß die genannten Proteine unspezifisch mit verschiedenen Proteinen interagieren. Andere falsch-positive Interaktionspartner lassen sich auf diese Weise nicht erklären, und die Ursache ihres Auftretens bleibt rätselhaft.

Zu den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartnern der PräS1-Domäne zählten ebenso drei mitochondriale Proteine (Tab. 6, S. 44 und Tab. 7, S. 46), von denen anzunehmen ist, daß sie aufgrund ihrer Lokalisation im Mitochondrium nicht mit dem L-Protein in Kontakt kommen; deshalb wurden sie als falsch-positive Interaktionspartner verworfen.

Ribosomale Proteine besitzen aufgrund ihrer Funktion die Fähigkeit, mit anderen Proteinen zu interagieren, da während der Translation Wechselwirkungen zwischen den neu produzierten Proteinen und dem ribosomalen Proteinkomplex stattfinden. Sie werden bei Identifikation im Y2H-System meist als falsch-positiv verworfen, weil die Interaktion eher unspezifisch erfolgt. Bei Verwendung der PräS1-Konstrukte BD.L1-70 und BD.L44-108 im Y2H-Test als Fängerprotein wurde der Elongationsfaktor 2 (EF2), ein ribosomales Protein, als Interaktionspartner der PräS1-Domäne identifiziert. Er wird

für die Translokation der neu synthetisierten AS-Sequenz innerhalb des Ribosoms benötigt. Aufgrund der Tatsache, daß ribosomale Proteine eine naturgegebene Affinität zu Proteinen besitzen, besteht die Möglichkeit, EF2 als falsch-positiven Interaktionspartner zu verwerfen. Andererseits konnten Cimarelli *et al.* (1999) für das humane Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) nachweisen, daß der humane Elongationsfaktor 1- (EF1-), der während der Proteintranslation für die Bereitstellung der Aminoacyl-tRNA zuständig ist, an das unprozessierte Gag-Vorläuferprotein von HIV-1 bindet. Sowohl in der Matrixprotein- als auch in der Nukleokapsidproteindomäne des Gag-Vorläuferproteins ebenso wie nach dessen Spaltung im reifen Matrix- und Nukleokapsidprotein ist eine Bindungsstelle für EF1- lokalisiert. Die Bindung an EF1- wird durch (virale) mRNA vermittelt und führt zu einer Inhibition der Translation dieser mRNA. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion liegt möglicherweise in der Freigabe der viralen mRNA aus dem Translationskomplex, so daß sie in das Nukleokapsid von HIV-1 eingeschlossen werden kann. Cimarelli *et al.* (1999) stellen die Hypothese auf, daß andere Retroviren einen vergleichbaren Mechanismus unter Einbeziehung von Faktoren des zellulären Translationskomplexes entwickelt haben könnten, um ein ähnliches Ziel zu erreichen.

Neben falsch-positiven Ergebnissen besteht auch die Möglichkeit, daß aus dem Y2H-System falsch-negative Ergebnisse resultieren, d.h. bekannte Interaktionen zwischen Proteinen können nicht detektiert werden. So war es z.B. nicht möglich, die in Zellen beobachtete Interaktion zwischen der mittleren Kette μ 1-Adaptin und der schweren Kette ϵ 1-Adaptin des Adaptorkomplexes AP-1 in einem Y2H-Test nachzuweisen (Page *et al.*, 1995). Dies kann unterschiedliche Gründe haben, wie die Toxizität des Hybridproteins, die unkorrekte Faltung des Proteins, eine instabile Expression des Proteins, ein fehlerhafter Kernimport und die möglicherweise fehlenden Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Disulfidbrücken.

In früheren Untersuchungen wurde das zelluläre Chaperon Hsc70 als Interaktionspartner der zytosolischen Verankerungsdomäne der PräS1-Domäne (AS 70-94) des L-Proteins identifiziert (Löffler-Mary *et al.*, 1997). Es gehört zur Hsp70-Familie, deren Aufgabe vielfältige Chaperonfunktionen wie die Faltung neu synthetisierter Proteine, die Beteiligung am Ab- und Aufbau oligomerer Komplexe und die Mitwirkung an Membrantransportprozessen umfaßt (Übersicht in Bukau *et al.*, 1998). Es wird angenommen, daß das Chaperon Hsc70 aufgrund seiner Fähigkeit, bei der Faltung und Entfaltung anderer Proteine zu assistieren, die kotranslationale Translokation des L-Proteins durch Bindung an die PräS1-Domäne verhindert. Dadurch wird diese Region in einem ungefalteten Zustand fixiert und daran anschließend eine zeitverzögerte posttranslationale Translokation ermöglicht (Löffler-Mary *et al.*, 1997; Prange *et al.*, 1999).

Da Hsc70 mit der zytosolischen Verankerungsdomäne der PräS1-Region (AS 70-94) interagiert, war zu erwarten, daß keiner der im Y2H-Test mit dem N-terminalen PräS1-Fängerprotein BD.L1-70 interagierenden cDNA-Klone dem Protein Hsc70 homolog war. Allerdings wurde Hsc70 ebensowenig mit dem C-terminalen PräS1-Fängerprotein BD.L44-108 identifiziert. Die Abwesenheit von Hsc70-cDNA in der Hepatozyten-Genbank als Grund für diesen Befund kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, da die Qualität der Genbank hinreichend untersucht worden war. Bei dieser Überprüfung wurden z.B. verschiedene konstitutiv exprimierte Proteine, wie Actin, auf ihre repräsentative Vertretung in der Genbank untersucht. Das Ergebnis, daß Hsc70 im Y2H-System nicht als Interaktionspartner der PräS1-Domäne identifiziert werden konnte, ist deshalb wahrscheinlich die Folge eines falsch-negativen Resultats dieses Systems.

Ziel der Arbeit war die Identifizierung zellulärer Interaktionspartner der PräS1-Domäne des L-Proteins. Deshalb wurde die vollständige PräS1-Domäne an die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Bemerkenswerterweise aktivierte dieses Konstrukt auch ohne ein interagierendes Hybridprotein mit einer Aktivierungsdomäne die Reportergenexpression. In einigen Fällen spiegelt diese autonome Aktivierung des Reportergens durch das Fängerprotein dessen transaktivierende Fähigkeit wieder. Allerdings ist es ebenso möglich, daß auch zufällige AS-Folgen oder einzelne Proteindomänen eine Aktivierung der Transkription durch bisher ungeklärte Ursachen bewirken (Ma *et al.*, 1987). Die autonome Aktivierung im Y2H-System durch die PräS1-Domäne ist vermutlich auf deren transaktivierende Eigenschaften zurückzuführen, wie dies von Kim *et al.* (1997) beschrieben wurde. Sie zeigten, daß die PräS1-Domäne sowohl in Hefezellen als auch in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 universelle transkriptionelle Aktivatorfunktion besitzt.

Die transkriptionelle Transaktivierung durch i-PräS spielt bei der im Y2H-System beobachteten direkten Aktivierung keine Rolle, denn sie findet auf einem indirekten Weg durch Bindung der PräS-Domäne an die Protein-Kinase-C statt und bewirkt über eine c-Ras-1/MAP2-Kinasekaskade eine Signaltransduktion in den Kern. Dort werden im Anschluß zelluläre Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NF- κ B, aktiviert (Hildt *et al.*, 1996; Hildt *et al.*, 1998; Rothmann *et al.*, 1998). Es war nicht möglich, die AS-Sequenz eindeutig zu identifizieren, die für die autonome Aktivierung im Y2H-System verantwortlich war. Die Konstrukte BD.L1-108, BD.L1-44,70-108 und BD.L1-62,95-108 aktivierten die Reportergenexpression unabhängig, während die Fängerproteine BD.L1-70, BD.L1-62 und BD.L44-108 keine autonome Transaktivierung aufwiesen (siehe Abb. 10, S.39). Bei genauerer Betrachtung der eingesetzten PräS1-Konstrukte wurde deutlich, daß sowohl eine C-terminale Sequenz im Bereich AS 85-108 als auch eine N-terminale Sequenz im Bereich AS 1-44 im Fängerprotein

vorhanden sein müssen, damit das Konstrukt transaktivierende Eigenschaften besitzt. Die Präsenz nur einer der beiden genannten AS-Bereiche war nicht hinreichend für eine autonome Aktivierung der Reporterexpression, da sowohl BD.L1-70 als auch BD.L44-108 keine transaktivierenden Eigenschaften besaßen. Möglicherweise müssen C-terminale und N-terminale AS-Sequenzen zusammenwirken, damit die PräS1-Domäne Aktivatorfunktion aufweist. Denkbar wäre auch eine Aufgabenteilung, indem eine der beiden AS-Sequenzen eine Aktivierungsdomäne bildet und der andere AS-Bereich deren Stabilisierung übernimmt.

Das Y2H-System wurde vor kurzer Zeit von Harvey *et al.* (1999) gleichfalls verwendet, um neue wirtszellspezifische Interaktionspartner der PräS1-Domäne des L-Proteins zu identifizieren. Die Ergebnisse der Studie unterschieden sich dabei deutlich von den in dieser Untersuchung gewonnenen Daten. Harvey *et al.* (1999) beobachteten keine autonome Aktivierung des Reportergens durch die PräS1-Domäne, so daß die vollständige PräS1-Domäne als Fängerprotein eingesetzt werden konnte. Ebenso fand sich keine Übereinstimmung zwischen den neu identifizierten zellulären Interaktionspartnern bei Harvey *et al.* (1999) und den in der vorliegenden Studie beschriebenen zellulären Proteinen, die Wechselwirkungen mit der PräS1-Domäne zeigten. Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt vermutlich in der Verwendung ungleicher Y2H-Systeme. Legrain *et al.* (1994) konnten in einer Studie über die unterschiedliche Stärke von Protein-Protein-Interaktionen in verschiedenen Y2H-Systemen zeigen, daß die Intensität von Wechselwirkungen zwischen Proteinen aufgrund verschiedener Y2H-Testsysteme um einen Faktor 100 schwanken kann. Die Unterschiede resultieren dabei vor allem aus ungleichen Promotoren, verschiedener Lokalisation der Transkriptionsfaktoranteile im Fusionsprotein und unterschiedlicher relativer Anordnung der Expressionskassetten im verwendeten Vektor. Auch ist bekannt, daß das für diese Arbeit verwendete Y2H-System mit den Expressionsplasmiden pACT2 und pAS2-1 sehr sensitiv Wechselwirkungen identifiziert. Die Marker für die Interaktion werden durch Amplifikation auf transkriptioneller, translationeller und enzymatischer Ebene verstärkt (Clontech, 1998). Die Sensitivität wird zusätzlich durch eine hohe Expressionsrate der Hybridproteine erhöht, allerdings mit dem Nachteil, daß toxische Hybridproteine stärker eliminiert werden, als in Y2H-Systemen mit einem niedrigeren Expressionsniveau.

