

Charakterisierung
zellulärer Interaktionspartner
des großen Hüllproteins des Hepatitis B - Virus

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Karin Awe (geb. Jaschinski)
geboren am 21.04.1980 in Verden (Aller)

Mainz, August 2009

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VI</i>
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis B - Virus	1
1.1.1 Aufbau von Hepatitis B - Virionen	2
1.1.2 Die HBV - Hüllproteine	3
1.1.3 Das HBV - Genom	7
1.1.4 Der Infektionszyklus und Replikation von HBV	8
1.2 Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum	10
1.3 Das ER-luminale Chaperon BiP	14
1.4 Das Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System	16
2 Zielsetzung	18
3 Material	19
3.1 Puffer und Kulturmedien	19
3.2 Enzyme	20
3.3 Molekularbiologische Kits	20
3.4 Antikörper	21
3.5 Organismen	22
3.6 Vektoren	22
3.7 Oligonukleotide	23
3.8 cDNA - Banken	25
3.9 DNA - Längenstandard und Protein - Molekulargewichtstandard	25
3.10 Software	26
4 Methoden	27
4.1 Stamm - und Kulturhaltung	27
4.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	27
4.1.2 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
4.1.3 Kultivierung von HEK293-TT, EcR-LHA-293 und HuH7-Zellen	27
4.2 Methoden der DNA - Analyse	28
4.2.1 Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	28
4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	28
4.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
4.2.5 Elution von DNA aus Agarosegelen	29
4.2.6 Modifikationen von DNA	30
4.2.6.1 Restriktionsanalyse von Nukleinsäuren	30
4.2.6.2 Dephosphorylierung	30
4.2.6.3 Ligation von Nukleinsäuren	30
4.2.7 Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> DH5 α	30

4.3	Methoden der Protein - Analyse	31
4.3.1	Transfektion von HEK293-TT und HuH7-Zellen.....	31
4.3.2	Lyse von Zellen.....	31
4.3.3	TCA - Proteinfällung.....	32
4.3.4	Präparation von Mikrosomen.....	32
4.3.5	Proteaseschutz - Versuche.....	32
4.3.6	Depletion von zellulärem ATP und Biolumineszenz Assay	33
4.3.7	Immunpräzipitation	33
4.3.8	SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE).....	34
4.3.9	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose - Membranen.....	35
4.3.10	Immundetektion von Proteinen	35
4.3.11	HBsAg - ELISA	36
4.3.12	PräS1 - ELISA.....	36
4.3.13	Immunfluoreszenzanalyse.....	37
4.4	Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System	37
4.4.1	Herstellung der Bait - Konstrukte	38
4.4.2	Test der Bait - Expression	38
4.4.3	Kontroll - Assay	39
4.4.4	Pilot Screen	39
4.4.5	Amplifikation der cDNA - Bank.....	39
4.4.6	Screen der Leberzell-spezifischen cDNA - Banken.....	40
4.4.7	Analyse der Klone.....	41
4.4.7.1	Beta-Galaktosidase - Test.....	41
4.4.7.2	Plasmidisolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
4.4.7.3	Sequenzanalyse der Klone	41
4.4.7.4	Bestätigung der Interaktion in <i>S. cerevisiae</i> zur Selektion positiver Klone.....	42
5	Ergebnisse.....	43
5.1	Identifikation neuer Interaktionspartner des HBV L-Hüllproteins mit Hilfe des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems.....	43
5.1.1	Herstellung der Bait - Konstrukte	45
5.1.2	Nachweis der Bait - Expression in <i>S. cerevisiae</i>	45
5.1.3	Ermittlung der Selektionsbedingungen	46
5.1.3.1	Kontroll - Assay	46
5.1.3.2	Pilot Screen	49
5.1.4	Screen von LoHA und LoΔTM4 gegen Leberzell-spezifische cDNA - Banken	50
5.1.5	Analyse des putativen Interaktionspartners Bet1	53
5.1.5.1	Der Prey Bet1 zeigt einen positiven beta-Galaktosidase - Nachweis	55
5.1.5.2	Bestätigung der Interaktion von Bet1 und L in <i>S. cerevisiae</i>	56
5.1.5.3	Herstellung von Bet1 - Expressionskonstrukten	57
5.1.5.4	Bet1.FLAG und Myc.Bet1 werden effizient in humanen Zellen exprimiert.....	57
5.1.5.5	Analyse der Interaktion von Bet1 und L	60
5.1.5.6	Einfluss der Depletion von Bet1 auf die Freisetzung subviraler Partikel	62
5.1.6	Analyse des putativen Interaktionspartners Sec24A	65
5.1.6.1	Der Prey Sec24A zeigt einen positiven beta-Galaktosidase - Nachweis	66

5.1.6.2	Bestätigung der Interaktion von Sec24A mit S und L in <i>S. cerevisiae</i>	67
5.1.6.3	Herstellung eines Sec24A - Expressionskonstruktes	68
5.1.6.4	Nachweis der Expression von FLAG.Sec24A	68
5.1.6.5	Analyse der Interaktion von Sec24A und L	70
5.1.6.6	Einfluss der Depletion von Sec24 auf die Freisetzung subviraler Partikel ..	72
5.2	Einfluss des ER-luminalen Chaperons BiP auf die duale Topologie des HBV L-Hüllproteins	75
5.2.1	Herstellung bicistronischer Vektoren	76
5.2.2	Nachweis der Expression der (Ko-) Chaperone BiP, BAP und ERdj4	77
5.2.3	Kontrolle der endogenen BiP - Konzentration	78
5.2.4	Die ektopische Expression von BAP destabilisiert die Bindung von L und BiP 80	
5.2.5	Einfluss der Ko-Chaperone BAP und ERdj4 auf die duale Topologie des L-Proteins	81
5.2.6	Einfluss der Depletion zellulären ATPs auf die duale Topologie des HBV L-Hüllproteins	82
5.3	Einfluss der Translokon-assoziierten Proteine Sec62 und Sec63 auf die posttranslationale Translokation des L-Hüllproteins	84
5.3.1	Herstellung von Sec62 - und Sec63 - Expressionskonstrukten	85
5.3.2	Nachweis der Expression von Myc.Sec62 und Myc.Sec63	85
5.3.3	Einfluss von Sec62 und Sec63 auf die duale Topologie des L-Hüllproteins ...	86
5.3.4	Sec63 und Sec62 beeinflussen die Freisetzung subviraler Partikel	88
6	<i>Diskussion</i>.....	92
6.1	Betrachtung des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems.....	92
6.2	Analyse der Interaktionspartner Bet1 und Sec24A	99
6.3	Einfluss des ER-luminalen Chaperons BiP und der Translokon-assoziierten Proteine Sec62 und Sec63 auf die duale Topologie des L-Hüllproteins	103
7	<i>Zusammenfassung</i>.....	111
8	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	113
9	<i>Abbildungsverzeichnis</i>.....	125
	<i>Publikationen</i>.....	127
	<i>Kongressbeiträge</i>	127
	<i>Lebenslauf</i>	128
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>.....	129
	<i>Danksagung</i>.....	130

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cccDNA	kovalent geschlossene, zirkuläre DNA (<i>covalently closed circularDNA</i>)
CoPII	<i>Coatomer protein complex-II</i>
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
g	Gramm
x g	x fache Erdbeschleunigung
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B - Virus
HEPES	2-Hydroxyethylenpiperazin-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria broth</i>

Leu	Leucin
mA	Milliampere (10^{-3} A)
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mM	Millimolar (10^{-3} M)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
min	Minute(n)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Proteinase Inhibitor
PNGaseF	Peptid:N-Glykosidase F
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TMD	Transmembrandomäne
Trp	Tryptophan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
μ l	Mikroliter (10^{-6} l)
μ g	Mikrogramm (10^{-6} g)
vgl.	zum Vergleich
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis B - Virus

Das Hepatitis B - Virus (HBV) ist der Prototyp der Familie der Hepadnaviridae. Es zeichnet sich durch eine hohe Wirts- und Leberspezifität aus. Bislang sind acht Genotypen (A-H) mit unterschiedlicher geographischer Verteilung bekannt. In weiten Teilen Südostasiens, im Nahen und Mittleren Osten sowie in Zentral- und Südafrika kommt HBV endemisch vor. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) zeigen weltweit ca. zwei Milliarden Menschen Anzeichen einer bestehenden oder abgeklungenen HBV - Infektion, wobei die Anzahl chronisch Infizierter bei ca. 350 Millionen liegt. Das Hepatitis B - Virus wird durch infiziertes Blut, ungeschützten Geschlechtsverkehr sowie perinatal von der Mutter auf das Neugeborene übertragen.

Eine Infektion mit dem Hepatitis B - Virus verläuft in ca. ein Drittel der Fälle inapparent. Bei einem akuten Verlauf treten Symptome wie Gelbfärbung der Haut, dunkler Urin, extreme Müdigkeit, Schmerzen im Oberbauch, Durchfall und Erbrechen auf. Sehr selten, in ca. 1 % der Fälle, nimmt die Krankheit aufgrund einer Überreaktion des Immunsystems einen fulminanten, tödlichen Verlauf. Zum Nachweis einer HBV - Infektion wird Patientenblut auf die viralen Marker HBs-Antigen, HBe-Antigen sowie HBV-DNA getestet. Bei einer akuten Hepatitis B - Infektion wird aufgrund der hohen spontanen Heilungsrate keine spezifische antivirale Therapie durchgeführt. Sie heilt nach ca. zwei bis sechs Wochen vollständig aus, was durch das Auftreten von anti-HBs Antikörpern im Blut des Patienten nachgewiesen wird. In ca. 5-10 % der Infektionen entwickelt sich eine chronische Hepatitis, bei der das Virus länger als sechs Monate persistiert. Besonders gefährdet sind Neugeborene, die sich während der Geburt bei ihrer Mutter anstecken. Sie entwickeln in ca. 90 % der Fälle eine chronische Hepatitis, welche zur Ausbildung einer Leberzirrhose und im fortgeschrittenen Stadium zum hepatozellulären Karzinom führen kann. Die als Folge einer HBV - Infektion auftretende Leberzellschädigung beruht nicht auf einer zytopathischen Wirkung des Virus, sondern auf der zellulären und humoralen Immunantwort des Betroffenen. Die Therapiemöglichkeiten bei einer chronischen Hepatitis B - Infektion beschränken sich auf die Gabe von Interferon α oder Nukleosid - Analoga (z.B. Lamivudin, Entecavir), welche die Symptome lindern, die Infektion aber nicht heilen können. Selten kommt es bei einer HBV - Infektion, ähnlich wie bei Retroviren, zu einer Integration der viralen DNA in das Genom des Patienten (Koshy *et*

al., 1983). Sie begünstigt die Chronifizierung der Krankheit und kann bei mehr als 85 % der Patienten mit hepatozellulärem Karzinom nachgewiesen werden, so dass HBV zu den krebserregenden Viren gezählt wird (Brechot *et al.*, 1980).

Seit 1984 ist ein effektiver und gut verträglicher Impfstoff gegen HBV vorhanden (McAleer *et al.*, 1984). Zum einen besteht die Möglichkeit der aktiven Immunisierung mit einem rekombinanten Impfstoff, der in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hergestelltes HBs-Antigen enthält. Zum anderen besteht die Möglichkeit der passiven Immunisierung mit Hepatitis B - Immunglobulin als Postexpositionsprophylaxe sowie bei Neugeborenen HBsAg-positiver Mütter.

1.1.1 Aufbau von Hepatitis B - Virionen

Das Hepatitis B - Virus ist ein umhülltes Virus mit partiell-doppelsträngigem DNA-Genom. Nach ihrem Entdecker werden die ca. 42 nm großen Virionen (Abb. 1-1) auch *Dane* - Partikel genannt (Dane *et al.*, 1970).

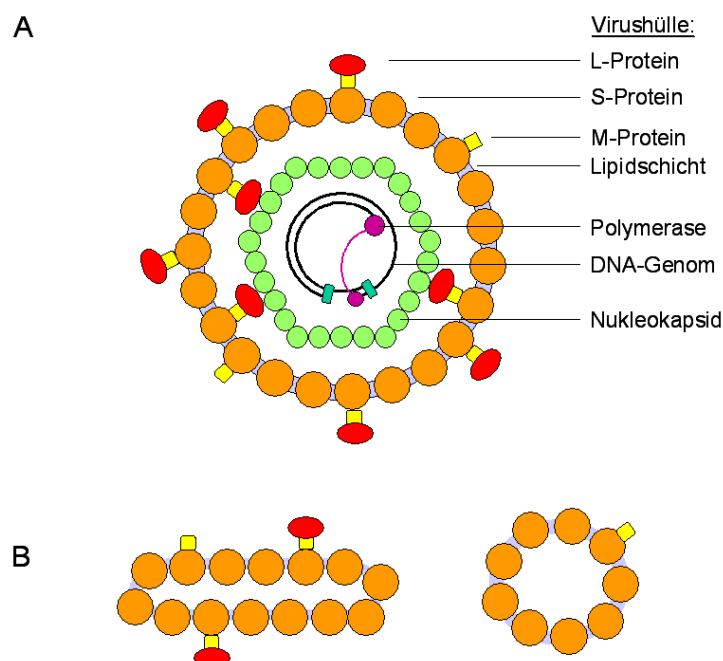


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung von Hepatitis B - Virionen (A) und subviralen Partikeln (B). In die Lipidschicht der Virushülle ist das Oberflächenprotein HBsAg eingelagert. Es kommt in drei Ausprägungsformen, dem kleinen S-, dem mittleren M- und dem großen L-Hüllprotein vor. Die Hülle umgibt das ikosaedrische Nukleokapsid, welches aus dem Core-Protein aufgebaut ist. Das HBV-Genom besteht aus partiell-doppelsträngiger DNA und ist mit der viralen Polymerase assoziiert. Subvirale Partikel bestehen nur aus der Virushülle und sind defizient für das Nukleokapsid. Modifiziert nach Glebe und Urban, 2007.