Harvey *et al.* (1999) verwendeten in ihrer Studie nicht die gleichen Hefeexpressionsvektoren (pGBT9/PräS1 und pGAD10/cDNA) wie in der vorliegenden Arbeit. Diese kodieren zwar ebenfalls für den GAL4-Transkriptionsfaktor, allerdings unterscheiden sich die Vektorkonstrukte in ihren Promotoren und in der allgemeinen Anordnung der Sequenzelemente. Außerdem wurde für das Y2H-System ein anderer Hefewirtszell-

stamm (HF7C) verwendet. Das von Harvey *et al.* (1999) eingesetzte Y2H-System ist insgesamt weniger sensitiv. Desweiteren wurden von ihnen nur $1,9 \times 10^6$ Transformanten einer Leberzell-cDNA-Bank untersucht, während in der vorliegenden Arbeit $2,3 \times 10^7$ unabhängige cDNA-Klone auf eine Interaktion mit der PräS1-Domäne untersucht wurden. Aufgrund der größeren Anzahl erhöhte sich die statistische Wahrscheinlichkeit, daß auch interagierende Proteine identifiziert wurden, deren entsprechende cDNA in sehr geringer Kopienzahl in der cDNA-Genbank vorlag. Zusammengefaßt können die genannten Punkte die unterschiedlichen Ergebnisse beider Untersuchungen erklären.

Unter den cDNA-Klonen, die als mögliche Bindeproteine der PräS1-Domäne des L-Proteins isoliert wurden, befand sich das Serumglykoprotein Hämopexin. Es konnte auffälligerweise sowohl mit dem N- als auch dem C-terminalen PräS1-Fängerprotein identifiziert werden. Hämopexin ist ein Transportprotein der Eisenwiederverwertung, da es Hämgruppen bindet und zur Leber befördert. Dort wird das Hämopexin mit seiner Fracht durch rezeptorvermittelte Endozytose (Muller-Eberhard, 1988; Taketani *et al.*, 1998) aufgenommen und das Hämopexin entladen. Hämopexin wird anschließend wieder in das Serum entlassen, wo es erneut seiner Aufgabe nachkommen kann (Muller-Eberhard, 1988). Bei Betrachtung des Infektionszyklus von HBV stellt sich die Frage, wie die Virionen innerhalb ihres Wirtes zur Leber gelangen, die sie primär infizieren. Die Übertragung der Virionen erfolgt über Blut, Blutprodukte und Körpersekrete (Heathcote *et al.*, 1974; Hoofnagle, 1981; Davison *et al.*, 1987). Diese Körperflüssigkeiten stehen innerhalb des Organismus im Austausch miteinander, sodaß das Virus auch bei Infektion über Körpersekrete in das Blut gelangen kann. Der Blutstrom passiert als wichtigen Durchflußort die Leber. Dort angelangt, muß HBV Mechanismen besitzen, die erkennen, daß es sich in der Leber befindet, und den Blutstrom verlassen, um an Leberzellen zu binden. Eine einfachere Methode, zuverlässig zur Leber zu gelangen, wäre die Bindung an Proteine, die in höherer Konzentration im Serum vorliegen und die speziell zur Leber transportiert werden, wo sie binden und möglicherweise auch aufgenommen werden. Hämopexin wäre ein möglicher Kandidat, der diese Bedingungen erfüllt. Es kommt in einer hohen Konzentration (1,4% der Gesamtproteine des Serum) im Blut vor und wird effektiv zur Leber transportiert. Allerdings wurde die Bindung zwischen Hämopexin und dem L-Protein bisher nur im Y2H-System nachgewiesen, sodaß eine Bestätigung der Interaktion mit weiteren biochemischen Methoden noch aussteht.

Alternativ könnte die Interaktion des L-Proteins mit Hämopexin auch auf der Tatsache beruhen, daß Hämopexindomänen in vielen Proteinen, wie Vitronectin und Mitgliedern der Matrix-Metalloproteinase-Familie, vorkommen und dort vor allem die Proteininteraktion mit anderen Proteinen vermitteln (Bode *et al.*, 1999; Hunt *et al.*, 1987;

Preissner, 1991; Stanley, 1986). Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit, daß Hämopexin nur stellvertretend für ein anderes Protein, das eine Hämopexindomäne besitzt, an die PräS1-Domäne gebunden hat, wobei dieses Protein im Y2H-System, aufgrund welcher Ursachen auch immer, nicht als PräS1-Bindungspartner identifiziert werden konnte.

Einer der im Y2H-System identifizierten Klone kodierte für das Protein E der Molybdän-Kofaktor-Biosynthese. Dieses Protein wurde erst in jüngster Zeit durch Homologievergleiche identifiziert (GenBank-Acc.Nr. AF155659). Seine vermutliche physiologische Rolle in der Zelle ist nur anhand von Analogien in prokaryontischen oder pflanzlichen Zellen abgeleitet (Mendel, 1997; Rieder *et al.*, 1998) und seine zelluläre Lokalisation noch nicht weiter untersucht. Deshalb ist es nicht möglich, zu diesem Zeitpunkt eine konkrete Aussage über eine mögliche Rolle der Protein E/L-Protein-Interaktion zu machen. Zusätzlich ist der Nachweis der Wechselwirkung mit anderen Testmethoden aus zeitlichen Gründen bisher noch nicht erfolgt, sodaß die Möglichkeit einer falsch-positiven Interaktion nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann.

Ein anderer cDNA-Klon, der mit dem Fängerprotein BD.L1-70 interagierte, war mit Sequenzen der "Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase 3 (HIPK3) identisch. Im allgemeinen beeinflussen Kinasen die Aktivität von Proteinen durch Übertragung von Phosphatgruppen. Bei DHBV zeigten Untersuchungen, daß Funktionen des L-Proteins durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Serin und Threonin in der PräS-Region gesteuert werden können, wenn auch die genaue Rolle der Phosphorylierungen nicht geklärt ist (Grgacic *et al.*, 1994; Grgacic *et al.*, 1998; Rothmann *et al.*, 1998a). Bisher konnte allerdings für HBV kein vergleichbarer Mechanismus identifiziert werden. Möglicherweise ist HIPK3 ein Kandidat, der durch Phosphorylierung der PräS1-Sequenz die Funktionen des L-Proteins steuert. Allerdings wurde HIPK3 bisher nur im Kern von Zellen nachgewiesen (Kim *et al.*, 1998) und das L-Protein hält sich normalerweise im Zytosol der Wirtszelle auf. Auch hier sind weitere Untersuchungen zur Klärung noch offener Fragen notwendig.

Unter den cDNA-Klonen, die im Y2H-System isoliert worden waren, befanden sich auch Sequenzen, die mit der Serinprotease C1r identisch waren, einem Bestandteil des C1-Komplex der humanen Komplementkaskade. C1r und auch C1s werden als Zymogen fast ausschließlich von Leberzellen produziert (Ramadori *et al.*, 1986) und in inaktiver Form ins Serum sezerniert. C1r wird durch eine autokatalytische Spaltung aktiviert und spaltet im Anschluß das ebenfalls zum C1-Komplex gehörige C1s. Neben der Interaktion von C1r und der PräS1-Domäne des L-Proteins im Y2H-System konnte die Bindung der beiden Partner *in vitro* nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise für die Aufnahme

von HBV-Virionen von Bedeutung, da gezeigt wurde, daß die Abspaltung der PräS-Region nach Bindung der Virionen an die Wirtszellmembran eine mögliche Fusionssequenz in der S-Domäne des L-Proteins freilegt (Lu *et al.*, 1996). Virionen, die mit der V8-Protease inkubiert worden waren, infizierten eine Hepatomzelllinie, die normalerweise für HBV nicht suszeptibel ist. Dabei spaltete die V8-Protease die PräS-Region direkt am Anfang der S-Region ab (Abb. 35), sodaß das Fusionspeptid AS 8-18 der S-Domäne zugänglich wird, das sehr starke Homologie zu vergleichbaren fusiogenen Sequenzen anderer Virionen besitzt. Bis heute konnte allerdings die zelluläre Protease, die diese Aufgabe übernimmt, nicht identifiziert werden. Aufgrund der Identifikation der Serinprotease C1r als Interaktionspartner des L-Proteins, besteht die Möglichkeit, daß C1r die PräS-Region in der oben genannten Weise prozessiert. Normalerweise spaltet C1r sowohl sich selbst als auch C1s in eine A- und B-Kette (Abb. 35, Reihen 1 und 2). Bei einem Vergleich dieser Spaltungssequenz mit PräS-Sequenzen konnte eine Sequenzähnlichkeit mit dem C-Terminus von PräS2 ermittelt werden (Abb. 35, Reihe 3), an der die PräS-Domäne möglicherweise von C1r gespalten werden könnte.

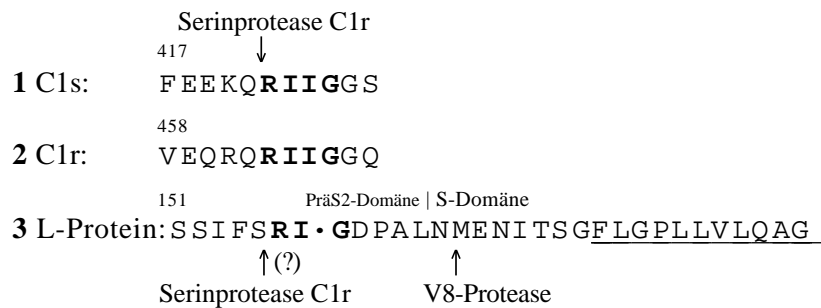


Abb. 35: **Spaltstellen der Serinprotease C1r.** In der AS-Sequenz von C1s und C1r ist die Spaltstelle der Serinprotease C1r, die diese Proteine in eine A- und B-Kette teilt, mit einem Pfeil markiert. Im L-Protein könnte eine homologe Sequenz (Fettdruck) ebenfalls durch C1r gespalten werden (Reihe 3). Dabei wird, ähnlich wie bei Spaltung mit der V8-Protease, eine Fusionssequenz im C-Terminus der S-Domäne freigelegt, die eventuell die Fusion der Virionen mit der Wirtszelle ermöglicht. Die unterstrichene AS-Sequenz des L-Proteins gibt die potentielle Fusionssequenz nach Lu *et al.* (1996) an. Die Pfeile kennzeichnen die Spaltstellen der Proteasen. Die Zahlen geben die entsprechende AS-Positionen in den Proteinen an.

Gegen die Übernahme einer solchen Aufgabe durch C1r spricht allerdings die Beobachtung, daß C1r zwar in Hepatozyten hergestellt wird, aber bevorzugt im Serum vorkommt. Wenn nun bei Virionen schon im Serum das L-Protein prozessiert würde, widerspricht dies Untersuchungen, die gezeigt haben, daß die PräS1-Domäne für die Bindung an Hepatozyten unabdingbar ist, da auf ihr die Rezeptorbindungssequenz lokalisiert ist (Neurath *et al.*, 1986). Deshalb muß zuerst eine Assoziation von Virionen und Hepatozyten erfolgen, bevor die potentielle Protease ihrer Aufgabe nachkommen kann. Wäre C1r diese Protease, müßten spezifisch C1r-Proteine, die sich an der Oberfläche von Hepatozyten befinden, Spaltungsaktivität gegenüber dem L-Protein auf Virionen zeigen, die die freien C1r-Proteine des Serums nicht besitzen.

Unter den cDNA-Klonen, die mit dem N-terminalen Fängerprotein BD.L1-70 isoliert worden waren, befanden sich C-terminale Sequenzen von H4, die mit überproportionaler Häufigkeit auftraten. H4 gehört zu der schweren Kette der ITIH-Familie. Mitglieder dieser Familie sind als Serumproteine in die „Akute-Phase-Reaktion“ involviert (Gonzalez-Ramon *et al.*, 1995; Bost *et al.*, 1998; Daveau *et al.*, 1998). Desweiteren tragen sie zur Stabilisierung der extrazellulären Matrix von Zellen bei (Chen *et al.*, 1994; Mio *et al.*, 2000). ITIH-Proteine binden dabei kovalent an Hyaluron auf Zelloberflächen (Blom *et al.*, 1999). Leider ist die Erforschung der ITIH-Familie und insbesondere von H4 noch nicht so weit fortgeschritten, daß eindeutige Funktionen für H4 postuliert werden können.

Während der vorliegenden Untersuchung war die hohe Anzahl an Duplikaten von H4 besonders auffällig, die während des Y2H-Test als Interaktionspartner der PräS1-Domäne isoliert wurden. Es gelang der Nachweis, daß H4 auch in weiteren biochemischen Methoden *in vitro* an die PräS1-Domäne spezifisch bindet. Es ist denkbar, daß neben H4, das von Hepatozyten effektiv ins Serum sezerniert wird, auch H4 auf Leberzellen lokalisiert ist, indem H4 das Hyaluron auf der Zelloberfläche bindet und so in der extrazellulären Matrix vorhanden ist. Dort könnte es den Virionen das Anheften an die Zelloberfläche durch eine Bindung an L-Proteine erleichtern. Aber auch hier fehlen zur Interpretation Daten über die physiologische Aufgabe von H4.

Einer der Klone, der im Y2H-Test mit dem Fängerprotein BD.L44-108 isoliert worden war, enthielt Teile der cDNA von β -2-Adaptin, einem mutmaßlichen Mitglied der Clathrin-Adaptor-Proteine, das erst vor kurzer Zeit aufgrund seiner Ähnlichkeit mit schweren Ketten heterotetramerer Adaptorkomplexe (AP), insbesondere mit β -1-Adaptin, identifiziert worden war (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998). APs sind für intrazelluläre Membrantransportprozesse mittels Clathrin-umhüllter Vesikel und die Sortierung von Proteinen verantwortlich (siehe auch Abb. 21, S. 53). Die Interaktion zwischen β -2-Adaptin und dem L-Protein wurde in verschiedenen *In vitro*- und *In vivo*-Bindungsstudien weiter untersucht; dabei bestätigte sich die spezifische und direkte Wechselwirkung der PräS1-Domäne des L-Proteins mit β -2-Adaptin. Der Wirtszellfaktor β -2-Adaptin ist deshalb wahrscheinlich ein zellulärer Partner, der das L-Protein bei der Bewältigung seiner vielfältigen Aufgaben unterstützt.

Die schwere Kette β -2-Adaptin ähnelt β -1-Adaptin stärker als allen anderen schweren Adaptorketten. Aber auch hier ist die Homologie zwischen den Kopfdomänen der beiden β -Adaptine deutlich größer als zwischen ihren Ohrdomänen (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998). Trotz der starken Homologie der beiden β -Adaptine scheint β -2-Adaptin eigenständige Aufgaben innerhalb der Zelle zu übernehmen, da es keine zelluläre Kolo-kalisation mit β -1-Adaptin aufweist. Diese Hypothese wird durch

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt, bei denen das L-Protein spezifisch mit 2-Adaptin interagiert und eine Wechselwirkung zwischen dem L-Protein und 1-Adaptin nicht beobachtet werden konnte. Vor allem die Ohrdomäne der schweren Ketten ist für die Bindung weiterer zytosolischer Proteine, die den Verlauf der Vesikelbildung beeinflussen, von großer Bedeutung. Da sich die schweren Ketten der einzelnen Adaptor Komplexe deutlich in ihrer Ohrdomäne voneinander abheben, besitzen sie auch unterschiedliche Bindungspartner. Deshalb wird vermutet, daß die Aufgabenverteilung der verschiedenen Adaptor Komplexe in zellulären Membrantransportprozessen vor allem auf den ungleichen Ohrdomänen ihrer schweren Ketten beruht (Kirchhausen, 2000). Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, daß die Ohrdomäne von 2-Adaptin spezifisch mit der PräS1-Domäne des L-Proteins interagiert, fügen sich in diese Beobachtungen passend ein. Da die Homologie zwischen 2-Adaptin und 1-Adaptin in der Ohrdomäne deutlich geringer als in der Kopfdomäne ist, erklärt sich auch die Spezifität der Bindung zwischen dem L-Protein und 2-Adaptin im Gegensatz zu 1-Adaptin. Auch konnte in Übereinstimmung mit früheren Studien gezeigt werden, daß 2-Adaptin in perinukleären, vesikulären Strukturen des Golgi-Apparates lokalisiert ist (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998), während sich im Gegensatz dazu 1-Adaptin in TGN-Strukturen aufhält (Kirchhausen, 2000; Schmid, 1997). Obwohl die Funktion von 2-Adaptin noch nicht näher bekannt ist, wird anhand seiner Lokalisation in der Zelle angenommen, daß es eher in den sekretorischen als in den endozytotischen Weg involviert ist. Folglich liegt die Vermutung nahe, daß die beobachtete L-Protein/2-Adaptin-Interaktion eher funktionelle Bedeutung bei Ereignissen hat, die mit dem Export der Virionen aus der Zelle in Beziehung stehen, als daß die L-Protein/2-Adaptin-Wechselwirkung für die Aufnahme der Virionen in die Zelle notwendig ist.

Im Infektionszyklus ist der Eintritt von HBV in Hepatozyten einer der am wenigsten bekannten Schritte. Es erhärten sich aber die Hinweise, daß die Aufnahme durch eine rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt. Ihr schließt sich eine Fusion der Virus- und Wirtszellmembran an, die vermutlich an intrazellulären Membranen der Hepatozyten stattfindet (Breiner *et al.*, 1998; Köck *et al.*, 1996; Treichel *et al.*, 1997). Für die Aufnahme ist die PräS1-Domäne des L-Proteins unbedingt notwendig, da sie die Rezeptorbindung und möglicherweise auch die Internalisierung des Virus vermittelt (Neurath *et al.*, 1986; Roingeard *et al.*, 1990). Wie oben beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß 2-Adaptin an die PräS1-Domäne, also dem viralen Rezeptor von HBV, bindet. Bei der Virusaufnahme durch Endozytose wird das Virion durch die endozytotische Membran der Wirtszelle umschlossen. Dabei kommt die auf der Außenseite des Virions liegende PräS1-Domäne nicht mit dem zytosolischen 2-Adaptin in Kontakt, da diese durch die Membran abgeschirmt werden sollte. Diese Annahme wird

durch Ergebnisse dieser Arbeit gestützt, die zeigten, daß β -2-Adaptin nachweislich nur an L-Proteine bindet, deren PräS-Region zytosolisch ausgerichtet ist. Diese Daten stimmen mit den gut charakterisierten Mechanismen der Erkennung von Frachtmolekülen durch Adaptorproteine überein, die alle auf der zytosolischen Seite der Membran stattfinden (Kirchhausen, 2000; Schmid, 1997).