In die Lipidschicht der viralen Hüllmembran sind drei Proteine, das kleine S-, das mittlere M- und das große L-Hüllprotein eingelagert (vgl. Kapitel 1.1.2). Zusammen werden sie als HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*) bezeichnet. Die Virushülle umschließt das ikosaedrische Nukleokapsid, welches in zwei Ausprägungsformen vorkommt. Die kleinere Form besteht aus 90 Dimeren des Core-Proteins und weist einen Durchmesser von ca. 30 nm auf, wohingegen die größere Form aus 120 Dimeren des Core-Proteins besteht und einen Durchmesser von ca. 34 nm besitzt (Crowther *et al.*, 1994; Kenney *et al.*, 1995). Während der Kapsidbildung werden neben prägenomischer RNA mit kovalent gebundener viraler Polymerase auch zelluläre Faktoren wie das Chaperon Hsp90 (Hu *et al.*, 2004) und die Proteinkinase C (Kau und Ting, 1998) verpackt. Im Kapsid liegt das virale Genom vor, ein partiell-doppelsträngiges DNA-Genom, welches mit 3,2 kb zu den kleinsten viralen Genomen zählt (vgl. Kapitel 1.1.3) (Robinson, 1977; Galibert *et al.*, 1979).

Neben infektiösen Viruspartikeln werden bei einer HBV - Infektion sog. subvirale Partikel in einem ca. 10.000 fachen Überschuss produziert (Bruss, 2007). Sie ermöglichen es dem Virus, dem Immunsystem zu entkommen. Subvirale Partikel bestehen aus der viralen Hüllmembran und sind defizient für das Nukleokapsid (Abb. 1-1). Sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 22 nm haben das kleine HBs-Antigen und in geringem Maße das mittlere HBs-Antigen in ihre Lipidschicht integriert. In Filamenten variabler Länge findet sich auch das große HBs-Antigen (Heermann *et al.*, 1984).

1.1.2 Die HBV - Hüllproteine

Das kleine S-, das mittlere M- und das große L- Hüllprotein des Hepatitis B - Virus werden von einem offenen Leserahmen mit drei unterschiedlichen Startstellen für die Translation kodiert (Abb. 1-2). Allen drei Hüllproteinen gemeinsam ist die Sequenz des kleinen S-Hüllproteins, welche 226 Aminosäuren umfasst. Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle an Asparaginrest (Asn) 146 wird partiell genutzt (Heermann *et al.*, 1984). Das mittlere M-Hüllprotein weist eine N-terminale Extension von 55 Aminosäuren auf, die als PräS2-Region bezeichnet wird und ebenfalls eine N-Glykosylierungsstelle (Asn 4) besitzt. Das große L-Hüllprotein weist eine weitere N-terminale Extension von 108 Aminosäuren (Subtyp ayw) auf, welche als PräS1-Region bezeichnet wird (Heermann *et al.*, 1984). Die PräS1-Region wird am Glycinrest der Position zwei mit einer Myristinsäure modifiziert, wodurch sie in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert wird (Persing *et al.*, 1987). Die Myristylierung scheint für die Infektiosität, nicht aber für den Zusammenbau von

Viruspartikeln essentiell zu sein (Macrae *et al.*, 1991; Gripon *et al.*, 1995). Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass der Bereich von Aminosäure 1-77 der PräS1-Region für die HBV - Infektion nötig ist, wobei Aminosäure 9-18 essentiell für die Bindung an den zellulären Rezeptor sind (Glebe und Urban, 2007). Der C-terminale Bereich der PräS1-Region (AS 92-108) und der N-terminale Bereich der PräS2-Region (AS 1-5) scheinen für die Verpackung des Nukleokapsids und damit den Zusammenbau der Viruspartikel essentiell zu sein (Bruss und Vieluf, 1995; Bruss, 1997; Glebe und Urban, 2007).

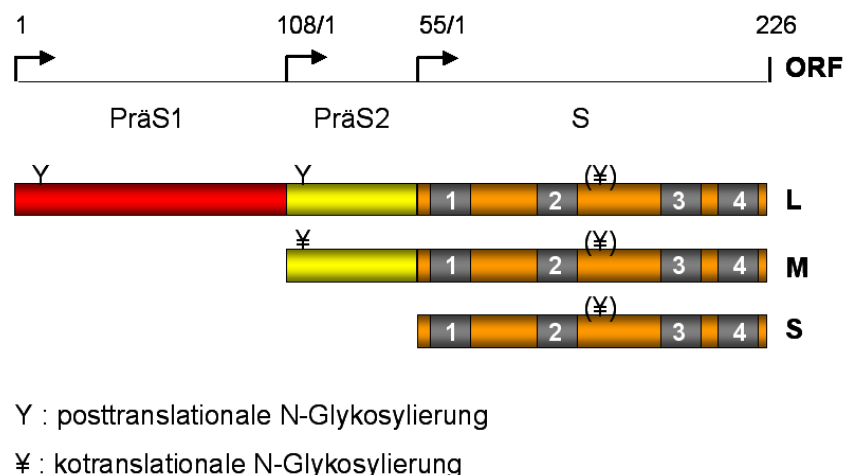


Abbildung 1-2: Aufbau des kleinen S-, mittleren M- und großen L-Hüllproteins von HBV (Subtyp ayw). Die drei Hüllproteine werden von einem offenen Leserahmen (ORF) mit drei unterschiedlichen Startpunkten für die Translation kodiert. C-terminal stimmen sie in der Sequenz des S-Proteins überein, die an Asn 146 partiell N-glykosyliert wird. Transmembrandomänen sind grau dargestellt. Das M-Protein besitzt eine N-terminale Extension, die sog. PräS2-Region mit einer weiteren N-Glykosylierungsstelle an Asn 4. Zusätzlich zur PräS2-Region weist das große L-Hüllprotein die PräS1-Region auf und wird posttranslational an Asn 4 und Asn 112 N-glykosyliert. Modifiziert nach Lambert und Prange, 2001.

Die drei Hüllproteine werden an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebildet und können unter Ausbildung von Disulfidbrücken sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden (Mangold und Streeck, 1993; Wunderlich und Bruss, 1996; Mangold *et al.*, 1997). Die Insertion des kleinen S-Hüllproteins in die ER-Membran erfolgt kotranslational durch ein N-terminales Signalpeptid (AS 8-22), welches nicht abgespalten wird. Des Weiteren weist S eine interne Signalankersequenz (AS 80-98) auf (Eble *et al.*, 1987; Bruss, 2007). Die Topologie des C-terminalen Bereiches von S wurde bislang nicht vollständig aufgeklärt. Die luminaire Orientierung C-terminal fusionierter Domänen sowie Computer-basierte Strukturmodelle lassen den C-Terminus im ER-Lumen erwarten, so dass sich eine Topologie mit vier Transmembrandurchgängen für das S-Hüllprotein ergibt (Abb. 1-3) (Eble *et al.*, 1987; Stirk *et al.*, 1992; Berting *et al.*, 1995).

Das M-Hüllprotein weist die gleiche Transmembrantopologie wie das S-Hüllprotein auf. In der PräS-Region (PräS1 plus PräS2) selbst befinden sich keine topogenen Signale, so dass sowohl das M- als auch das L-Hüllprotein mittels der Signalsequenzen des S-Hüllproteins in die Membran des ERs inseriert werden (Eble *et al.*, 1990). Während der kotranslationalen Translokation der PräS2-Region in das ER-Lumen wird diese an dem Asparaginrest vier N-glykosyliert (Werr und Prange, 1998). Neben einfach glykosylierten M-Hüllproteinen finden sich aufgrund der partiellen N-Glykosylierung innerhalb der S-Region auch zweifach N-glykosylierte Formen. Zusätzlich konnte für einige HBV - Genotypen eine O-Glykosylierung im Bereich der PräS2-Region beobachtet werden (Schmitt *et al.*, 2004). Das M-Hüllprotein scheint allerdings sowohl für die Virusbildung als auch die Infektion entbehrlich zu sein (Bruss und Ganem, 1991; Fernholz *et al.*, 1993).

In dieser Arbeit stand das große L-Hüllprotein des Hepatitis B - Virus im Mittelpunkt. L bildet eine ungewöhnliche duale Topologie in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums aus, welche auch im reifen Viruspartikel erhalten bleibt (Ostapchuk *et al.*, 1994; Bruss *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995). Aufgrund seiner dualen Topologie kann L vielfältige Funktionen, wie z.B. die Bindung an den Leberzell - Rezeptor in der frühen Phase der Infektion (Neurath *et al.*, 1986) oder die Umhüllung des Nukleokapsids in der späten Phase der Infektion, ausüben (Bruss und Ganem, 1991; Bruss und Vieluf, 1995). Bislang sind nur sehr wenige polytope Membranproteine mit multipler Topologie bekannt (von Heijne, 2006). In eukaryotischen Zellen zählen hierzu Ductin (Dunlop *et al.*, 1995), der Multidrug - Transporter namens P-Glykoprotein (Sadlish und Skach, 2004) und Aquaporin-1 (Lu *et al.*, 2000). Das L-Hüllprotein unterscheidet sich von ihnen dadurch, dass die Ausbildung multipler Topologien in der Regel kotranslational erfolgt, beim L-Hüllprotein hingegen in einem posttranslationalen Reifungsprozess. Des weiteren ist der partielle Charakter der posttranslationalen Translokation bemerkenswert, der in der Ausbildung der dualen Topologie und damit der Multifunktionalität des L-Hüllproteins resultiert. Während seiner Synthese wird L zunächst kotranslational in die ER-Membran integriert, was durch die topogenen Signale im Bereich der S-Region vermittelt wird (Eble *et al.*, 1990). Die hydrophile PräS-Region verbleibt zunächst auf der zytosolischen Seite der Membran, was dem Virusinneren entspricht (Abb. 1-3). Während des Reifungsprozesses des L-Proteins erfolgt eine partielle posttranslationale Translokation der PräS-Region in das ER-Lumen, was dem Virusäußeren entspricht.

L wird während seiner Synthese partiell im Bereich der S-Region (Asn 146) N-glykosyliert. Zusätzlich weist die PräS-Region zwei weitere potentielle N-Glykosylierungsstellen auf (Asn

4, Asn 112), welche posttranslational mit N-Glykanen versehen werden können (Lambert und Prange, 2007).

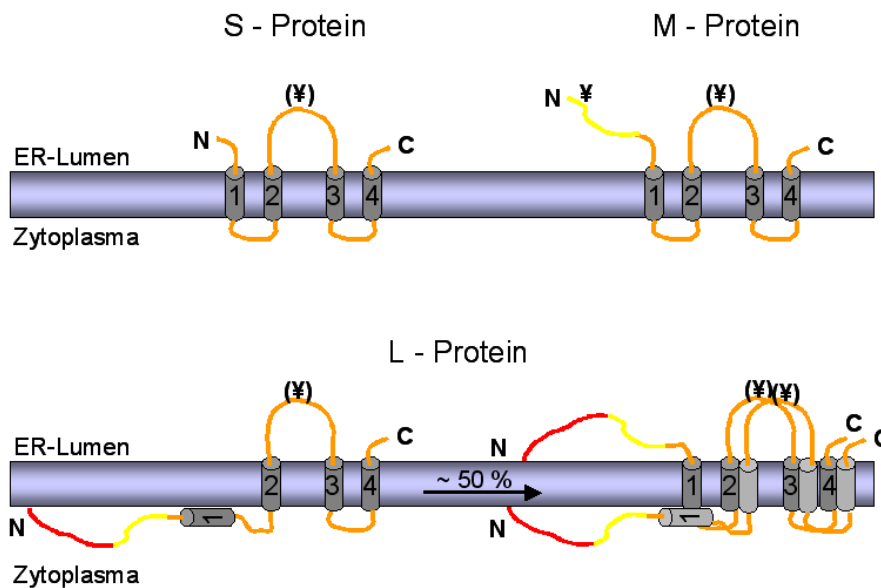


Abbildung 1-3: Topologie der HBV-Hüllproteine. Das kleine und mittlere Hüllprotein weisen eine vergleichbare Membrantopologie auf. Sie besitzen vier Transmembrandomänen, wobei ihr N- und C-Terminus in das Lumen des ERs ragt. Das große Hüllprotein bildet eine ungewöhnliche duale Topologie in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums aus, welche im reifen Viruspartikel erhalten bleibt. Die PräS-Region liegt zunächst auf der zytosolischen Seite der Membran vor. Mit der Reifung des L-Proteins werden ca. 50 % der PräS-Regionen posttranslational in das Lumen des ERs transloziert. Modifiziert nach Lambert und Prange, 2001.

Bislang sind nur wenige Faktoren bekannt, die den Prozess der posttranslationalen Translokation der PräS-Region regulieren. Virale Faktoren, wie das kleine und mittlere Hüllprotein scheinen für die Translokation entbehrlich zu sein (Lambert und Prange, 2001). Auch die kovalent gebundene Myristinsäure oder die Disulfidbrücken-vermittelte Dimerisierung spielen bei der Ausbildung der dualen Topologie keine Rolle (Prange und Streeck, 1995; Swameye und Schaller, 1997; Lambert und Prange, 2001).