Eine sehr spekulative Hypothese, wie das zytosolische β -2-Adaptin mit der PräS-Domäne während der Virusaufnahme in Kontakt kommen könnte, beruht auf den Daten von Oess *et al.* (2000), die zeigten, daß die PräS₂-Region eine zellpermeable Region (AS 41-52) besitzt. Diese ist bei allen Hepadnaviren stark konserviert und besteht aus einer amphipatischen α -Helix. Peptide, die dieses Motiv tragen, besitzen die Eigenschaft, Membranen effektiv auf einem energieunabhängigen Weg zu durchqueren. Auch längere Proteine, an die das Peptidmotiv angefügt wurde, werden durch die Membran transportiert. Normalerweise ist die PräS-Domäne des L-Proteins durch dessen S-Domäne in der Virusmembran verankert. Für die Virusaufnahme in Hepatozyten wurde allerdings postuliert, daß es notwendig ist, eine Fusionssequenz, die am Anfang der S-Domäne lokalisiert ist, durch proteolytische Prozessierung des L-Proteins freizulegen (Gerlich *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1996). Bei dieser Spaltung des L-Proteins würde die PräS-Sequenz abgespalten, die dann aufgrund des zellpermeablen Motivs ohne Schwierigkeiten die Hepatozytenmembran durchqueren und in das Zytosol der Zelle gelangen könnten. Dort wäre auch die Interaktion mit β -2-Adaptin möglich. Es ist aber weder geklärt, ob der beschriebene Mechanismus existiert, noch ob anschließend eine Bindung der PräS-Domäne an β -2-Adaptin erfolgt, noch welche Funktion diese hätte. Zusammen sprechen die Fakten eher gegen eine Funktion der L-Protein/ β -2-Adaptin-Interaktion bei der endozytotischen Aufnahme von HBV in die Leberzelle.

Nach den oben angeführten Argumenten ist es wahrscheinlicher, daß die L-Protein/ β -2-Adaptin-Interaktion Einfluß auf den Zusammenbau und Export von HBV nimmt. Für HBV wird allgemein angenommen, daß sich die reifen Virionen an intrazellulären Membranen abschnüren und daß sie anschließend über den konstitutiven sekretorischen Weg aus der Zelle transportiert werden, ohne diese zu lysieren (Huovila *et al.*, 1992). Als Entstehungsorte der reifen Virionen wurden Membranen des postER/präGolgi-Kompartiments (Intermediäres Kompartiment) und/oder des proximalen Golgi-Apparates vorgeschlagen. An dieser Stelle akkumulieren L-Proteine, die eine Schlüsselrolle bei der Umhüllung der Nukleokapside spielen (Bruss, 1997; Huovila *et al.*, 1992; Kamimura *et al.*, 1981; Roingard *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1997). Im Einklang dazu stehen auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen von COS-7 Zellen, die mit dem L-Protein transfiziert waren. Sie zeigten die Lokalisation des L-Proteins in cis-Golgi-Strukturen, die durch Doppelfärbung mit einem cis-medialen-

Golgi-Markerprotein zusätzlich bestätigt wurde. Auch bei humanen Hepatomzellen (HUH-7-Zellen), die L-Proteine exprimierten, wurde eine ähnliche räumliche Verteilung des L-Proteins in der Zelle beobachtet. Bei der Untersuchung von COS7-Zellen und HUH-7-Zellen, die mit β -2-Adaptin und L-Protein kotransfiziert waren, veränderte sich der oben beschriebene Aufenthaltsort von β -2-Adaptin in der Zelle. Es befand sich nun zusammen mit dem L-Protein in cis-Golgi-Strukturen. Bemerkenswerterweise scheint das L-Protein in der Lage zu sein, β -2-Adaptin spezifisch an seinen eigenen Aufenthaltsort im cis-Golgi-Apparat, an dem die Umhüllung der Nukleokapside erfolgt, zu rekrutieren. Möglicherweise sorgt β -2-Adaptin anschließend dafür, daß weitere zelluläre Proteine, wie zusätzliche Adaptorproteine oder Clathrin, an den Ort des Viruszusammenbaus gelangen, wo sie verschiedene Aufgaben übernehmen. Sie könnten die Membranverformung erleichtern, die bei der Knospung und Abschnürung der Virionen notwendig ist. Auch Interaktionen mit den HBV-Kapsidproteinen und mit Phospholipiden der Membran zur Unterstützung des Zusammenbaus der Virionen sind denkbar. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, daß die genannten Funktionen auch den Aufgaben von Adaptorproteinen bzw. Clathrin entsprechen, die sie natürlicherweise in der Zelle übernehmen. Zusätzlich ergaben Untersuchungen über die Virusentstehung, daß während der Bildung der Virushülle eine erhebliche Reorganisation der zellulären Lipiddoppelschicht bis zur endgültigen Zusammensetzung der Lipoproteinhülle von HBV erfolgt (Satoh *et al.*, 2000). Clathrin, das möglicherweise vom L-Protein/ β -2-Adaptin-Komplex zum Ort des Viruszusammenbaus geleitet wird, könnte aufgrund seiner speziellen Fähigkeiten den internen Umlagerungsprozeß der Membran und auch ihre Verformung bewirken (Schmid, 1997). Allerdings müßte bei dieser Modellvorstellung die Bindung von Clathrin an die Membran in einer Weise erfolgen, bei der dieses nicht als funktionelle Clathrinschicht auf der Membran liegt. Eine vollständige Clathrinbeschichtung würde die Knospung der Virionen in intraluminale Zisternen stören, da sie die Bindung der Nukleokapside an L-Proteine sterisch behindern könnte. Desweiteren würde eine funktionelle Clathrinschicht die Invagination der Membran initiieren, während im Gegensatz dazu Virionen dadurch entstehen, daß die Nukleokapside durch Ausstülpung und Abschnürung der Membran umhüllt werden. Die Störung der funktionellen Clathrinschicht kann Aufgabe des Chaperons Hsc70 sein, von dem gezeigt wurde, daß es an die PräS1-Domäne des L-Proteins bindet (Löffler-Mary *et al.*, 1997; Prange *et al.*, 1999) und damit ebenfalls am Ort des Viruszusammenbaus vorhanden wäre. Hsc70 reguliert den Abbau von Clathrinbeschichtungen und die Auflösung der Bindung zwischen einzelnen Clathrinproteinen unter Energieverbrauch. Die Energie wird durch Hydrolyse von ATP bereitgestellt, deshalb wird Hsc70 in diesem Zusammenhang auch als schichtablösende ATPase bezeichnet (DeLuca-Flaherty

et al., 1990; Ungewickell, 1985). Neben der vollständigen Ab- und Auflösung der Clathrinschicht steuert Hsc70 auch Umlagerungen innerhalb der Clathrinbeschichtung (Honing *et al.*, 1994; Ungewickell, 1999), insbesondere in Anwesenheit von Adaptorproteinen wird die Clathrinschicht von der Membran nicht vollständig abgelöst (Jiang *et al.*, 2000). Diese Beobachtung würde sich in das beschriebene Modell einer nicht-funktionalen, aber trotzdem präsenten Clathrinbeschichtung der Membran bei Bildung von HBV-Virionen passend einfügen. Zusätzlich wird die Hypothese durch Untersuchungen am Virus der infektiösen Anämie der Pferde (EIAV) unterstützt. Bei diesem Virus der Familie der Lentiviren wurde gezeigt, daß der zelluläre Adaptor-komplex AP-2 zum Ort des Zusammenbaus von Virionen an der Plasmamembran rekrutiert wird und dort bei deren Freisetzung durch Ausstülpung der Membran und Abschnürung der Virionen assistiert. EIAV-Mutanten, bei denen die Interaktionsstelle von AP-2 zerstört wurde, sind nicht mehr fähig, durch Knospung Virionen aus der Wirtszelle freizusetzen (Puffer *et al.*, 1998).

Alternativ könnte 2-Adaptin die Ausstülpung der Membran initiieren, nachdem es durch das L-Protein zum Ort des Viruszusammenbaus geleitet wurde. Diese Aufgabe übernimmt 2-Adaptin möglicherweise ungeachtet der An- oder Abwesenheit von Clathrin, da bisher eine Interaktion zwischen 2-Adaptin und Clathrin im Gegensatz zu einer Bindung von 1-Adaptin und Clathrin (Goodman *et al.*, 1995) bis heute noch nicht nachgewiesen wurde. Für ein unabhängig von Clathrin agierendes 2-Adaptin spricht auch die kürzliche Entdeckung einer neuen Proteinfamilie, deren Mitglieder im Golgi-Apparat lokalisiert sind, eine -Adaptin-Ohrdomäne besitzen und ADP-Ribosylierungsfaktoren binden. Diese werden auch als GGAs bezeichnet und tragen eine Proteindomäne, die der Ohrdomäne der beiden -Adaptine homolog ist, ihr aber nicht vollständig gleicht, während die übrige AS-Sequenz der GGAs keine Verwandtschaft mit den schweren Ketten der Adaptine zeigt (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Takatsu *et al.*, 2000). Es gibt Hinweise, daß GGAs Bestandteile eines neuen Typs von Proteinbeschichtung sind, der für Vesikelbildung im TGN verantwortlich ist, aber weder Clathrin noch AP-1 benötigt (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Takatsu *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen könnte die Ohrdomäne von 2-Adaptin, die mit dem L-Protein interagiert, auch ohne Mitwirkung von Clathrin die Virusbildung durch Ausstülpung der Membran initiieren.