Die zytosolischen Chaperone Hsc70 und Hsp40 binden an die PräS1-Region und verhindern so eine kotranslationale Translokation, wodurch die partielle posttranslationale Translokation ermöglicht wird (Löffler-Mary *et al.*, 1997; Lambert und Prange, 2003). Des weiteren konnte eine Bindung des ER-luminalen Chaperons BiP an die PräS1-Region beobachtet werden (Cho *et al.*, 2003; Lambert und Prange, 2003). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, trägt die Interaktion von BiP mit dem L-Hüllprotein entscheidend zur Ausbildung der dualen Topologie bei (Awe *et al.*, 2008).

1.1.3 Das HBV - Genom

Das Hepatitis B - Virus enthält ein partiell-doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von ca. 3,2 kb (Robinson, 1977; Galibert *et al.*, 1979). Der vollständige Minusstrang liegt nicht geschlossen vor und enthält an seinem 5'-Ende das Terminale Protein der viralen Polymerase kovalent gebunden (Abb. 1-4) (Bartenschlager und Schaller, 1988). Er ist der kodogene Strang und wird im Verlauf der viralen Replikation transkribiert. Das Genom reifer Virionen wird aufgrund seiner zirkulären, entspannten Form auch als rcDNA (*relaxed circular DNA*) bezeichnet. Der Plusstrang liegt unvollständig vor und weist eine variable Länge von ca. 50-75 % des Minusstrangs auf. An seinem 3'-Ende ist er nicht-kovalent mit der Reversen Transkriptase assoziiert. Plus- und Minusstrang weisen kurze Sequenzwiederholungen (DR; *direct repeat*) an ihrem 5'-Ende auf, welche bei der Replikation der viralen DNA von Bedeutung sind (Will *et al.*, 1987).

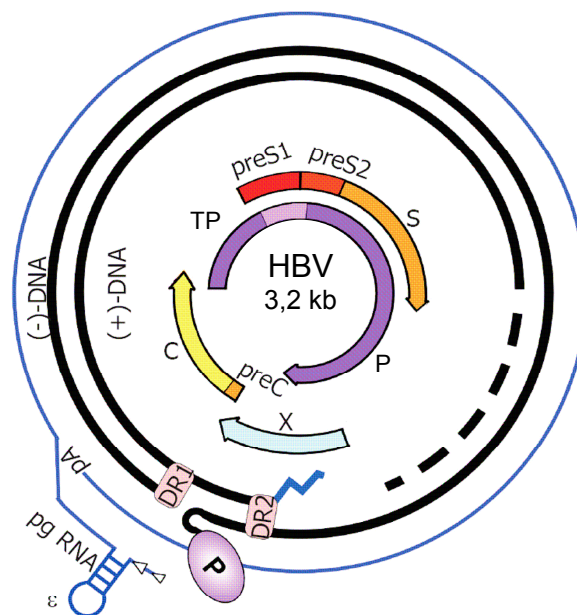


Abbildung 1-4: Genomorganisation des Hepatitis B - Virus. HBV besitzt ein partiell-doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von ca. 3,2 kb. Der kodogene Minusstrang liegt vollständig, aber nicht geschlossen vor und ist an seinem 5'-Ende kovalent mit dem Terminalen Protein der viralen Polymerase verknüpft. Der nicht-kodogene Plusstrang liegt unvollständig vor. Die vier offenen Leserahmen (env, C, P, X) kodieren für die viralen Proteine. Modifiziert nach Beck und Nassal, 2007.

Das virale Genom weist vier, sich teilweise überlappende offene Leserahmen (ORF; *open reading frame*) auf, den env-, C-, P- und X-ORF (Ganem und Varmus, 1987). Diese kodieren für die drei Hüllproteine (S, M und L), das (Prä)Core-Protein, das P-Protein sowie das

transaktivierende X-Protein. Neben den kodierenden Bereichen gibt es Kontrollsequenzen für die Regulation der Transkription, wobei Promotor- und Enhancer-Elemente durch leberspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Schaller und Fischer, 1991). Während der Replikation werden drei verschiedene mRNA-Klassen durch die zelluläre RNA-Polymerase II gebildet, darunter auch die prägenomische RNA (pgRNA) (Rall *et al.*, 1983; Beck und Nassal, 2007).

1.1.4 Der Infektionszyklus und Replikation von HBV

Bis vor wenigen Jahren stellten primäre humane Hepatozyten (Gripon *et al.*, 1988) die einzige Möglichkeit dar, den HBV-Infektionszyklus (Abb. 1-5) zu untersuchen. Viele Faktoren der Virusbindung und -aufnahme sind deshalb noch relativ unerforscht. Die Entdeckung, dass sich Kulturen primärer Hepatozyten des Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* mit HBV infizieren lassen (Köck *et al.*, 2001) und die Entwicklung der humanen Hepatoma Zelllinie HepaRG, welche nach Induktion der Differenzierung ebenfalls mit HBV infizierbar ist (Gripon *et al.*, 2002), sind Meilensteine in der Erforschung der frühen Schritte der HBV-Infektion. Spätere Schritte der HBV-Infektion, wie Replikation und Virusproduktion, konnten durch die Transfektion klonierter HBV-Genome in humane Leberzelllinien (HepG2, HuH7) aufgeklärt werden (Sureau *et al.*, 1986; Ochiya *et al.*, 1989).

Die Bindung des Hepatitis B-Virus an Leberzellen erfolgt vermittelt durch die PräS-Region des großen L-Hüllproteins (Neurath *et al.*, 1986; Klingmüller und Schaller, 1993; Urban *et al.*, 1998). Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) scheinen für die initiale Assoziation von HBV an die Leberzelle verantwortlich zu sein (Zahn und Allain, 2005; Schulze *et al.*, 2007; Leistner *et al.*, 2008). Als spezifischer Rezeptor wurden mehrere Kandidaten vorgeschlagen, wie z.B. Interleukin 6 (Neurath *et al.*, 1992), der Asialoglykoprotein-Rezeptor (Treichel *et al.*, 1994) oder die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Petit *et al.*, 1992). Bislang konnte allerdings keiner von ihnen als HBV-spezifischer Rezeptor bestätigt werden.

Die Aufnahme des Virus erfolgt vermutlich durch Rezeptor-vermittelte Endozytose, wobei die Freisetzung des viralen Nukleokapsids aus dem endosomalen Kompartiment pH-unabhängig verläuft (Köck *et al.*, 1996; Funk *et al.*, 2006). Der intrazelluläre Transport zum Zellkern erfolgt entlang von Mikrotubuli, wobei bislang ungeklärt ist, ob das Nukleokapsid selbst oder das Endosom mit den Mikrotubuli assoziiert (Funk *et al.*, 2007).

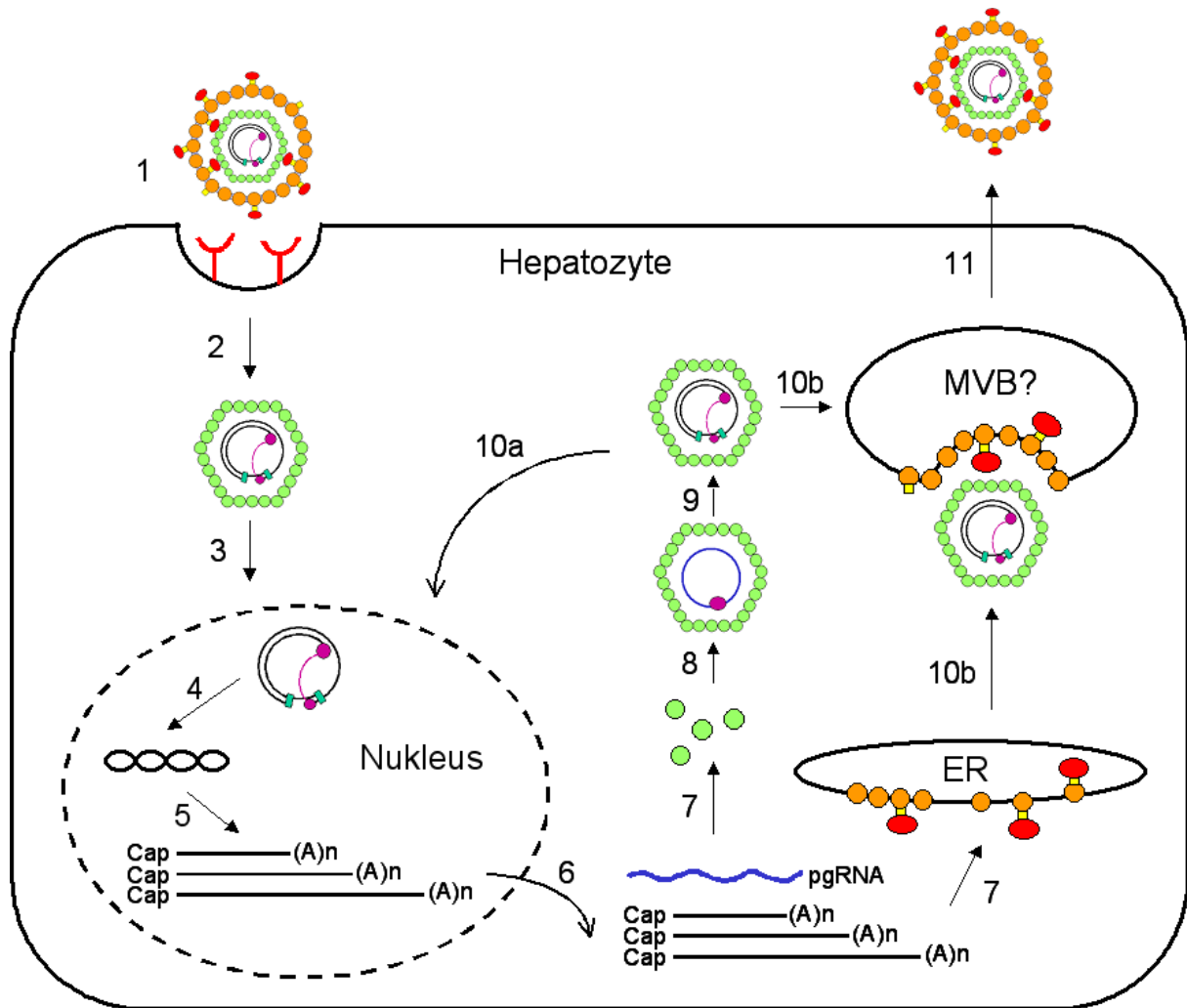


Abbildung 1-5: Infektionszyklus und Replikation des Hepatitis B - Virus. (1) Die Bindung von HBV an Leberzellen erfolgt durch die PräS-Region des L-Hüllproteins an einen bislang unbekanntem Rezeptor. (2) Die Virusaufnahme erfolgt vermutlich durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Daraufhin wird das Nukleokapsid vom endosomal Kompartiment in das Zytosol entlassen. (3) Der intrazelluläre Transport zum Zellkern erfolgt entlang von Mikrotubuli. (4) Nach dem Import des viralen Genoms in den Nukleus wird dieses in die kovalent geschlossene cccDNA (*covalently closed circular DNA*) umgewandelt. (5) Die cccDNA wird vermittelt durch die zelluläre RNA - Polymerase II in drei mRNA - Klassen transkribiert, (6) welche in das Zytosol exportiert werden. (7) Die viralen Proteine werden an freien Ribosomen translatiert, bis auf die Hüllproteine, welche an der Membran des ERs synthetisiert werden. (8) Core-Dimere assemblieren mit der viralen Polymerase und der prägenomischen RNA (pgRNA) zu Ribonukleoprotein - Partikeln, (9) in denen die pgRNA revers in das virale Genom transkribiert wird. (10a/b) Reife Nukleokapside gelangen erneut in den Zellkern oder werden von den viralen Hüllproteinen an einem post-ER, prä-Golgi Kompartiment umschlossen. (11) Virionen verlassen die Leberzelle in einem nicht lytischen Prozess. Modifiziert nach Funk *et al.*, 2007.

Nach dem Import des viralen Genoms in den Zellkern (Rabe *et al.*, 2003) wird dieses in die zirkuläre, kovalent geschlossene cccDNA (*covalently closed circular DNA*) umgeformt, welche episomal im Nukleus vorliegt (Newbold *et al.*, 1995). Die cccDNA wird vermittelt durch die zelluläre RNA - Polymerase II in drei mRNA - Klassen transkribiert. Diese weisen eine 5'-Cap Struktur sowie einen 3'-Poly(A) Schwanz auf (Rall *et al.*, 1983). Sie kodieren für die viralen Proteine und beinhalten die prägenomische RNA (pgRNA). Nach dem Export der viralen mRNA in das Zytosol werden das Core-, das P- und X-Protein an freien

Ribosomen translatiert, wohingegen die viralen Hüllproteine an der ER-Membran synthetisiert werden. Die Core - Dimere assemblieren zusammen mit der viralen Polymerase und der prägenomischen RNA zu Ribonukleoprotein - Partikeln (Zhou und Standring, 1992), in denen die pgRNA revers in das virale Genom transkribiert wird. In der frühen Phase der Infektion werden die reifen Nukleokapside zum Nukleus zurück transportiert und tragen dort zum cccDNA - Pool bei. In der späten Phase der Infektion, wenn bereits große Mengen des L-Hüllproteins vorliegen, werden die reifen Nukleokapside an einem bislang unbekanntem, post-ER, prä-Golgi Kompartiment von der viralen Hüllmembran umgeben (Huovila *et al.*, 1992). Dabei rücken Multivesikuläre Endosomen (MVB; *multivesicular body*) als Ort des Viruszusammenbaus zunehmend in den Mittelpunkt der aktuellen Forschung (Rost *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2007). Bei einer natürlichen HBV - Infektion werden pro Tag ein bis zehn Viruspartikel pro Leberzelle in einem nicht-lytischen Prozess freigesetzt (Nowak *et al.*, 1996). In Abwesenheit reifer Nukleokapside besitzen die Hüllproteine die Fähigkeit, nicht infektiöse, subvirale Partikel an der Membran des Intermediärkompartiments zwischen ER und Golgi - Apparat zu bilden, welche die Zelle über den konstitutiven, sekretorischen Weg verlassen (Patient *et al.*, 2007).