Bei näherer Betrachtung sind ohne Frage noch weitere mögliche Funktionen der 2-Adaptin/L-Protein-Interaktion denkbar. So könnte die Bindung der PräS1-Domäne an 2-Adaptin dessen eigentliche Rolle in der Zelle beeinflussen oder stören. Im Verlauf dieser Untersuchung wurde beobachtet, daß das L-Protein 2-Adaptin zu seinem eigenen bevorzugten Aufenthaltsort rekrutiert. So kann die Abwanderung von 2-Adaptin aus

seinem physiologischen Aufenthaltsort in der Zelle zu cis-Golgi-Strukturen, in denen das L-Protein lokalisiert ist, weitreichende Konsequenzen für die Ausführung der zellulären Funktionen von 2-Adaptin haben. Möglicherweise werden dadurch in Wirtszellen, die das L-Protein exprimieren, z.B. intrazelluläre Transportprozesse beeinträchtigt, die einen potentiellen Adaptor-Komplex aus 2-Adaptin und anderen Adaptorproteinen benötigen. Für diese Mutmaßung spricht die Tatsache, daß die Überexpression von L-Proteinen in transgenen Mäusen zu schweren Funktionsstörungen des Sekretionsapparates führt, obwohl HBV eigentlich nicht direkt zytotoxisch auf Hepatozyten wirkt (Chisari *et al.*, 1987). In Analogie zur postulierten Störung der physiologischen Aufgabe von 2-Adaptin stehen auch Untersuchungen an onkogenen E6-Proteinen des bovinen Papillomavirus. Das E6-Protein ist in der Lage, AP-1 zu binden und den AP-1-abhängigen Transportweg der Zelle zu beeinflussen. Dies beeinträchtigt möglicherweise die Biosynthese von wichtigen zellulären Proteinen und deren Weiterleitung an ihren physiologischen Aufenthaltsort, wobei ein möglicher betroffener Kandidat der große Histokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II wäre. Dieser würde nicht mehr an die Zelloberfläche gelangen und könnte seine Antigene, z.B. Peptide viralen Ursprungs, nicht mehr präsentieren, sodaß dieser Mechanismus der Immunevasion dienen würde (Tong *et al.*, 1998).

Zusätzlich zu den diskutierten Hypothesen über die Funktion von 2-Adaptin in Bezug auf HBV kann die 2-Adaptin/L-Protein-Interaktion auch der Retention von L-Proteinen in der Zelle dienen. Diese werden im Gegensatz zum kleinen und mittleren Hüllprotein nicht in Form subviraler Partikel sezerniert, sondern aufgrund von Retentionssignalen in der PräS1-Domäne des L-Proteins in der Zelle zurückgehalten. Dadurch wird wahrscheinlich die Konzentration von L-Proteinen erhöht, sodaß diese für die Verpackung der Kapside zur Verfügung stehen (Bruss *et al.*, 1995; Gallina *et al.*, 1995; Ganem, 1996; Prange *et al.*, 1991). Möglicherweise ist eine Bindung zwischen 2-Adaptin und der zytosolisch ausgerichteten PräS1-Domäne die Ursache für die Blockade der Sekretion von L-Proteinen. Diese würden infolge der L-Protein-/2-Adaptin-Interaktion in einem Punkt in der Wirtszelle konzentriert, an dem die Bindung von Nukleokapsiden an L-Proteine stattfindet und an dem im Anschluß die Virionen in das Lumen des postER/präGolgi-Kompartiments sprossen können.

Zusammen sprechen die Daten dieser Arbeit für eine Verwendung des zellulären Adaptorproteins 2-Adaptin durch das L-Protein während des Lebenszyklus von HBV, wenn auch über die genaue Funktion der Interaktion nur Hypothesen bestehen und sie weiterer Klärung bedarf.

5 Zusammenfassung

Im Infektionszyklus des Hepatitis-B-Virus spielt das große L-Hüllprotein, insbesondere seine PräS1-Region, eine zentrale Rolle. Das L-Protein vermittelt die Bindung und Aufnahme in die Leberzelle, die Verpackung der Nukleokapside in die Virushülle, die Regulation der cccDNA-Amplifikation und eine transkriptionelle Transaktivierung in der Wirtszelle. In dieser Arbeit wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System zur Identifizierung zellulärer Interaktionspartner des L-Proteins verwendet, dabei wurden als Fängerproteine PräS1-Konstrukte des L-Proteins eingesetzt. Da die komplette PräS1-Domäne (Subtyp *ayw*) in der Lage war, eine autonome Reporterexpression zu initiieren, wurde ein N-terminales (Aminosäuren 1-70) und ein C-terminales (Aminosäuren 44-108) Fängerprotein konstruiert, die keine autonome Aktivierung aufwiesen, um eine Leberzell-cDNA-Bank zu durchsuchen.

Einer der Klone, der im Hefe-Zwei-Hybrid-Test mit dem C-terminalen PräS1-Fängerprotein isoliert worden war, enthielt Teile der cDNA von β -2-Adaptin, einem mutmaßlichen Mitglied der Clathrin-Adaptor-Proteine. Diese sind für intrazelluläre Membrantransportprozesse mittels Clathrin-umhüllter Vesikel und der Sortierung von Proteinen verantwortlich. Einige andere Klone zeigten Übereinstimmung mit Hämopexin, einem Serumglykoprotein, das Häm-Gruppen bindet und zur Leber transportiert. Auffällig bei Hämopexin war, daß es sowohl mit dem C-terminalen als auch dem N-terminalen PräS1-Fängerprotein im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert wurde. Unter den interagierenden Klonen, die mit dem N-terminalen Konstrukt des L-Proteins isoliert worden waren, befand sich überproportional häufig eine cDNA, die der schweren Kette H4 der Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor-Familie homolog war. H4 besitzt vermutlich physiologische Bedeutung bei der Stabilisierung der extrazellulären Matrix sowie der "Akute-Phase-Reaktion", die Entzündungen folgt. Weitere Klone kodierten für die Serinprotease C1r. Diese ist Bestandteil des C1-Komplex, der ersten Komponente des klassischen Komplementsystems.

Die Spezifität der Bindung zwischen den positiven Klonen H4, C1r bzw. β -2-Adaptin und der PräS1-Domäne wurde in weiteren biochemischen *In vitro*-Bindungstests bestätigt. Für β -2-Adaptin konnte zusätzlich noch eine *In vivo*-Bindung an L-Protein Koimmunpräzipitationstudien nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise zeigte sich bei einer Koexpression von β -2-Adaptin und L-Protein eine Rekrutierung des β -2-Adaptin zu cis-Golgi-Strukturen, in denen das L-Protein konzentriert war, sodaß eine physiologische Bedeutung der β -2-Adaptin/L-Protein-Interaktion sehr wahrscheinlich ist.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, daß β -2-Adaptin und wahrscheinlich auch H4 und C1r als Wirtszellfaktoren am Infektionszyklus und/oder der Pathogenität des Hepatitis-B-Virus beteiligt sind.

6 Literatur

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S.** (1994). *Cellular and Molecular Immunology*. W. B. Saunders Company. Philadelphia.
- Alberts, B., Bray, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.** (1994). *Molekularbiologie der Zelle* (3. Aufl.). VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim.
- Arlaud, G.J., Thielens, N.M., Illy, C.** (1993). Assembly of the C1 complex. *Behring Inst Mitt*, 189-95.
- Ausubel, F.M., Kent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** (1994). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. New York.
- Beasley, R.P., Trepo, C., Stevens, C.E., Szmuness, W.** (1977). The e antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiol* 105, 94-8.
- Begley, D.A., Berkenpas, M.B., Sampson, K.E., Abraham, I.** (1997). Identification and sequence of human PKY, a putative kinase with increased expression in multidrug-resistant cells, with homology to yeast protein kinase Yak1. *Gene* 200, 35-43.
- Blom, A.M., Morgelin, M., Oyen, M., Jarvet, J., Fries, E.** (1999). Structural characterization of inter-alpha-inhibitor. Evidence for an extended shape. *J Biol Chem* 274, 298-304.
- Blum, H.E., Stowring, L., Figus, A., Montgomery, C.K., Haase, A.T., Vyas, G.N.** (1983). Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocytes, bile duct epithelium, and vascular elements by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6685-8.
- Blumberg, B.S.** (1997). The current state of the prevention of HBV infection, the carrier state and hepatocellular carcinoma. *Res Virol* 148, 91-4.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., Maskos, K.** (1999). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 55, 639-52.
- Bosch, V., Bartenschlager, R., Radziwill, G., Schaller, H.** (1988). The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* 166, 475-85.
- Bost, F., Diarra-Mehrpour, M., Martin, J.P.** (1998). Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur J Biochem* 252, 339-46.
- Bottcher, B., Wynne, S.A., Crowther, R.A.** (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386, 88-91.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Breiner, K.M., Urban, S., Schaller, H.** (1998). Carboxypeptidase D (gp180), a golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J Virol* 72, 8098-104.
- Bruns, M., Miska, S., Chassot, S., Will, H.** (1998). Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 72, 1462-8.
- 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.
- Bruss, V., Ganem, D.** (1991). Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* 65, 3813-20.
- Bruss, V., Gerlich, W.H.** (1988). Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 163, 268-75.
- Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E., Galle, P.R.** (1996). Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* 218, 396-9.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R., Gerlich, W.H.** (1994). Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *Embo J* 13, 2273-9.
- Bruss, V., Vieluf, K.** (1995). Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* 69, 6652-7.
- Budkowska, A., Bedossa, P., Groh, F., Louise, A., Pillot, J.** (1995). Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain. *J Virol* 69, 840-8.