1.2 Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum

Wie in Kapitel 1.1.2 dargestellt, beinhaltet die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins neben der kotranslationalen Translokation und Integration der S-Region in die ER-Membran auch eine partielle posttranslationale Translokation der PräS-Region. Diese wird vermutlich durch die zelluläre Translokationsmaschinerie vermittelt. Da die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins einen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt, werden die Mechanismen der ko- und posttranslationalen Translokation im Folgenden kurz vorgestellt.

Das Endoplasmatische Retikulum übt eine wichtige Funktion in der Proteinbiosynthese (Palade, 1975; Blobel und Dobberstein, 1975), in der Signaltransduktion (Zhang und Kaufman, 2004) und als Calciumspeicher (Meldolesi und Pozzann, 1998) aus. Etwa ein Drittel der zellulären Proteine wird bei der Synthese kotranslational in das Lumen des rauhen ERs transloziert bzw. in die ER-Membran integriert. Hierzu zählen sekretorische Proteine, solche, die in Kompartimenten des sekretorischen Weges lokalisiert sind und die meisten

Membranproteine. Ein N-terminales, z.T. auch intern vorliegendes, hydrophobes Signalpeptid dient als Erkennungssequenz für den kotranslationalen Proteinimport in das ER (Blobel und Sabatini, 1971). Der Signalerkennungspartikel (SRP; *signal recognition particle*) bindet an das Signalpeptid der naszierenden Polypeptidkette, sobald dieses aus dem Ribosom in das Zytoplasma ragt und bindet daraufhin an seinen Rezeptor in der ER-Membran (Walter und Blobel, 1981). Das Ribosom mit naszierender Polypeptidkette wird daraufhin an den heterotrimeren Sec61 - Komplex (Sec61 α , Sec61 β , Sec61 γ) übergeben, welcher das Translokon, eine wässrige Pore innerhalb der ER-Membran, ausbildet (Simon und Blobel, 1991; Crowley *et al.*, 1993; Osborne *et al.*, 2005). Die Hydrolyse von GTP wird für die Elongation der wachsenden Polypeptidkette durch das Ribosom benötigt, die Translokation durch den Sec61 - Komplex selbst benötigt keine Energie (Connolly und Gilmore, 1986). Das Ribosom stellt damit den wichtigsten Partner des Translokons während der kotranslationalen Translokation dar, da es die Antriebskraft für die Translokation liefert (Osborne *et al.*, 2005; Rapoport, 2007). Bereits bei der Insertion der naszierenden Polypeptidkette in das Translokon übt das ER-luminale Chaperon BiP eine entscheidende Funktion aus, indem es den Sec61 - Komplex bei einer Kettenlänge von ca. 70 Aminosäuren öffnet (Dierks *et al.*, 1996). Es hält außerdem neben dem Ribosom die Permeabilitätsbarriere während der Translokation aufrecht, um einen unkontrollierten Ausstrom von Calcium - Ionen aus dem ER zu verhindern (Hamman *et al.*, 1998; Haigh und Johnson, 2002). Sobald die naszierende Polypeptidkette in das ER-Lumen ragt, werden N-terminale Signalpeptide durch die Signalpeptidase entfernt und die Polypeptidkette durch die Bindung von BiP an einem Zurückgleiten in das Zytoplasma gehindert (Liebermeister *et al.*, 2001; Tyedmers *et al.*, 2003). BiP ist für die kotranslationale Translokation in der Hefe essentiell. Ob BiP ebenfalls bei Säugern an der Translokation der naszierenden Polypeptidketten beteiligt ist oder ob nur ein Teil der Substrate auf BiP angewiesen ist, konnte bislang nicht geklärt werden (Dudek *et al.*, 2009). Noch während der Translokation beginnt die Modifikation der wachsenden Polypeptidkette mit N-Glykanen durch Oligosaccharyltransferasen, die Ausbildung von Disulfidbrücken durch Thiol - Oxidoreduktasen sowie die Chaperon-vermittelte Faltung und Zusammenlagerung zu multimeren Proteinkomplexen (Buck *et al.*, 2007). Eine fehlerhafte Faltung oder Oligomerisierung von Polypeptiden kann durch Mutationen oder ER-Stress hervorgerufen werden. Diese nicht-nativen Proteine werden von den Chaperonen des ERs erkannt und in das Zytosol exportiert, um Proteasom-vermittelt abgebaut zu werden (ERAD; *ER-associated degradation*) (Nishikawa *et al.*, 2005; Ron und Walter, 2007).

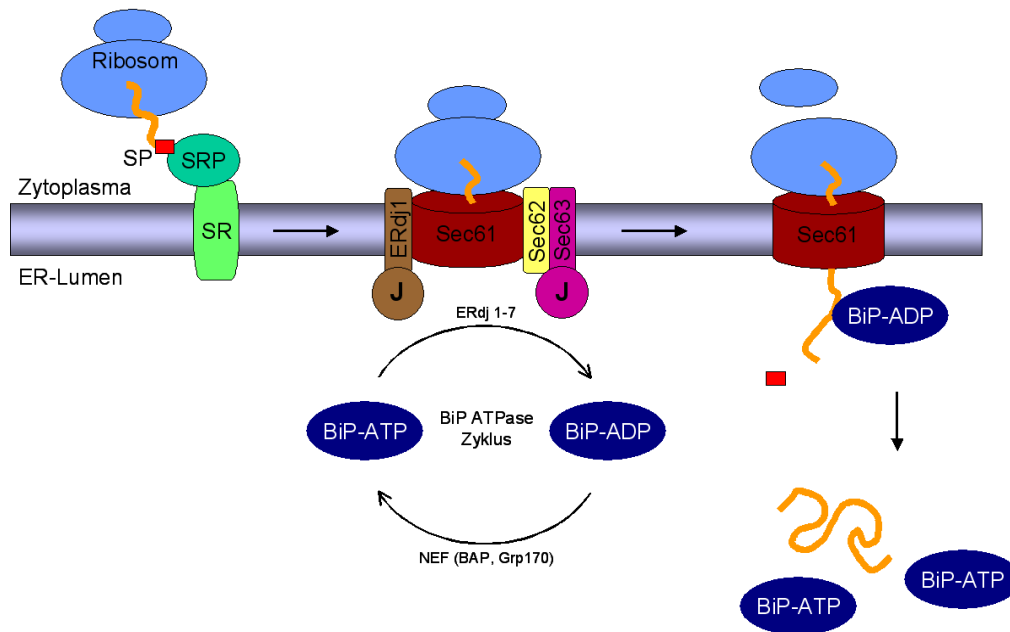


Abbildung 1-6: Modell der kotranslationalen Translokation in Eukaryoten. Der Signalerkennungspartikel (SRP) bindet an das Signalpeptid (SP) der naszierenden Polypeptidkette. Nach Bindung an seinen membranständigen Rezeptor (SR) wird der Komplex aus Ribosom und naszierender Polypeptidkette an das Sec61 - Translokon übergeben. Unter Vermittlung des ER-luminalen Chaperons BiP und seiner Ko-Chaperone gelangt die Polypeptidkette in das ER-Lumen. Dort spaltet die Signalpeptidase N-terminale Signalpeptide ab. Noch während der Translokation beginnt die Faltung und Oligomerisierung der wachsenden Polypeptidkette. Abkürzungen: ERdj, *ER-localized DnaJ-domain containing protein*; J, J-Domäne; NEF, Nukleotid-Austauschfaktor. Modifiziert nach Dudek *et al.*, 2009.

Integrale Membranproteine besitzen interne Stopp - Transfer - Membranankersequenzen und verlassen das Sec61 - Translokon lateral in die Lipiddoppelschicht (van den Berg *et al.*, 2004). Ihre Orientierung wird sowohl durch die Länge und Aminosäurezusammensetzung der internen Signalankersequenzen als auch durch die Verteilung geladener Aminosäurereste im Grenzbereich zur Transmembrandomäne beeinflusst (von Heijne, 2006).

Einige Proteine werden erst nach vollendeter Synthese transloziert. Dieser als posttranslationale Translokation bezeichnete Prozess ist in Hefen und Bakterien häufig anzutreffen, in Säugern allerdings noch relativ unerforscht (Brodsky *et al.*, 1995). Zumeist werden kleine sekretorische Proteine mit einer Länge von ca. 70 Aminosäuren und lösliche Proteine mit schwach hydrophoben Signalsequenzen posttranslational transloziert, da diese der Erkennung durch den Signalerkennungspartikel entgehen (Ng *et al.*, 1996; Rapoport, 2007).

Durch die Bindung zytosolischer Chaperone liegt die Polypeptidkette nach Freisetzung vom Ribosom in ungefalteter und Transport-kompetenter Form vor (Plath und Rapoport, 2000). In der Hefe und möglicherweise allen Eukaryoten assoziiert der trimere Sec61p - Komplex mit

dem tetrameren Sec62p/Sec63p - Komplex (Sec62p, Sec63p, Sec71p, Sec72p) sowie dem ER-luminalen Chaperon Kar2p, dem Homolog von BiP (Deshaies *et al.*, 1991; Feldheim *et al.*, 1992; Panzner *et al.*, 1995; Brodsky *et al.*, 1995). Bis auf die zwei Untereinheiten Sec71p und Sec72p sind die eben genannten Komponenten essentiell und ausreichend für die posttranslationale Translokation in der Hefe. In Säugern konnten Homologe von Sec62p und Sec63p identifiziert werden, nicht aber von Sec71p und Sec72p (Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Nach der Bindung des zu translozierenden Substrates an den heptameren Sec - Komplex, werden die zytosolischen Chaperone freigesetzt (Plath und Rapoport, 2000).

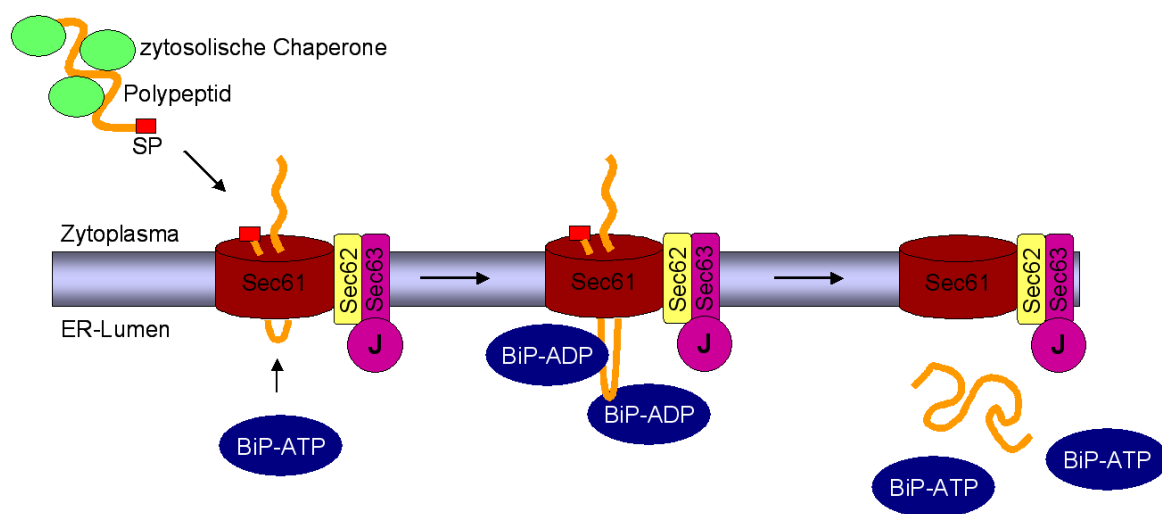


Abbildung 1-7: Modell der posttranslationalen Translokation in Eukaryoten. Die vollständig synthetisierte Polypeptidkette wird durch zytosolische Chaperone in Transport-kompetenter Form gehalten. Nach Signalpeptid (SP)-vermittelter Bindung des Polypeptids an das Sec61 - Translokon lösen sich die zytosolischen Chaperone ab. Das ER-luminale Chaperon BiP wird durch die J-Domäne (J) von Sec63 aktiviert und wirkt daraufhin wie eine molekulare Ratsche. Dies stellt die Antriebskraft für die posttranslationale Translokation der Polypeptidkette in das ER-Lumen. Modifiziert nach Rapoport, 2007.

Die Antriebskraft der posttranslationalen Translokation wird durch das ER-luminale Chaperon Kar2p/ BiP geliefert. Dieses wird durch die J-Domäne von Sec63p, welche unmittelbar neben dem Translokon lokalisiert ist, aktiviert und wirkt daraufhin wie eine molekulare Ratsche (Corsi und Schekman, 1997; Matlack *et al.*, 1999). Durch Brownsche Molekularbewegung gelangt die Polypeptidkette in das ER-Lumen und wird durch die Bindung von Kar2p an einem Zurückgleiten in das Zytoplasma gehindert. Nach vollständiger Translokation öffnet sich die Substratbindedomäne, so dass die Polypeptidkette in das ER-Lumen freigesetzt wird und ihre native Konformation einnehmen kann (vgl. Kapitel 1.3).

1.3 Das ER-luminale Chaperon BiP

Zelluläre Chaperone sind entscheidend an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins beteiligt. Für das zytosolisch vorliegende Hsc70 und sein Ko-Chaperon Hsp40 konnte gezeigt werden, dass sie durch ihre Bindung an die PräS-Region deren kotranslationale Translokation verhindern und sie in einem Transport-kompetenten Zustand halten (Löffler-Mary *et al.*, 1997; Lambert und Prange, 2003). Auch das ER-luminale Chaperon BiP bindet spezifisch an die PräS-Region (Cho *et al.*, 2003; Lambert und Prange, 2003). Die Bedeutung dieser Interaktion war allerdings bislang unbekannt und wurde erst im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

Das ER-luminale Chaperon BiP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) gehört zur Familie der Hitzeschockproteine 70 (Hsp70). Es ist auch unter dem Namen Grp78 (*glucose-regulated protein 78 kDa*) bekannt (Haas und Wabl, 1983; Munro und Pelham, 1986). Durch seine vielfältigen Funktionen nimmt es eine zentrale Position im ER ein. Hierzu zählen z.B. die Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere während der Proteintranslokation (Hamman *et al.*, 1998; Haigh und Johnson, 2002), die Faltung und Oligomerisierung von Proteinen (Meunier *et al.*, 2002; Kleizen und Braakman, 2004) sowie die Qualitätskontrolle im ER (Nishikawa *et al.*, 2005). Des Weiteren dient BiP als Sensor für ER-Stress und trägt zur Anreicherung der Calcium - Vorräte im ER bei (Hendershot, 2004; Zimmermann *et al.*, 2006). Dabei ist BiP von Interaktionspartnern, wie Chaperonen der Hsp40 - Proteinfamilie, Nukleotid - Austauschfaktoren und Signalmolekülen abhängig. Ein weiterer, deutlich seltener anzutreffender Vertreter der Hsp70 - Proteinfamilie im ER ist Grp170, welches als Nukleotid - Austauschfaktor von BiP beschrieben wurde (Steel *et al.*, 2004).

Chaperone der Hsp70 - Familie binden über ihre C-terminale Substratbindedomäne reversibel hydrophobe, ungefaltete Polypeptide. Die Substratbindung und -freisetzung wird durch die N-terminale Nukleotidbindedomäne, welche ADP oder ATP binden kann, reguliert (Flaherty *et al.*, 1990; Liberek *et al.*, 1991). BiP-ATP besitzt eine geringe Substrataffinität, während die ADP-gebundene Form eine hohe Substrataffinität aufweist (Flynn *et al.*, 1989; Ha und McKay, 1994; Buck *et al.*, 2007). Da BiP selbst nur eine niedrige intrinsische ATPase-Aktivität besitzt (McCarty *et al.*, 1995), ist es auf Ko-Chaperone der Hsp40 - Familie angewiesen. Diese stimulieren die ATPase Aktivität von BiP und ermöglichen hierdurch die Ausbildung eines stabilen BiP - Substrat - Komplexes (Caplan *et al.*, 1993; Cheetham und

Caplan, 1998; Hennessy *et al.*, 2005). Nukleotid - Austauschfaktoren, wie BAP (*BiP-associated protein*) und Grp170, fördern den Austausch von BiP-ADP zu BiP-ATP, wodurch es zur Freisetzung und anschließenden Faltung des gebundenen Substrates kommt (Chung *et al.*, 2002; Weitzmann *et al.*, 2006).

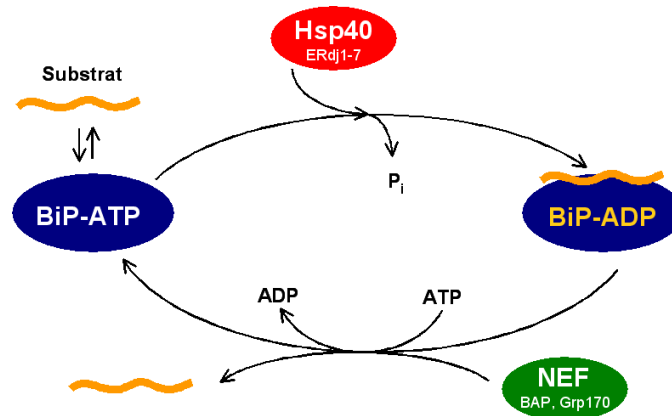


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des BiP ATPase - Zyklus. Der BiP ATPase - Zyklus wird durch das Zusammenwirken von Ko-Chaperonen der Hsp40 - Familie und Nukleotid - Austauschfaktoren (NEF) reguliert. In der ATP-gebundenen Form hat BiP nur eine geringe Substrataffinität, wohingegen die ADP-gebundene Form eine hohe Substrataffinität aufweist. Ko-Chaperone der Hsp40 - Familie (ERdj1-7) stimulieren die ATPase-Aktivität von BiP und fördern hierdurch die Ausbildung eines stabilen BiP - Substrat - Komplexes. Nukleotid - Austauschfaktoren (BAP, Grp170) führen zur Ablösung gebundenen ADPs und Neubindung von ATP, so dass es zur Freisetzung des Substrates kommt.

Im ER sind bislang sieben Ko-Chaperone der Hsp40 - Proteinfamilie, ER(d)j 1-7 (*ER-localized DnaJ-domain containing protein*), identifiziert worden (Dudek *et al.*, 2009). Sie zeichnen sich durch eine hoch konservierte (Dna)J-Domäne mit His-Pro-Asp-Motiv aus, über welche sie mit Chaperonen der Hsp70 - Familie interagieren und deren ATPase-Aktivität stimulieren (Szyperski *et al.*, 1994; Qian *et al.*, 1996; Corsi und Schekman 1997). Neben löslichen Proteinen der Hsp40 - Familie kommen auch membranständige mit luminaler J-Domäne vor. Sie werden nach der Anzahl der Domänen, die sie mit dem bakteriellen Namensgeber DnaJ gemeinsam haben, in drei Gruppen eingeteilt (Cheetham und Caplan, 1998; Hennessy *et al.*, 2005). ERdj-Proteine vom TypI (= ERdj3) zeichnen sich durch eine N-terminale J-Domäne gefolgt von einer Glycin/ Phenylalanin-reichen Region, einer Cystein-reichen Zink²⁺-Bindedomäne und einer C-terminalen Substratbindedomäne aus. ERdj-Proteine vom TypII (= ERdj4) weisen den gleichen Aufbau auf, wobei ihnen die Zink²⁺-Bindedomäne fehlt. Proteine vom TypI und TypII können über ihre Substratbindedomäne direkt Substratmoleküle binden und diese dann an Chaperone der Hsp70 - Familie übergeben (Cheetham und Caplan, 1998; Fan *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu besitzen ERdj-Proteine vom TypIII ausschließlich eine J-Domäne und teilweise eine zusätzliche spezialisierte Domäne (Zimmermann *et al.*, 2006; Dudek *et al.*, 2009).

1.4 Das Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System

Aufgrund seiner geringen Genomgröße ist das Hepatitis B - Virus auf zelluläre Strukturen für seinen Infektionszyklus angewiesen. Um das Zusammenspiel des Virus mit der Wirtszelle besser verstehen zu können, sollten in dieser Arbeit mit Hilfe des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems neue zelluläre Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert werden.

Das Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System wurde 1994 von Johnsson und Varshavsky beschrieben und ermöglicht die Identifikation sowie Charakterisierung von Protein - Protein - Interaktionen *in vivo*. Es handelt sich um ein modifiziertes Hefe - Zwei - Hybrid System (Fields und Song, 1989), welches die Interaktionsanalyse von integralen Membranproteinen, Membran-assoziierten Proteinen sowie löslichen Proteinen ermöglicht. Im Gegensatz zum konventionellen Hefe - Zwei - Hybrid System, bei dem die Interaktion von Bait (Köder) und Prey (Beute) im Zellkern stattfinden muss, können beim Split - Ubiquitin - System Protein - Protein - Interaktionen direkt an der zellulären Membran und somit in ihrer natürlichen Umgebung detektiert werden.

Johnsson und Varshavsky entdeckten, dass Ubiquitin der Hefe, welches in einen N-terminalen (Nub; AS 1-37) sowie einen C-terminalen Teil (Cub; AS 35-76) gespalten wird, bei Koexpression in einer Zelle spontan in nativ gefaltetes Ubiquitin reassoziert, sog. Split - Ubiquitin (Johnsson und Varshavsky, 1994). Sie machten sich für die Entwicklung des Split - Ubiquitin Systems zunutze, dass zelluläre Ubiquitin - spezifische Proteasen (UBP) nach dem C-terminalen Gly - Gly Motiv des Ubiquitins und der ersten Aminosäure eines für den proteasomalen Abbau bestimmten Proteins schneiden. Für die Erkennung durch die im Zytoplasma und im Zellkern lokalisierten UBPs ist die korrekte Faltung des Ubiquitins essentiell. Werden Nub und Cub separat exprimiert, liegen sie nur partiell gefaltet vor und werden nicht durch Ubiquitin - spezifische Proteasen erkannt.

In dieser Arbeit wurde das Transaktivator-basierende Split - Ubiquitin System angewendet (Stagljar *et al.*, 1998; Wittke *et al.*, 1999; Stagljär und Fields, 2002). Die eingesetzten Baits sind Fusionsproteine aus dem Protein von Interesse, der Cub - Domäne sowie dem künstlichen Transkriptionsfaktor LexA-VP16 (Abb. 1-9). Dieser besteht aus der bakteriellen LexA DNA-bindenden Domäne sowie der Herpes Simplex VP16 transaktivierenden Domäne. Als Prey wird entweder ein putativer Interaktionspartner oder eine cDNA - Bank mit der

Nub - Domäne fusioniert. Dies ermöglicht entweder eine direkte Interaktionsanalyse oder die Suche nach neuen Bindungspartnern. Punktmutationen in der N-terminalen Domäne des Ubiquitins, insbesondere der Austausch von Isoleucin nach Glycin an Position 13 (NubG), destabilisieren die Faltung des Nubs und verhindern so die Möglichkeit einer spontanen Reassoziierung von NubG und Cub in Abwesenheit einer Interaktion von Bait und Prey (Johnsson und Varshavsky, 1994; Auerbach *et al.*, 2002). Beim Vorhandensein einer Protein - Protein - Interaktion werden NubG und Cub in räumliche Nähe gebracht, wodurch sich die Faltung von NubG stabilisiert und sich nativ gefaltetes Split - Ubiquitin bildet. Dieses wird, sofern es sich im Zytoplasma befindet, von Ubiquitin - spezifischen Proteasen erkannt. Nach Abspaltung gelangt der Transkriptionsfaktor in den Zellkern und aktiviert dort die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*. Die auxotrophen Marker ermöglichen *Saccharomyces cerevisiae* Wachstum auf Selektionsmedium, wohingegen die durch das *lacZ* - Gen kodierte beta-Galaktosidase einen kolorimetrischen Nachweis der Protein - Protein - Interaktion gestattet.

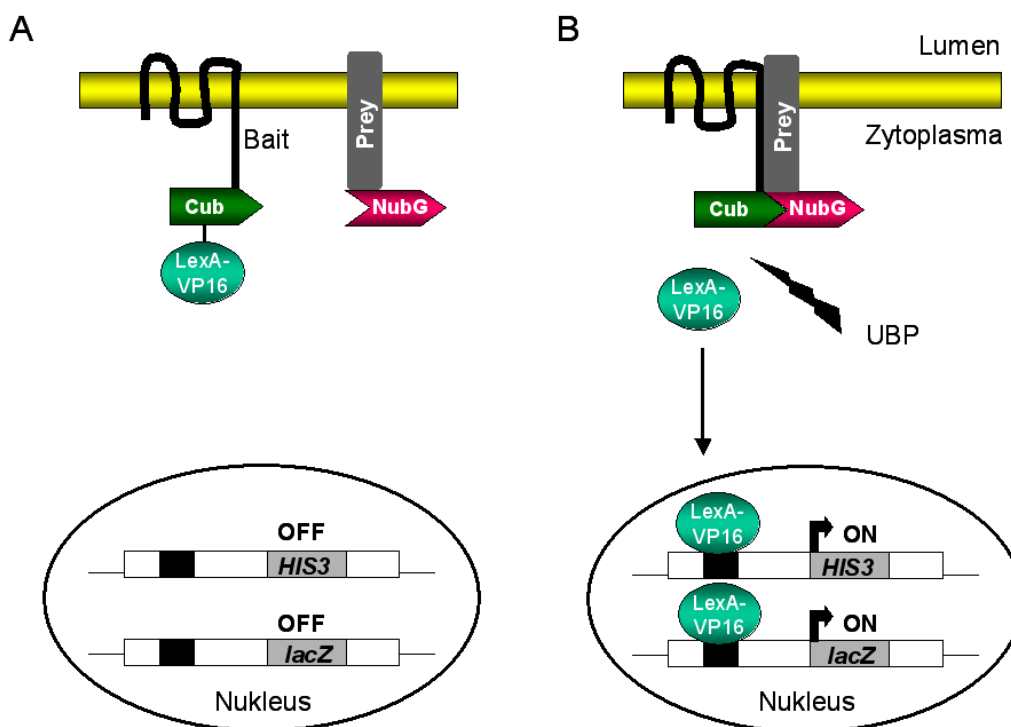


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems. Das Fängerprotein (Bait) wird an die C-terminale Hälfte von Ubiquitin (Cub), die zu untersuchende cDNA - Bank (Prey) an die mutierte N-terminale Hälfte von Ubiquitin (NubG) fusioniert. (A) In Abwesenheit einer Protein - Protein - Interaktion können sich Cub und NubG nicht spontan zu Split - Ubiquitin zusammen lagern. Der künstliche Transkriptionsfaktor LexA-VP16 bleibt an Cub gebunden. (B) In Anwesenheit einer Protein - Protein - Interaktion reassoziieren Cub und NubG zu Split - Ubiquitin. Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBP) schneiden C-terminal von Cub und setzen dadurch den Transkriptionsfaktor LexA-VP16 frei. Dieser gelangt in den Nukleus und aktiviert die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*. Quelle: Dualsystems Biotech.