- Budkowska, A., Maillard, P., Theret, N., Groh, F., Possehl, C., Topilko, A., Crainic, R.** (1997). Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T-lymphocyte. *Virology* 237, 10-22.
- Budkowska, A., Quan, C., Groh, F., Bedossa, P., Dubreuil, P., Bouvet, J.P., Pillot, J.** (1993). Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor. *J Virol* 67, 4316-22.
- Bukau, B., Horwich, A.L.** (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-66.
- Caselmann, W.H., Meyer, M., Kekule, A.S., Lauer, U., Hofschneider, P.H., Koshy, R.** (1990). A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2970-4.
- Cattaneo, R., Will, H., Schaller, H.** (1984). Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *Embo J* 3, 2191-6.
- Chen, L., Mao, S.J., McLean, L.R., Powers, R.W., Larsen, W.J.** (1994). Proteins of the inter-alpha-trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J Biol Chem* 269, 28282-7.
- Chen, P.-J., Lai, W.-J., Wang, C.-J., Chen, D.-S.** (1993). Hepatitis B surface antigen and large-form hepatitis delta antigen in HDV assembly : a further study. In S. J. Hadziyannis, J. M. Taylor, F. Bonino (Eds): *Hepatitis Delta Virus Molecular Biology, Pathogenesis, and clinical aspects*, John Wiley & Sons, New York.
- Chisari, F.V., Filippi, P., Buras, J., McLachlan, A., Popper, H., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D., Brinster, R.L.** (1987). Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6909-13.
- Choi-Miura, N.H., Sano, Y., Oda, E., Nakano, Y., Tobe, T., Yanagishita, T., Taniyama, M., Katagiri, T., Tomita, M.** (1995). Purification and characterization of a novel glycoprotein which has significant homology to heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 117, 400-7.
- Cimarelli, A., Luban, J.** (1999). Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol* 73, 5388-401.
- Clontech** (1998). *MATCHMAKER GALA Two-Hybrid Systems*. CLONTECH Laboratories.
- Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M.** (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 695-8.
- Dash, S., Rao, K.V., Panda, S.K.** (1992). Receptor for pre-S1(21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction. *J Med Virol* 37, 116-21.
- Daveau, M., Jean, L., Soury, E., Olivier, E., Masson, S., Lyoumi, S., Chan, P., Hiron, M., Lebreton, J.P., Husson, A., Jegou, S., Vaudry, H., Salier, J.P.** (1998). Hepatic and extra-hepatic transcription of inter-alpha-inhibitor family genes under normal or acute inflammatory conditions in rat. *Arch Biochem Biophys* 350, 315-23.
- Davison, F., Alexander, G.J., Trowbridge, R., Fagan, E.A., Williams, R.** (1987). Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication. *J Hepatol* 4, 37-44.
- Dell'Angelica, E.C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R.C., Vargas, J.D., Hartnell, L.M., Bonifacino, J.S.** (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 149, 81-94.
- DeLuca-Flaherty, C., McKay, D.B., Parham, P., Hill, B.L.** (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* 62, 875-87.
- Eble, B.E., Lingappa, V.R., Ganem, D.** (1986). Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* 6, 1454-63.
- Eble, B.E., Lingappa, V.R., Ganem, D.** (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.

- Eble, B.E., MacRae, D.R., Lingappa, V.R., Ganem, D.** (1987). Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* 7, 3591-601.
- Eng, F.J., Varlamov, O., Fricker, L.D.** (1999). Sequences within the cytoplasmic domain of gp180/carboxypeptidase D mediate localization to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 10, 35-46.
- Feitelson, M.A., Zhu, M., Duan, L.X., London, W.T.** (1993). Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 8, 1109-17.
- Flick, J.S., Johnston, M.** (1990). Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 4757-69.
- Franco, A., Paroli, M., Testa, U., Benvenuto, R., Peschle, C., Balsano, F., Barnaba, V.** (1992). Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J Exp Med* 175, 1195-205.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P.** (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281, 646-50.
- Galle, P.R., Hagelstein, J., Kommerell, B., Volkmann, M., Schranz, P., Zentgraf, H.** (1994). In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 106, 664-73.
- Gallina, A., Gazina, E., Milanesi, G.** (1995). A C-terminal PreS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells. *Virology* 213, 57-69.
- Ganem, D.** (1996). Hepadnaviridae and their replication, pp. 2703-2737. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (Eds): *Virology, Third Edition*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E., Bruss, V.** (1996). Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* 70, 4269-74.
- Gerlich, W.H., Lu, X., Heermann, K.H.** (1993). Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J Hepatol* 17, S10-4.
- Golemis, E.A.** (1996). Interaction Trap In Work (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>), WorldWideWeb.
- Gonzalez-Ramon, N., Alava, M.A., Sarsa, J.A., Pineiro, M., Escartin, A., Garcia-Gil, A., Lampreave, F., Pineiro, A.** (1995). The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120. *FEBS Lett* 371, 227-30.
- Goodman, O.B., Keen, J.H.** (1995). The alpha chain of the AP-2 adaptor is a clathrin binding subunit. *J Biol Chem* 270, 23768-73.
- Greber, U.F., Singh, I., Helenius, A.** (1994). Mechanisms of virus uncoating. *Trends Microbiol* 2, 52-6.
- Grgacic, E.V., Anderson, D.A.** (1994). The large surface protein of duck hepatitis B virus is phosphorylated in the pre-S domain. *J Virol* 68, 7344-50.
- Grgacic, E.V., Kuhn, C., Schaller, H.** (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.
- Grgacic, E.V., Lin, B., Gazina, E.V., Snooks, M.J., Anderson, D.A.** (1998). Normal phosphorylation of duck hepatitis B virus L protein is dispensable for infectivity. *J Gen Virol* 79, 2743-51.
- Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S., Guguen-Guillouzo, C.** (1995). Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213, 292-9.
- Guidotti, L.G., Matzke, B., Pasquinelli, C., Shoenberger, J.M., Rogler, C.E., Chisari, F.V.** (1996). The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol* 70, 7056-61.
- Guo, J.T., Pugh, J.C.** (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.
- Hagelstein, J., Fathinejad, F., Stremmel, W., Galle, P.R.** (1997). pH-independent uptake of hepatitis B virus in primary human hepatocytes. *Virology* 229, 292-4.
- Harvey, T.J., Macnaughton, T.B., Park, D.S., Gowans, E.J.** (1999). A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen. *J Gen Virol* 80, 607-15.

- Heathcote, J., Cameron, C.H., Dane, D.S.** (1974). Hepatitis-B antigen in saliva and semen. *Lancet* 1, 71-3.
- Heermann, K.H., Gerlich, W.H.** (1991). Surface proteins of hepatitis B viruses, pp. 145-169. In A. McLachlan (Ed.): *Molecular biology of the hepatitis B virus*, CRC Press, Boca Raton.
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., Gerlich, W.H.** (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* 52, 396-402.
- Hertogs, K., Leenders, W.P., Depla, E., De Bruin, W.C., Meheus, L., Raymackers, J., Moshage, H., Yap, S.H.** (1993). Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* 197, 549-57.
- Hildt, E., Hofschneider, P.H.** (1998). The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 154, 315-29.
- Hildt, E., Saher, G., Bruss, V., Hofschneider, P.H.** (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 225, 235-9.
- Hirst, J., Lui, W.W., Bright, N.A., Totty, N., Seaman, M.N., Robinson, M.S.** (2000). A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* 149, 67-80.
- Hirst, J., Robinson, M.S.** (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* 1404, 173-93.
- Hohne, M., Schaefer, S., Seifer, M., Feitelson, M.A., Paul, D., Gerlich, W.H.** (1990). Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *Embo J* 9, 1137-45.
- Hollinger, F.B.** (1996). Hepatitis B Virus, pp. 2739-2807. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (Eds): *Virology, Third Edition*, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Honing, S., Kreimer, G., Robenek, H., Jockusch, B.M.** (1994). Receptor-mediated endocytosis is sensitive to antibodies against the uncoating ATPase (hsc70). *J Cell Sci* 107, 1185-96.
- Hoofnagle, J.H.** (1981). Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Annu Rev Med* 32, 1-11.
- Hunt, L.T., Barker, W.C., Chen, H.R.** (1987). A domain structure common to hemopexin, vitronectin, interstitial collagenase, and a collagenase homolog. *Protein Seq Data Anal* 1, 21-6.
- Huovila, A.P., Eder, A.M., Fuller, S.D.** (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* 118, 1305-20.
- Israel, N., Chenciner, N., Houlmann, C., Streeck, R.E.** (1989). An expression vector for high-level protein synthesis in Vero cells. *Gene* 81, 369-72.
- Jiang, R., Gao, B., Prasad, K., Greene, L.E., Eisenberg, E.** (2000). Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes. *J Biol Chem* 275, 8439-47.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., Schaller, H.** (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *Embo J* 9, 3389-96.
- Kamimura, T., Yoshikawa, A., Ichida, F., Sasaki, H.** (1981). Electron microscopic studies of Dane particles in hepatocytes with special reference to intracellular development of Dane particles and their relation with HBeAg in serum. *Hepatology* 1, 392-7.
- Kane, M.A.** (1996). Global status of hepatitis B immunisation. *Lancet* 348, 696.
- Kann, M., Gerlich, W.H.** (1994). Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol* 68, 7993-8000.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., Helenius, A.** (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 145, 45-55.
- Kekule, A.S., Lauer, U., Meyer, M., Caselmann, W.H., Hofschneider, P.H., Koshy, R.** (1990). The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 343, 457-61.
- Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., Jay, G.** (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351, 317-20.
- Kim, H.S., Ryu, C.J., Hong, H.J.** (1997). Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol* 78, 1083-6.

- Kim, Y.H., Choi, C.Y., Lee, S.J., Conti, M.A., Kim, Y.** (1998). Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors. *J Biol Chem* 273, 25875-9.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69, 699-727.
- Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S., Riezman, H.** (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9, 488-95.
- Köck, J., Borst, E.M., Schlicht, H.J.** (1996). Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol* 70, 5827-31.
- Kuroki, K., Cheung, R., Marion, P.L., Ganem, D.** (1994). A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. *J Virol* 68, 2091-6.
- Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F., Ganem, D.** (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.
- Kuroki, K., Russnak, R., Ganem, D.** (1989). Novel N-terminal amino acid sequence required for retention of a hepatitis B virus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 9, 4459-66.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P.** (1999). Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* 73, 2052-7.
- Legrain, P., Dokhelar, M.C., Transy, C.** (1994). Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids Res* 22, 3241-2.
- Lenhoff, R.J., Summers, J.** (1994). Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J Virol* 68, 4565-71.
- Lewin, D.A., Sheff, D., Ooi, C.E., Whitney, J.A., Yamamoto, E., Chicione, L.M., Webster, P., Bonifacino, J.S., Mellman, I.** (1998). Cloning, expression, and localization of a novel gamma-adaptin-like molecule. *FEBS Lett* 435, 263-8.
- Löffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C., Prange, R.** (2000). Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* 270, 358-67.
- Löffler-Mary, H., Werr, M., Prange, R.** (1997). Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* 235, 144-52.
- Lu, X., Block, T.M., Gerlich, W.H.** (1996). Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line. *J Virol* 70, 2277-85.
- Ma, J., Ptashne, M.** (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51, 113-9.
- Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Miyamoto, H., Baba, K., Oda, K., Nakamura, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** (1983). A hepatitis B surface antigen polypeptide (P31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 85, 268-74.
- Macrae, D.R., Bruss, V., Ganem, D.** (1991). Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology* 181, 359-63.
- Maeda, Y., Tanaka, S., Hino, J., Kangawa, K., Kinoshita, T.** (2000). Human dolichol-phosphate-mannose synthase consists of three subunits, DPM1, DPM2 and DPM3. *Embo J* 19, 2475-82.
- Mangold, C.M., Unckell, F., Werr, M., Streeck, R.E.** (1997). Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles. *Arch Virol* 142, 2257-67.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Marcil, R., Higgins, D.R.** (1992). Direct transfer of plasmid DNA from yeast to E.coli by electroporation. *Nucleic Acids Res* 20, 917.
- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H., Robinson, W.S.** (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2941-5.

- Mason, W.S., Seal, G., Summers, J.** (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36, 829-36.
- McLachlan, A., Milich, D.R., Raney, A.K., Riggs, M.G., Hughes, J.L., Sorge, J., Chisari, F.V.** (1987). Expression of hepatitis B virus surface and core antigens: influences of pre-S and precore sequences. *J Virol* 61, 683-92.
- Mehdi, H., Kaplan, M.J., Anlar, F.Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K., Peebles, M.E.** (1994). Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* 68, 2415-24.
- Mendel, R.R.** (1997). Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta* 203, 399-405.
- Milich, D.R., Jones, J.E., Hughes, J.L., Price, J., Raney, A.K., McLachlan, A.** (1990). Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6599-603.
- Mio, K., Carrette, O., Maibach, H.I., Stern, R.** (2000). Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the inter-alpha -inhibitor family. *J Biol Chem* 275, 32413-21.
- Muller-Eberhard, U.** (1988). Hemopexin. *Methods Enzymol* 163, 536-65.
- Nassal, M.** (1996). Hepatitis B virus morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214, 297-337.
- Nemeckova, S., Kunke, D., Press, M., Nemecek, V., Kutinova, L.** (1994). A carboxy-terminal portion of the preS1 domain of hepatitis B virus (HBV) occasioned retention in endoplasmic reticulum of HBV envelope proteins expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* 202, 1024-7.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H.** (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1, 841-5.
- Neurath, A.R., Kent, S.B., Strick, N., Parker, K.** (1986). Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46, 429-36.
- Neurath, A.R., Strick, N., Sproul, P.** (1992). Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med* 175, 461-9.
- Nishimura, H., Kakizaki, I., Muta, T., Sasaki, N., Pu, P.X., Yamashita, T., Nagasawa, S.** (1995). cDNA and deduced amino acid sequence of human PK-120, a plasma kallikrein-sensitive glycoprotein. *FEBS Lett* 357, 207-11.
- Ochiya, T., Tsurimoto, T., Ueda, K., Okubo, K., Shiozawa, M., Matsubara, K.** (1989). An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1875-9.
- Oess, S., Hildt, E.** (2000). Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther* 7, 750-8.
- Ostapchuk, P., Hearing, P., Ganem, D.** (1994). A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *Embo J* 13, 1048-57.
- Ou, J.H., Laub, O., Rutter, W.J.** (1986). Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1578-82.
- Page, L.J., Robinson, M.S.** (1995). Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J Cell Biol* 131, 619-30.
- Patzer, E.J., Nakamura, G.R., Yaffe, A.** (1984). Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J Virol* 51, 346-53.
- Petit, M.A., Capel, F., Dubanchet, S., Mabit, H.** (1992). PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology* 187, 211-22.
- Pontisso, P., Petit, M.A., Bankowski, M.J., Peebles, M.E.** (1989). Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region. *J Virol* 63, 1981-8.
- Pontisso, P., Ruvoletto, M.G., Tiribelli, C., Gerlich, W.H., Ruol, A., Alberti, A.** (1992). The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol* 73, 2041-5.
- Prange, R., Clemen, A., Streeck, R.E.** (1991). Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol* 65, 3919-23.

- Prange, R., Nagel, R., Streeck, R.E.** (1992). Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol* 66, 5832-41.
- Prange, R., Streeck, R.E.** (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *Embo J* 14, 247-56.
- Prange, R., Werr, M., Löffler-Mary, H.** (1999). Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis. *Biol Chem* 380, 305-14.
- Preissner, K.T.** (1991). Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol* 7, 275-310.
- Puffer, B.A., Watkins, S.C., Montelaro, R.C.** (1998). Equine infectious anemia virus Gag polyprotein late domain specifically recruits cellular AP-2 adapter protein complexes during virion assembly. *J Virol* 72, 10218-21.
- Ramadori, G., Heinz, H.P., Martin, H., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Loos, M.** (1986). Biosynthesis of the subcomponents C1q, C1r and C1s of the first component of complement (C1) by guinea pig hepatocyte primary cultures. *Eur J Immunol* 16, 1137-41.
- Rieder, C., Eisenreich, W., O'Brien, J., Richter, G., Gotze, E., Boyle, P., Blanchard, S., Bacher, A., Simon, H.** (1998). Rearrangement reactions in the biosynthesis of molybdopterin--an NMR study with multiply ¹³C/¹⁵N labelled precursors. *Eur J Biochem* 255, 24-36.
- Rigg, R.J., Schaller, H.** (1992). Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH. *J Virol* 66, 2829-36.
- Rodriguez-Crespo, I., Gomez-Gutierrez, J., Nieto, M., Peterson, D.L., Gavilanes, F.** (1994). Prediction of a putative fusion peptide in the S protein of hepatitis B virus. *J Gen Virol* 75, 637-9.
- Rodriguez-Crespo, I., Nunez, E., Yelamos, B., Gomez-Gutierrez, J., Albar, J.P., Peterson, D.L., Gavilanes, F.** (1999). Fusogenic activity of hepadnavirus peptides corresponding to sequences downstream of the putative cleavage site. *Virology* 261, 133-42.
- Roingeard, P., Lu, S.L., Sureau, C., Freschlin, M., Arbeille, B., Essex, M., Romet-Lemonne, J.L.** (1990). Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus antigen and complete particle production in hepatitis B virus DNA transfected HepG2 cells. *Hepatology* 11, 277-85.
- Rothmann, K., Schnolzer, M., Radziwill, G., Hildt, E., Moelling, K., Schaller, H.** (1998a). Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol* 72, 10138-47.
- Rothmann, K., Schnolzer, M., Radziwill, G., Hildt, E., Moelling, K., Schaller, H.** (1998b). Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol* 72, 10138-47.
- Salinovich, O., Montelaro, R.C.** (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156, 341-7.
- Satoh, O., Imai, H., Yoneyama, T., Miyamura, T., Utsumi, H., Inoue, K., Umeda, M.** (2000). Membrane structure of the hepatitis B virus surface antigen particle. *J Biochem (Tokyo)* 127, 543-50.
- Schaefer, S., Seifer, M., Grimmsmann, T., Fink, L., Wenderhold, S., Hohne, M.W., Gerlich, W.H.** (1998). Properties of tumour suppressor p53 in murine hepatocyte lines transformed by hepatitis B virus X protein. *J Gen Virol* 79, 767-77.
- Schlicht, H.J., Schaller, H.** (1989). Analysis of hepatitis B virus gene functions in tissue culture and in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* 144, 253-63.
- Schmid, S.L.** (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66, 511-48.
- Seeger, C., Ganem, D., Varmus, H.E.** (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232, 477-84.
- Smith, D.B., Johnson, K.S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Sprengel, R., Kaleta, E.F., Will, H.** (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62, 3832-9.
- Stamnes, M.A., Rothman, J.E.** (1993). The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* 73, 999-1005.

- Stanley, K.K.** (1986). Homology with hemopexin suggests a possible scavenging function for S-protein/vitronectin. *FEBS Lett* 199, 249-53.
- Stevens, C.E., Beasley, R.P., Tsui, J., Lee, W.C.** (1975). Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 292, 771-4.
- Stirk, H.J., Thornton, J.M., Howard, C.R.** (1992). A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 33, 148-58.
- Storm, D., Herz, J., Trinder, P., Loos, M.** (1997). C1 inhibitor-C1s complexes are internalized and degraded by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 272, 31043-50.
- Summers, J., Smith, P.M., Horwich, A.L.** (1990). Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* 64, 2819-24.
- Summers, J., Smolec, J.M., Snyder, R.** (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4533-7.
- Swameye, I., Schaller, H.** (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.
- Takatsu, H., Sakurai, M., Shin, H.W., Murakami, K., Nakayama, K.** (1998). Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. *J Biol Chem* 273, 24693-700.
- Takatsu, H., Yoshino, K., Nakayama, K.** (2000). Adaptor gamma ear homology domain conserved in gamma-adaptin and GGA proteins that interact with gamma-synergin. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 719-25.
- Taketani, S., Immenschuh, S., Go, S., Sinclair, P.R., Stockert, R.J., Liem, H.H., Muller Eberhard, U.** (1998). Hemopexin from four species inhibits the association of heme with cultured hepatoma cells or primary rat hepatocytes exhibiting a small number of species specific hemopexin receptors. *Hepatology* 27, 808-14.
- Thefeld, W., Seher, C., Dortschy, R.** (1994). Hepatitis-B-Durchseuchung in der deutschen Bevölkerung. *Bundesgesundheitsblatt* 37 Jg., 373-377.
- Thielens, N.M., Bersch, B., Hernandez, J.F., Arlaud, G.J.** (1999). Structure and functions of the interaction domains of C1r and C1s: keystones of the architecture of the C1 complex. *Immunopharmacology* 42, 3-13.
- Tong, S., Li, J., Wands, J.R.** (1999). Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor. *J Virol* 73, 8696-702.
- Tong, X., Boll, W., Kirchhausen, T., Howley, P.M.** (1998). Interaction of the bovine papillomavirus E6 protein with the clathrin adaptor complex AP-1. *J Virol* 72, 476-82.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Dienes, H.P., Gerken, G.** (1997). Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* 142, 493-8.
- Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Stockert, R.J., Poralla, T., Gerken, G.** (1994). The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol* 75, 3021-9.
- Tuttleman, J.S., Pourcel, C., Summers, J.** (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47, 451-60.
- Ueda, K., Tsurimoto, T., Matsubara, K.** (1991). Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol* 65, 3521-9.
- Ungewickell, E.** (1985). The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelions from coated vesicles. *Embo J* 4, 3385-91.
- Ungewickell, E.** (1999). Wrapping the package. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8809-10.
- Urban, S., Breiner, K.M., Fehler, F., Klingmuller, U., Schaller, H.** (1998). Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180. *J Virol* 72, 8089-97.
- Van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A., Wigler, M.** (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6213-7.