2 Zielsetzung

Das Hepatitis B - Virus ist aufgrund seiner geringen Genomgröße auf zelluläre Strukturen für seinen Infektionszyklus angewiesen. Virusaufnahme, intrazellulärer Transport, Virusmorphogenese und -ausschleusung können nur durch die Rekrutierung zellulärer Proteine realisiert werden. Im viralen Infektionszyklus nimmt das große L-Hüllprotein bedingt durch seine Multifunktionalität eine zentrale Position ein und stand deshalb im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems, neue zelluläre Interaktionspartner des L-Hüllproteins zu identifizieren. Interaktionspartner, die aufgrund ihrer biologischen Funktion für das Virus relevant sein könnten, sollten weiterführend im humanen Zellkultursystem untersucht werden. Ihre eingehende Analyse sollte helfen, das Zusammenspiel des Virus mit der Wirtszelle zukünftig besser zu verstehen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit basierte auf der Interaktion des L-Hüllproteins mit dem ER-luminalen Chaperon BiP (Cho *et al.*, 2003; Lambert und Prange, 2003), deren funktionelle Bedeutung für den HBV - Lebenszyklus bislang unbekannt war. Die Arbeitshypothese war, dass BiP, ähnlich dem zytosolischen Chaperon Hsc70, die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins beeinflussen könnte. BiP, so die Überlegung, könnte die PräS-Region aktiv in das ER-Lumen hereinziehen, bis eine stabile duale Topologie ausgebildet ist. Durch die ektopische Expression seiner Ko-Chaperone BAP und ERdj4 sollte BiP in seiner Substrat-bindenden Kapazität manipuliert werden und die Auswirkungen auf die posttranslationale PräS-Translokation mit Proteaseschutz - Versuchen analysiert werden. Zwei weitere Proteine, Sec62 und Sec63, die sich als essentiell für die posttranslationale Translokation in der Hefe erwiesen haben, wurden in die Untersuchung mit einbezogen. Sie sollten siRNA-vermittelt depletiert sowie ektopisch exprimiert werden und der Einfluss auf die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins mit Proteaseschutz - Versuchen analysiert werden.

3 Material

3.1 Puffer und Kulturmedien

Puffer und Kulturmedien wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Ausubel *et al.* (1994) „*Current Protocols in Molecular Biology*“ angesetzt.

Zellkultur - Medien:

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium; high Glucose 4,5 g/l with L-Glutamine</i>)	PAA Laboratories
OPTI-MEM [®] <i>Reduced Serum Medium</i>	Gibco/ Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco/ Invitrogen

Hefe - Medien:

Synthetic Dropout (SD) - Medium: 6,7 g/l *Yeast Nitrogen Base without AS* (BD Biosciences)
2 % (w/v) Glucose
1 x *Dropout - Lösung*

Dropout (DO) - Lösung (10 x):

L-Adenin Hemisulfat 200 mg/ l*
L-Arginin HCl 200 mg/ l
L-Histidin HCl Monohydrat 200 mg/ l*
L-Isoleucin 300 mg/ l
L-Leucin 1000 mg/ l*
L-Lysin HCl 300 mg/ l
L-Methionin 200 mg/ l
L-Phenylalanin 500 mg/ l
L-Threonin 2000 mg/ l
L-Tryptophan 200 mg/ l*
L-Tyrosin 300 mg/ l
L-Uracil 200 mg/ l
L-Valin 1500 mg/ l

* L-Adenin Hemisulfat, L-Leucin, L-Histidin HCl Monohydrat und L-Tryptophan wurden entsprechend der gewünschten Selektion zugegeben.

3.2 Enzyme

<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (CIP; 10 U/ μ l)	New England Biolabs
Pfu - DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene
PNGaseF (500 U/ μ l)	New England Biolabs
Protease Inhibitor Mix M	Serva
Pwo - DNA Polymerase (1 U/ μ l)	PeqLab
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4 DNA Ligase (1 U/ μ l)	Fermentas
Trypsin (2,5 %)	Cambrex
Trypsin	Boehringer Mannheim

3.3 Molekularbiologische Kits

ATP Bioluminescence Assay Kit HS II	Roche
Auszyme® Monoclonal Kit	ABBOTT
DUALmembrane Kit 3	Dualsystems Biotech
Dynabeads® M-280 Tosylactivated	Invitrogen
Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit/ Mouse IgG	Invitrogen
HTX Kit High Troughput β -Galactosidase Assay	Dualsystems Biotech
JETsorb DNA Extraction Kit	Genomed
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Lipofectamine™ Reagent	Invitrogen
Lipofectamine™ RNAiMAX	Invitrogen
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit	PeqLab
Perfectprep® Plasmid Maxi Kit	Eppendorf
PLUS™ Reagent	Invitrogen
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer Life Science

3.4 Antikörper

Primärantikörper:

Anti- β -Actin Clone AC-15 (Maus, monoklonal)	Sigma
Anti-Bet1 (Maus, monoklonal)	BD Biosciences
Anti-Calnexin SPA-860 (Kaninchen, polyklonal)	Stressgen Bioreagents
Anti-FLAG [®] M2 (Maus, monoklonal)	Sigma
Anti-HA High Affinity (Ratte, monoklonal)	Roche
Anti-KDEL SPA-827 (Maus, monoklonal)	Stressgen Bioreagents
Anti-PDI SPA-891 (Maus, monoklonal)	Stressgen Bioreagents
Grp78 (H-129): sc-13968 (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnol.
Grp94 (H-212): sc-11402 (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnol.
HA.11 Monoclonal Antibody (Maus, monoklonal)	Covance
K38 (spezifisch gegen das HBV S-Hüllprotein; Kaninchen, polyklonal)	
K47 (spezifisch gegen PräS1-Region des HBV L-Hüllproteins; Kaninchen, polyklonal)	
MA18/7 (erkennt Sequenz DPAF in der PräS1-Region des HBV L-Hüllproteins; Maus, monoklonal)	Heermann <i>et al.</i> (1984)
Sec62 (N-15): sc-12324 (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnol.
Sec63 (L-16): sc-12330 (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnol.
9E10 Monoclonal Antibody anti-c-myc (Maus, monoklonal)	Covance

Sekundärantikörper:

Alle Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper wurden von Molecular Probes bezogen und mit einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

Alexa Fluor[®]488-gekoppelter polyklonaler Ziegen AK gegen Kaninchen IgG

Alexa Fluor[®]488-gekoppelter polyklonaler Ziegen AK gegen Maus IgG

Alexa Fluor[®]594-gekoppelter polyklonaler Ziegen AK gegen Maus IgG

Alexa Fluor[®]546-gekoppelter polyklonaler Ziegen AK gegen Ratten IgG

Alexa Fluor[®]647-gekoppelter polyklonaler Ziegen AK gegen Kaninchen IgG

Ziege anti-Maus Peroxidase-gekoppelt (1:4000) Dianova

Ziege anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppelt (1:5000) Dianova

Kaninchen anti-Ziege Peroxidase-gekoppelt (1:5000) Dianova

3.5 Organismen

Escherichia coli:

DH5α *E. coli*

F' *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q (Δ *lacZ*) M15 *zzf::Tn10* (Tet^R)/
fhuA2 Δ (*argF-lacZ*) U169 (Φ 80 Δ (*lacZ*) M15)
glnV44 gyrA96 (Nal^R) *recA1 endA1 thi-1hsdR17*
(New England Biolabs)

Saccharomyces cerevisiae:

NMY51 Reporter Stamm

MATa *his3* Δ 200 *trp1-901 leu2-3, 112 ade2*
LYS2::(lexAop)₄ - HIS3 ura3::((lexAop)₈ - lacZ
ade2::(lexAop)₈ - ADE2 GAL4
(Dualsystems Biotech)

Humane Zellkultur:

HuH7-Zelllinie:

Zelllinie aus humanem Leberzellkarzinom

HEK293-TT Zelllinie:

Humane embryonale Nierenzellen mit zwei stabil integrierten T - Antigenen des Simian - Virus 40 (Buck *et al.*, 2004)

EcR-LHA-293 Zelllinie:

Humane embryonale Nierenzellen, die das HBV L-Protein stabil unter Kontrolle des Ecdyson - Promotors exprimieren (Lambert und Prange, 2004)

3.6 Vektoren

Im Folgenden sind kommerziell erworbene sowie von anderen Arbeitsgruppen bezogene Vektoren aufgeführt. In dieser Arbeit selbst hergestellte Plasmide sind im Ergebnisteil beschrieben.

p3xFLAG-CMV-10

Sigma

p3xFLAG-CMV-14

Sigma

pNI2

Israel *et al.* (1989)

pCMV-Myc	Clontech
pBT3-STE	Dualsystems Biotech
pCCW-Alg5	Dualsystems Biotech
pAI-Alg5	Dualsystems Biotech
pDL2-Alg5	Dualsystems Biotech
pOTB7.BIP (IRAU p969A0481D; BC020235)	RZPD
pCMV-SPORT6.Bet1 (IRATp970A031D6; BC000899)	RZPD
pOTB7.Sec24A (IRAU p969C0152D6; BC019341)	RZPD
pDSL-BAP (humanes BAP)	Chung <i>et al.</i> (2002)
3HA.DSL.ERdj4 (murines ERdj4)	Shen <i>et al.</i> (2002)
pCMV-Sport6.Sec62 (IRAKp961L2028Q; BC012035)	imaGenes
pBluescriptR.Sec63 (IRATp970B0464D; BC047221)	imaGenes

3.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide für PCR - Anwendungen oder Sequenzierreaktionen wurden von Invitrogen bezogen und auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/ µl aliquotiert.

Bait - Konstrukte:

5' pMSV 877-906_ <i>Pst</i> I:	5'-AAGCTTGGGATCTGCAGCATGGGGCAG-3'
3' pMSV LdTM4 1993-2019_ <i>Pst</i> I:	5'-GGGACTCAAGCTGCAGTACAGACTTGG-3'
3' pMSV LHA 2084-2109_ <i>Pst</i> I:	5'-TGTTAGGGTTCTGCAGCTAGCGTAATC-3'
fw pBT3-STE.SHA_ <i>Pst</i> I:	5'-GGACCCTGCCTGCAGCATGGAGAAC-3'

Bet1:

Bet1 fw_ <i>Eco</i> RI:	5'-TTCTCTCTGAATTCTGGCAGGATG-3'
Bet1 rv_ <i>Bam</i> HI:	5'-CAATTACATGGATCCCCTCAG-3'
Bet1Myc_fw_ <i>Eco</i> RI:	5'-CTCCTCTGGCAGAATTCGGCGTGC-3'
Bet1Myc_rv_ <i>Bgl</i> III:	5'-CACAATTAGATCTATCACCTCAG-3'

Sec24 A:

Sec24A_fw_BC019341:	5'-CCAACCCAGATCTCATGTCC-3'
Sec24A_rv_BC019341:	5'-CACCTCTCTCTAGATTATCTC-3'

Analyse der dualen Topologie des L-Proteins:

BAP_fw_NotI:	5'-TTGCCACGCGGCCGCGGAGGCC-3'
BAP 3' Primer:	5'-GGTGTGGGTCTAGATCTCAGC-3'
BiP 5' Primer:	5'-CCAAGTGGATATCAAGATGAAGC-3'
BiP 3' Primer:	5'-CAGATCAGGGATCCCAACTCATC-3'
ERdj4 5' Primer:	5'-GCACAGGGAATTTCGAAATGG-3'
ERdj4 3' Primer:	5'-CAACTCGGATCCTGAACAATC-3'
Sec62_Myc_fw_BglII:	5'-GGAGCGGCCAAGATCTCGGAACG-3'
Sec62_Myc_rv_NotI:	5'-GTCCCAAATGCGGCCGCTTATGA-3'
Sec63_Myc_fw_BglII:	5'-GGGGGTGAGATCTCCGGGCAG-3'
Sec63_Myc_rv_NotI:	5'-CAAACACTGGCGGCCGCTCAGAGTAC-3'

Sequenzierprimer:

pBT3 321-341-5':	5'-ATAGACACGCAAACACAAATA-3'
pBT3 501-521-3':	5'-AAAGATCAATCTTTGTTGATC-3'
pCMV-MYC seqfw:	5'-CACCATGGCATCAATGCAGAAGCTG-3'
pCMV-MYC seqrv:	5'-GTCCAAACTCATCAATGTATCT-3'
pDL2-xN_seqfw:	5'-TTTCTGCACAATATTTCAAGC-3'
pMSV.772-5':	5'-CCTCCTCCAAGTCCCAGCGAACCC-3'
pMSV.L2214-3':	5'-CCAATCAATAGGCCTGTTAATAGG-3'
pPR3-N_seqfw:	5'-GTCGAAAATTCAAGACAAGG-3'
p3xFLAG 895-915 seq:	5'-CAGAGCTCGTTTAGTGAACCG-3'
p3xFLAG-14_rv_seq:	5'-CCTTGTAGTCGATGTCATGATC-3'
p3xFLAG-10_rv_seq:	5'-GCACTGGAGTGGCAACTTCC-3'

Oligonukleotide für den Anwendungsbereich der RNA Interferenz wurden als Duplex aus *Sense* und *Antisense* siRNA von Sigma-Proligo bezogen und auf eine Arbeitskonzentration von 20 µM (20 pmol/ µl) aliquotiert. Die Sequenzen für die spezifische Depletion der Sec24 Isoformen A bis D wurden von Wendeler *et al.* (2007) beschrieben. Die in dieser Arbeit eingesetzten siRNA - Duplexe wurden vor ihrer Anwendung in einem Nukleotid - BLAST gegen das menschliche Genom und Transkriptom getestet. Es konnte jeweils eine 100 %ige Übereinstimmung von *Sense*- und *Antisense*- Strang mit der Ziel - mRNA beobachtet werden. Die Homologie zu anderen nicht-spezifischen Transkripten lag im Bereich von 66 % - 84 %, so dass von Sequenz-spezifischen Nebeneffekten abgesehen werden kann.

hBet1_sense	5'-GAATAAATTATTAGCTGAAdTdT-3'
hBet1_antisense	5'-TTCAGCTAATAATTTATTCdTdT-3'
hSec24A_sense	5'-GAGTCAGTGAGCCAAGGATdTdT-3'
hSec24A_antisense	5'-ATCCTTGGCTCACTGACTCdTdT-3'
hSec24B_sense	5'-GCCGATCCTGTTCGAACGTATAdTdT-3'
hSec24B_antisense	5'-TATACGTTTCGACAGGATCGGCdTdT-3'
hSec24C_sense	5'-GGCTGCTGTGTAGATCTCTdTdT-3'
hSec24C_antisense	5'-AGAGATCTACACAGCAGCCdTdT-3'
hSec24D_sense	5'-CTGTCTTACCCAGGAGGCTdTdT-3'
hSec24D_antisense	5'-AGCCTCCTGGGTAAGACAGdTdT-3'
Sec62_sense	5'-GACTGAATGAATAAGTACAdTdT-3'
Sec62_antisense	5'-TGTACTTATTCATTCAGTCdTdT-3'
Sec63_sense	5'-CAAGAATGGTGGTGGCTTTdTdT-3'
Sec63_antisense	5'-AAAGCCACCACCATTCTTGdTdT-3'

3.8 cDNA - Banken

Human adult liver NubG-X cDNA library (4,7 x 10 ⁶ unabhängige Klone)	Dualsystems Biotech
Human adult liver X-NubG cDNA library (1,3 x 10 ⁶ unabhängige Klone)	Dualsystems Biotech

3.9 DNA - Längenstandard und Protein - Molekulargewichtstandard

Als DNA - Längenstandard wurde Lambda DNA restringiert mit *EcoRI* und *HindIII* eingesetzt. Als Protein - Molekulargewichtstandard wurde der *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) mit einem Auftrennungsbereich von 14,4 bis 116 kDa verwendet.

3.10 Software

AxioVision 4.6	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena);
Clone Manager 4.01	Scientific & Educational (Sci-Ed) Software (U.S.A.); http://www.scied.com/
ClustalX 1.83	European Bioinformatics Institute (GB); http://www.ebi.ac.uk/
ExPASy Peptide Mass	ExPASy Proteomics Server (CH); http://www.expasy.ch/
GeneDoc 2.6.002	National Resource for Biomedical Supercomputing (U.S.A.); http://www.nrbsc.org/
Kodak 1D Image Analysis Software	Eastman Kodak Company (U.S.A.)
NCBI BLAST	National Center for Biotechnology Information (U.S.A.); http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

4 Methoden

4.1 Stamm - und Kulturhaltung

4.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der in dieser Arbeit eingesetzte *Escherichia coli* Stamm DH5 α wurde bei 37°C in sterilem LB - Flüssigmedium mit entsprechendem Selektionsmarker kultiviert. Kurzfristige Stammhaltung erfolgte auf LB - Agarplatten mit 2 % (w/v) Agar - Anteil in LB - Flüssigmedium. Die Langzeitlagerung der Kulturen erfolgte in Form von Kryostocks in LB - Flüssigmedium mit 50 % (v/v) Glycerinanteil bei minus 80°C.

4.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Der in dieser Arbeit verwendete Reporterstamm NMY51 der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde in sterilem YPAD - Medium bei 30°C kultiviert. Den experimentellen Ansätzen entsprechend wurde der mit Bait - oder Prey - Plasmiden transformierte Hefestamm in *Synthetic Dropout* (SD) - Medium kultiviert. Eine Selektion auf die Baits erfolgte in SD minus Leucin (SD -Leu) Medium, wohingegen eine Selektion auf die Preys in SD minus Tryptophan (SD -Trp) Medium durchgeführt wurde. Die Langzeitlagerung der Kulturen erfolgte in YPAD bzw. SD - Medium mit entsprechendem Selektionsmarker mit 25 % (v/v) Glycerinanteil bei minus 80°C.

4.1.3 Kultivierung von HEK293-TT, EcR-LHA-293 und HuH7-Zellen

HuH7 sowie HEK293-TT Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem Anteil von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 5 μ g/ml Ciprofloxacin (Cyprobay®, Bayer) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden HEK293-TT Zellen mit PBS (2,5 mM EDTA) gewaschen, in Zellkulturmedium resuspendiert und 1:5 verdünnt in eine frische Gewebekulturflasche überführt. HuH7-Zellen wurden mit PBS (2,5 mM EDTA, 0,25 % (v/v) Trypsin) gewaschen und anschließend für 5 min bei 37°C inkubiert,

bevor sie in Zellkulturmedium resuspendiert und 1:5 verdünnt in eine frische Gewebekulturflasche überführt wurden. Die für das große HBV L-Hüllprotein stabile Zelllinie EcR-LHA-293 wurde in DMEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 100 µg/ ml Zeocin (Invitrogen) sowie 100 µg/ ml G418 Disulfat Salz (Sigma) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und entsprechend der HEK293-TT Zelllinie passagiert. Die Langzeitlagerung der Kulturen erfolgte in DMEM (10 % (v/v) FCS) mit 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff.

4.2 Methoden der DNA - Analyse

Im folgenden Abschnitt sind Methoden der Nukleinsäure - Analytik zusammengefasst, die im Rahmen dieser Doktorarbeit angewendet wurden.

4.2.1 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Plasmid - DNA aus *Escherichia coli* wurde über die Methode der alkalischen Lyse unter Verwendung des *PeqGOLD Plasmid Miniprep Kits* (PeqLab) bzw. des *Perfectprep® Plasmid Maxi Kits* (Eppendorf) laut Herstellerangaben isoliert.

4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA wurde entsprechend ihrer Größe auf Tris - Acetat - EDTA (TAE) - Agarosegelen mit einem Agaroseanteil zwischen 1 % und 2 % (w/v) bei einer Spannung von ca. 80 V in TAE - Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (2,5 % (v/v) in TAE - Agarosegel) mittels UV - Licht.

4.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation definierter DNA - Fragmente wurde die Polymerase Kettenreaktion nach Mullis (1986) angewendet. Ein Standardansatz setzte sich aus folgenden Komponenten

zusammen, wobei *Template* - Menge und MgSO_4 - Konzentration individuell optimiert wurden.

Standardansatz der PCR:

0,2 μg DNA

2 μl 5'-Primer (10 pmol/ μl)

2 μl 3'-Primer (10 pmol/ μl)

0,5 μl dNTPs (je 25 mM)

5 μl 10 x Reaktionspuffer *complete* (PeqLab)

1 μl Pwo - DNA Polymerase (1 U/ μl ; PeqLab)

ad 50 μl ddH₂O

Das PCR - Programm bestand aus einer initialen Denaturierung von 5 min bei 96°C, 30 Zyklen aus Denaturierung (96°C, 45 s), Primerbindung (T_M Primerpaar, 45 s) und Elongation (72°C, 45 s) sowie einer finalen Elongation von 10 min bei 72°C. Die Elongationszeit wurde abhängig von der Fragmentgröße optimiert. Das eingesetzte Primerpaar bestimmte die *Annealing* - Temperatur, welche bei der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen (T_M) des Primerpaares minus 2°C lag. Bei Verwendung der Pwo - DNA Polymerase wurde aufgrund ihrer 3' nach 5' Exonuklease - Aktivität (*Proofreading*) von einer Syntheserate von 1 kbp pro 45 Sekunden ausgegangen.

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei 260 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt. Für doppelsträngige DNA wurde die Konzentration wie folgt berechnet:

$$c (\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50.$$

Proteinverunreinigungen der Proben wurden über den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt, wobei eine saubere Nukleinsäurefraktion i.d.R. einen Wert zwischen 1,8 und 2 aufweist.

4.2.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA - Fragmenten bzw. Vektoren aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des *JetSorb DNA Extraction Kits* (Genomed) laut Herstellerangaben durchgeführt.

4.2.6 Modifikationen von DNA

4.2.6.1 Restriktionsanalyse von Nukleinsäuren

Mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen wurden DNA - Fragmente kompatibel zu ihren Zielvektoren geschnitten bzw. die Größe von DNA - Fragmenten analysiert. In einem Standard - Restriktionsansatz wurden 0,5 µg DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease (New England Biolabs) in 1 x Restriktionspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Eine Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung auf einem TAE - Agarosegel.

4.2.6.2 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung, d.h. die Abspaltung terminaler Phosphatgruppen von DNA-Molekülen verhindert deren Zirkularisierung durch die DNA - Ligase. Pro Ansatz wurden 5 µg restringierte Vektor-DNA mit 10 U *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (New England Biolabs) für 45 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die präparative Auftrennung der Proben auf einem TAE - Agarosegel.

4.2.6.3 Ligation von Nukleinsäuren

Ligationsreaktionen wurden mit der T4 DNA Ligase (1 U/ µl; Fermentas) durchgeführt und dienten dem Einbringen eluierter PCR - Produkte in den entsprechenden Zielvektor. Auf 12 µl Eluat wurden ca. 200 ng Vektor DNA, T4 DNA Ligase Puffer sowie 1 U T4 DNA Ligase gegeben und der Ansatz ü.N. bei 16°C inkubiert. Eine Inaktivierung der Reaktion erfolgte durch Denaturierung des Enzyms für 15 min bei 65°C.

4.2.7 Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* DH5α

Der Ligationsansatz wurde auf 100 µl chemisch-kompetente *E. coli* DH5α gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock (42°C) von 90 Sekunden unterzogen, erneut auf Eis inkubiert und 800 µl LB - Medium hinzugegeben. Es

erfolgte eine Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler für 1 h, bevor die Zellen auf LB - Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert wurden. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37°C.

4.3 Methoden der Protein - Analyse

Im folgenden Abschnitt sind Methoden aus dem Bereich der Protein - Analytik zusammengefasst, die im Rahmen dieser Doktorarbeit angewendet wurden.

4.3.1 Transfektion von HEK293-TT und HuH7-Zellen

HEK293-TT sowie HuH7-Zellen wurden derart in DMEM (10 % FCS; 5 µg/µl Ciprofloxacin) ausgesät, dass sie am folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 70 % zeigten. Die Transfektion wurde für HEK293-TT Zellen mit dem *LipofectamineTM2000* - Reagenz (Invitrogen), für HuH7-Zellen mit dem *LipofectamineTM/PLUSTM* - Reagenz (Invitrogen) laut Herstellerangaben durchgeführt. Die transiente Expression der Proteine erfolgte für 48 - 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂.

Transfektionen mit siRNA Oligonukleotiden wurden für beide Zelllinien mit dem *LipofectamineTMRNAiMAX* - Reagenz (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür in Antibiotika-freiem DMEM so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 60-70 % konfluent vorlagen.

4.3.2 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden durch 20 minütige Inkubation auf Eis mit Detergenz-haltigem Lysepuffer aufgeschlossen. Pro 6-Well - Schale wurden 250 µl, pro 6 cm - Schale 500 µl Lysepuffer verwendet. Entsprechend der Fragestellung wurde der milde CHAPS - Lysepuffer (50 mM HEPES (pH 7,5); 100 mM NaCl; 20 mM NEM; 2 % (w/v) CHAPS; 1 x Protease - Inhibitor) oder NP-40 Lysepuffer (100 mM Tris (pH 7,5); 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1 % (v/v) NP-40; 1 x Protease - Inhibitor) eingesetzt. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber gelöst und Zelltrümmer durch Zentrifugation (16.000 x g, 5 min, 4°C) pelletiert. Der Überstand

wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und entsprechend der Fragestellung weiter behandelt.

4.3.3 TCA - Proteinfällung

Proteine wurden durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) ankonzentriert. Hierzu wurde der wässrigen Proteinlösung 1/10 Volumen TCA zugesetzt und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden für 30 min bei 16.000 x g und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde zunächst mit fünfprozentiger TCA-Lösung, anschließend mit Aceton gewaschen. Das Proteinpellet wurde in 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 96°C denaturiert.

4.3.4 Präparation von Mikrosomen

Für die Präparation intakter Mikrosomen wurden Zellen unter nativen Bedingungen aufgeschlossen. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 48 h post-Transfektion auf Eis. Die Zellen wurden zunächst mit TBS-Puffer (4°C) gewaschen und anschließend während einer 10-minütigen Inkubation mit 1 ml hypotonischem 0,1 x TBS-Puffer zum Platzen gebracht. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber vom Boden gelöst und mechanisch aufgeschlossen. Hierzu wurde die Zellsuspension zunächst viermal mit einer 26G-Kanüle und dann 20 mal mit einem Dounce-Homogenisator resuspendiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 x TBS-Puffer wurden isotone Bedingungen hergestellt. Zelltrümmer und Kerne wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde auf ein 10%iges (w/v) Saccharosekissen in TBS gegeben und für 45 Minuten bei 200.000 x g und 4°C ultrazentrifugiert (SW60 Rotor, Beckman). Dabei wurden die Mikrosomen pelletiert, während die zytosolischen Proteine auf dem Saccharosekissen blieben. Der Überstand wurde verworfen und das Mikrosomenpellet in adäquater Menge TBS resuspendiert.