- Wang, G.H., Seeger, C.** (1992). The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71, 663-70.
- Wilson, C.M.** (1983). Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol* 91, 236-47.
- Wu, T.T., Coates, L., Aldrich, C.E., Summers, J., Mason, W.S.** (1990). In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* 175, 255-61.
- Wunderlich, G., Bruss, V.** (1996). Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch Virol* 141, 1191-205.
- Xu, Z., Bruss, V., Yen, T.S.** (1997). Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *J Virol* 71, 5487-94.
- Yu, M., Summers, J.** (1994). Multiple functions of capsid protein phosphorylation in duck hepatitis B virus replication. *J Virol* 68, 4341-8.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K., Schu, P.** (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* 274, 5385-90.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

3 AT	3-Amino-1,2,4-Triazol	ER	Endoplasmatisches Reticulum
AD	Aktivierungsdomäne von GAL4	FCS	Fötales Kälberserum
Ak	Antikörper	GAL4	Transkriptionsfaktor zur Regulierung der Gene für den Galaktose-Metabolismus bei <i>S. cerevisiae</i>
ALDH4	Aldehyd-Dehydrogenase 4	GSHV	Erdhörnchen Hepatitis B-Virus
Amp	Ampicillin	GST	Glutathion-S-Transferase
Amp ⁺	Ampicillin-Resistenz	GTP	Guanintriphosphat
AP	Adaptorkomplex	h	Stunden
AS	Aminosäure	HA	Hämagglutinin-Epitop
ARF1	ADP-Ribosylierungs-Faktor 1	HBsAg	Hepatitis B-Oberflächenantigen (Hepatitis B-surface Antigen)
Asn	Asparagin	HBV	Hepatitis B-Virus
Aqua bidest	entmineralisiertes Wasser	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	HHBV	Reiher-HBV
ATTC	American Type Culture Collection	HIPK3	"Homeodomain-Interacting"-Protein-Kinase 3
bp	Basenpaare	His	Histidin
-Gal	-Galaktosidase	hMT	humane Metallothionin IIA Promotor
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)	HRPO	Meerrettich (horseradish) Peroxidase
CAD	zytosolische Verankerungsdomäne (cytosolic anchorage determinant)	Ig	Immunglobulin
ccc	kovalent geschlossen zirkulär (covalently closed circular)	IL-9	Interleukin 9
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propansulfat	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
CMV	Cytomegalovirus Promotor	ITIH	Inter- α -Trypsin-Inhibitor
DHBV	Enten Hepatitis B-Virus	kb	Kilobasenpaare
DMEM	Dulbeccos modified Eagle's Medium	kD	Kilodalton
DMSO	Dimethylsulfoxid	L-Protein	großes HBV-Hüllprotein
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LB	Luria Bertani
DNA-BD	DNA-Bindungsdomäne von GAL4	Leu	Leucin
DOC	Desoxycholsäure	LEU2	Leucin-Gen von <i>S. cerevisiae</i>
DPM3	Dolichyl-Phosphat-Mannosyltransferase Polypeptid 3	MCBPE	Protein E der Molybden-Kofaktor-Biosynthese
ds	doppelsträngig	MEM	Minimal Essential Medium
ECL	Enhanced Chemiluminescence	min	Minuten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MMP	Magermilchpulver
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Moko	Molybden Kofaktor
EF2	Elongationsfaktor 2	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	M-Protein	mittleres HBV-Hüllprotein
		NCBI	National Center for Biotechnology Information
		NLS	Kernlokalisierungssignal
		NP-40	Nonidet P-40
		Nt	Nukleotid

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm	SV40	Affen (Simian) Virus 40
OPD	Ortho-Phenyldiamin-dihydrochlorid	TBS	Tris-HCl-gepufferte Salzlösung
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)	TCA	Trichloressigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung	Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
PEG	Polyethylenglykol	Trp	Tryptophan
PNGase F	Peptid:N-glykosidase F	TRP1	Tryptophan-Gen von <i>S. cerevisiae</i>
RNA	Ribonukleinsäure	Tween 100	Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate
RNAse	Ribonuklease	U/min	Umdrehungen pro Minute
RRX	RhodaminRedEx	UV	Ultraviolett
RT	Raumtemperatur	WHV	Waldmurmeltier HBV
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	wt	Wildtyp
SB	Solubilisationspuffer	WB	Waschpuffer
sec	Sekunde	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid
SD-Medium	"Synthetic Dropout"-Medium	Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid (Yeast Two Hybrid)
SDS	Natriumdodecylsulfat		
S-Protein	kleines HBV-Hüllprotein		

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Hepatitis-B-Virus.....	2
Abb. 2: Organisation des HBV-Genoms.....	3
Abb. 3: Replikationszyklus von HBV.....	6
Abb. 4: Die Hüllproteine von HBV.....	9
Abb. 5: Transmembrane Struktur der drei Hüllproteine.....	10
Abb. 6: Prinzip des Y2H-Systems.....	27
Abb. 7: Diagramm eines Y2H-Tests.....	29
Abb. 8: Schematische Darstellung des Vektors pAS2-1.....	31
Abb. 9: Schematische Darstellung des Vektors pACT2.....	32
Abb. 10: Konstruktion von Fängerproteinen und Charakterisierung ihrer Transaktivierungseigenschaften.....	39
Abb. 11: Schematische Darstellung eines Y2H-Tests anhand von BD.L1-70 als Fängerprotein.....	41
Abb. 12: Restriktionsanalyse zur Eliminierung von Duplikaten.....	42
Abb. 13: Anzahl der Duplikate der neun verschiedenen AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L1-70 interagierten.....	43
Abb. 14: Restriktionsanalyse zufällig ausgewählter Klone.....	44
Abb. 15: Anzahl der Duplikate der acht verschiedenen AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L44-108 interagierten.....	46
Abb. 16: Schematische Darstellung von Hämopexin und Vergleich mit den cDNA-Sequenzen aus AD.Ä2 und AD.50P.....	49

Abb. 17: Struktur der C1-Komplementkomponente und schematische Darstellung von C1r im Vergleich zu der cDNA-Sequenz aus AD.G3.....	50
Abb. 18: Nukleotidsequenz von AD.L3 mit translatierter AS-Folge des ORF.....	51
Abb. 19: Schematische Darstellung von H4 im Vergleich mit cDNA-Sequenzen aus AD.T4, AD.V2, AD.S6 und AD.G2.....	52
Abb. 20: Schematische Darstellung von HIPK3 im Vergleich mit der cDNA-Sequenz aus AD.W5.....	53
Abb. 21: Modell zur Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel.....	53
Abb. 22: 2-Adaptin: Struktur und Vergleich mit 1-Adaptin, einer schweren Kette des AP1-Komplex.....	54
Abb. 23: Expression und Reinigung von [His] ₆ -L1-108.....	56
Abb. 24: <i>In Vitro</i> -Bindungsstudie zwischen der PräS1-Domäne des L-Proteins und H4 ₇₁₅₋₉₂₉	58
Abb. 25: Bindungsstudie zwischen <i>in vitro</i> -translatiertem H4 ₇₁₅₋₉₂₉ und L-Protein.....	59
Abb. 26: Expression und Reinigung von [His] ₆ -H4 ₇₁₅₋₉₂₉	60
Abb. 27: Charakterisierung der H4-Expression in transfizierten COS-7-Zellen.....	61
Abb. 28: <i>In Vitro</i> -Bindungstest mit [His] ₆ -PräS1 und C1r.....	64
Abb. 29: <i>In Vitro</i> -Bindungsstudie zwischen der PräS1-Domäne des L-Proteins und 2-Adaptin.....	66
Abb. 30: <i>In Vivo</i> -Interaktion zwischen dem L-Protein und 2-Adaptin.....	67
Abb. 31: Kolokalisation von L-Proteinen und 2-Adaptin in COS7-Zellen.....	69
Abb. 32: Kolokalisation von L-Proteinen und 2-Adaptin in HUH-7-Zellen.....	70
Abb. 33: L-Protein-Mutante mit einheitlicher luminaler Ausrichtung der PräS1-Domäne kann 2 Adaptin nicht binden.....	71
Abb. 34: C-terminal verkürztes 2-Adaptin kann L-Protein nicht binden.....	72
Abb. 35: Spaltstellen der Serinprotease C1r.....	81

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Aufstellung der verwendeten Antikörper.....	15
Tab. 2: Expressionsvektoren für E. coli.....	16
Tab. 3: <i>In Vitro</i> -Expressionsvektoren.....	17
Tab. 4: Expressionsvektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	17
Tab. 5: Expressionsvektoren für Eukaryonten.....	18
Tab. 6: Auflistung der AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L1-70 isoliert wurden.....	44
Tab. 7: Auflistung der AD.cDNA-Klone, die mit dem Fängerprotein BD.L44-108 isoliert wurden.....	46