4.3.5 Proteaseschutz - Versuche

Für die Durchführung von Proteaseschutz-Versuchen wurden Mikrosomen, wie unter Punkt 4.3.4 beschrieben, präpariert. Das Mikrosomenpellet wurde in 1 ml TBS mit Hilfe einer 26G-

Kanüle resuspendiert. Die homogene Mikrosomenlösung wurde auf drei Ansätze zu 330 μ l aufgeteilt. Zu Ansatz 1 wurden 10 μ l 100 mM CaCl₂ zugegeben und vorsichtig gemischt. Zu Ansatz 2 wurden ebenfalls 10 μ l 100 mM CaCl₂ und zusätzlich 2 μ l Trypsin (10 mg/ml) gegeben. Zu Ansatz 3 wurden 20 μ l NP-40 (10 % v/v) sowie 2 μ l Trypsin (10 mg/ml) gegeben und gemischt. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1 h. Anschließend wurden je 20 μ l von dem Trypsin - Inhibitor Aprotinin (10 mg/ml) zu Ansatz 2 und 3 gegeben und die Proben weitere 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden zu Ansatz 1 und 2 je 20 μ l NP-40 (10 % v/v) gegeben, um alle Proteine in Lösung zu bringen. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und eine TCA - Fällung der Proteine durchgeführt (vgl. Punkt 4.3.3). Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot detektiert. Eine Analyse der Signalstärken erfolgte unter Verwendung der Kodak 1D Image Analysis Software.

4.3.6 Depletion von zellulärem ATP und Biolumineszenz Assay

Die Synthese des L-Hüllproteins wurde in EcR-LHA-293 Zellen durch Zugabe von 8 μ M Ponasteron A (Invitrogen) induziert. Nach 4 h wurde Ponasteron A ausgewaschen und die Zellen entweder direkt geerntet oder weitere 15 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert (*Chase*). Die Depletion von zellulärem ATP erfolgte durch Zugabe von 5 mM Natrium-Azid und 5 mM Deoxy-D-Glucose in das *Chase* - Medium. Für die Aufarbeitung der Zellen wurde das Zellkulturmedium so abgenommen, dass 1 ml auf den Zellen verblieb. Die Zellen wurden in 0,75 % Triton X-100 lysiert. Für die Messung des ATP - Spiegels wurden 200 μ l Zelllysat unter Verwendung des *ATP Bioluminescence Assay Kits HS II* (Roche) am Luminometer analysiert.

4.3.7 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden mit superparamagnetischen, Tosyl-aktivierten *Dynabeads* (*Dynabeads® M-280 Tosylactivated*; Invitrogen) durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wurden 20 μ l *Dynabeads* mit 5 μ g Antigen-spezifischem Antikörper in 0,1 M Natrium - Phosphatpuffer (pH 7,4) ü.N. bei 37°C gekoppelt. Am folgenden Tag wurden die *Dynabeads* zweimal mit PBS/ 0,1 % (w/v) BSA gewaschen. Freie Tosylgruppen wurden durch

Inkubation in 0,2 M Tris (pH 8,5)/ 0,1 % (w/v) BSA ü.N. bei RT blockiert. Am folgenden Tag wurden die *Dynabeads* einmal mit PBS/ 0,1 % (w/v) BSA gewaschen und in 20 µl pro Reaktionsansatz resuspendiert.

Parallel hierzu wurden HEK293-TT Zellen in 6 cm-Schalen transfiziert und nach 48 h in 500 µl CHAPS - Lysepuffer oder alternativ NP-40 Lysepuffer für 20 min auf Eis lysiert (vgl. Kapitel 4.3.2). Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde ein Aliquot des Lysats vor Durchführung der Immunpräzipitation abgenommen und mit 4 x SDS-Probenpuffer denaturiert. Das übrige Lysat wurde mit je 20 µl Antikörper-gekoppelten *Dynabeads* für 3 h bei 4°C präzipitiert. Anschließend wurden die *Dynabeads* zweimal mit TBS/ 0,1 % Triton X-100 gewaschen und in 1 x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die Analyse der Immunpräzipitation erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Proben und Detektion der Proteine im Western-Blot.

Alternativ wurden *Dynabeads* mit kovalent gebundenem anti-Kaninchen oder anti-Maus Antikörper (*Dynabeads*® M-280 Sheep anti-Rabbit/ Mouse IgG; Invitrogen) eingesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden 50 µl anti-Kaninchen IgG-gekoppelte *Dynabeads* mit 20 µl Kaninchenserum ü.N. bei 4°C auf dem Schwenkrad inkubiert. Bei Verwendung der anti-Maus IgG-gekoppelten *Dynabeads* wurden 20 µl mit 4 µg monoklonalem Antikörper aus Maus eingesetzt. Am folgenden Tag wurden die *Dynabeads* dreimal mit PBS/ 0,1 % (w/v) BSA gewaschen und anschließend zweimal mit 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2) äquilibriert. Es folgte das Quervernetzen der Antikörper für 30 min bei RT mit 20 mM Dimethyl Pimelimidat Dihydrochlorid in 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 15 minütige Inkubation bei RT gestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 0,1 % (w/v) BSA wurde 450 µl Zelllysate zugegeben und die Antigen - Antikörper Bindung für 2 h bei 4°C auf dem Schwenkrad durchgeführt. Abschließend wurden die *Dynabeads* dreimal mit PBS gewaschen und in 80 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgekocht.

4.3.8 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)

Die SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese wurde unter Verwendung des diskontinuierlichen Lämmli - Systems mit Tris - Glycin Elektrophorese - Puffern durchgeführt.

Proteinproben wurden durch 5 minütiges Kochen bei 96°C in 4 x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/ HCl (pH 6,8); 10 % (v/v) β - Mercaptoethanol; 8 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 30 % (v/v) Glycerin) denaturiert. Aufgrund der negativen Nettoladung und

der denaturierenden Eigenschaften des SDS erhielten Proteine ein konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse. Hierdurch wurde eine Auftrennung im elektrischen Feld basierend auf dem Molekulargewicht ermöglicht. Die Acrylamidkonzentration der SDS - Gele wurde von dem Molekulargewicht der Proteine von Interesse bestimmt und lag zwischen 10 - 15 %. Die Auftrennung der Proben erfolgte in SDS - Laufpuffer bei einer Stromstärke von 75 mA und einer Spannung von 150 V. Der *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) ermöglichte die Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetragenen Proteine.

4.3.9 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose - Membranen

Nach beendeter SDS - PAGE wurden Proteine elektrophoretisch mit Hilfe einer Nassblot - Apparatur auf eine Nitrocellulose - Membran übertragen. Die Komponenten wurden luftblasenfrei in folgender Reihenfolge zur Anode hin ausgerichtet: zwei Whatman - Filterpapiere, Nitrocellulose - Transfermembran, Proteingel und zwei weitere Whatman - Filterpapiere. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol) bei einer Stromstärke von 400 mA für 2 h. Die Lagerung der Membran erfolgte in getrocknetem Zustand bei RT.

4.3.10 Immundetektion von Proteinen

Freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose - Membran wurden durch 30 minütige Inkubation in Blockierungslösung (PBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver) abgesättigt. Es erfolgte die Zugabe des Antigen-spezifischen Primärantikörpers (1: 300 bis 1: 15.000 in Blockierungslösung) und weitere Inkubation für 1 h bei RT oder alternativ ü.N. bei 4°C. Unspezifisch gebundener sowie überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen (je 15 min) in PBS mit 0,2 % (v/v) Tween entfernt. Die Wahl des Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers richtete sich nach dem eingesetzten Primärantikörper. Die Inkubation erfolgte für 1-2 h bei RT. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 min in PBS mit 0,2 % (v/v) Tween und 5 min in PBS gewaschen, bevor die Detektion der Immunreaktion mit dem *Western LightningTM Chemiluminescence Reagent Plus* (PerkinElmer Life Science) erfolgte. Signale der ECL - Reaktion wurden durch Exposition eines Films sichtbar gemacht.

4.3.11 HBsAg - ELISA

Der Nachweis von subviralen Partikeln und HBV - Virionen erfolgte mit dem *Auszyme® Monoclonal Kit* (ABBOTT) laut Herstellerangaben. HuH7-Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit 250 µl NP-40 Lysepuffer (TBS (pH 7,5), 0,5 % (v/v) NP-40, 1 x Protease - Inhibitor) lysiert und Zelltrümmer für 5 min bei 16.000 x g pelletiert. Überstände wurden für 5 min bei 1500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert. Eine mit monoklonalem anti-HBsAg Antikörper beschichtete Kugel wurde mit der zu untersuchenden Probe inkubiert, wobei jeweils 100 µl Lysat sowie 200 µl Überstand eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde löslicher anti-HBsAg Antikörper, der mit Meerrettich - Peroxidase gekoppelt war, zu dem Reaktionsansatz gegeben. Nach 75 minütiger Inkubation bei 42°C wurden die Kugeln mehrmals mit ddH₂O gewaschen. Es folgte die durch die Meerrettich - Peroxidase katalysierte Farbreaktion mit OPD (Ortho-Phenyldiamindihydrochlorid), welche photometrisch bei 492 nm ausgewertet wurde.

4.3.12 PräS1 - ELISA

Humane Hepatoma HuH7-Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit 250 µl NP-40 Lysepuffer (TBS (pH 7,5), 0,5 % (v/v) NP-40, 1 x Protease - Inhibitor) lysiert und Zelltrümmer für 5 min bei 16.000 x g pelletiert. Überstände wurden für 5 min bei 1500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 2 ml Überstand mittels Ultrazentrifugation für 4 h bei 200.000 x g (SW60 Rotor, Beckman) durch ein 20 prozentiges Saccharosekissen ankonzentriert. Subvirale Partikel wurden ü.N. in 100 µl TBS resuspendiert. Parallel hierzu wurden 96-Well Platten mit dem PräS1-spezifischen Antikörper MA18/7 (1:1000 in TBS) für 3 h bei RT beschichtet und anschließend ü.N. bei 4°C in TBS/ 1 % (w/v) BSA blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/ 0,1 % (v/v) Tween20 erfolgte die Zugabe von je 75 µl Probe für 2 h bei RT. Die Proben wurden entfernt, dreimal gewaschen und für 1 h bei RT mit je 75 µl sekundärem Antikörper (Konjugatlösung des *Auszyme® Monoclonal Kits*) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Farbreaktion mit OPD (Substratlösung und OPD des *Auszyme® Monoclonal Kits*) für 30 min bei RT im Dunkeln. Nach Abstoppen der Farbreaktion mit 1 N Schwefelsäure wurde diese mit dem ELISA - Reader bei 492 nm ausgewertet.

4.3.13 Immunfluoreszenzanalyse

HuH7- oder HEK293-TT Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, wobei beim Einsatz von HEK293-TT Zellen zunächst eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin (Sigma) erfolgte. Nach 24 bis 48 h Proteinexpression wurden die Zellen für 10 min bei minus 20°C mit Methanol/0,02 M EGTA (pH 7,5) fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen für 20 min bei RT mit Ziegen- bzw. Eselserum (1:20 in PBS) blockiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers und Inkubation bei 37°C für 45 Minuten. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Präparate für 1 h bei 37°C mit Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:200 in PBS) sowie Hoechst Farbstoff 33342 (1:5000 in PBS; Sigma) zur Färbung der Zellkerne inkubiert. Die Präparate wurden erneut dreimal für 5 min in PBS gewaschen und mit dem Einbettungsmedium Fluoprep auf Objektträgern aufgebracht.

Die Präparate wurden mit einem 100 x Objektiv (Numerische Apertur 1,4) an einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop betrachtet. Bilder wurden unter Verwendung der AxioVision Software 4.6 bearbeitet und dekonvolviert.

4.4 Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System

Zum Nachweis von Protein - Protein - Interaktionen *in vivo* wurde das von Johnsson und Varshavsky 1994 beschriebene Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System eingesetzt (*DUALmembrane Kit 3*; Dualsystems Biotech). Hierbei wurde das große Hüllprotein des Hepatitis B - Virus gegen zwei Leberzell - spezifische cDNA - Banken (*Human adult liver X-NubG cDNA library* und *Human adult liver NubG-X cDNA library*; Dualsystems Biotech) gescreent. Zum Einsatz kam der Reporterstamm NMY51 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die als Köder eingesetzten Konstrukte werden im Folgenden „Bait“ genannt, die aus den cDNA - Banken isolierten putativen Interaktionspartner „Prey“ bezeichnet. Zur Verifikation der im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System ermittelten Protein - Protein - Interaktionen wurden putative Preys anschließend im System der humanen Zellkultur überprüft.

4.4.1 Herstellung der Bait - Konstrukte

Die kodierende Region der Proteine, die im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System als Bait eingesetzt werden sollten, wurde in den pBT3-STE Bait Vektor (Dualsystems Biotech) kloniert. Hierdurch erhielten die Proteine eine N-terminale STE2 - Leader Sequenz, wodurch die Expression in der Hefe optimiert wurde, sowie eine C-terminale Fusion aus Cub und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16. Die Expression der Baits wird durch den schwachen Cytochrom-C Oxidase (*CYCI*) Promotor reguliert, wodurch die Gefahr einer transaktivierenden Aktivität reduziert wird. Als Selektionsmarker weisen die Baits den auxotrophen Marker *LEU2* in *S. cerevisiae* sowie Kanamycin - Resistenz in *E coli* auf.

4.4.2 Test der Bait - Expression

Für den Nachweis der Bait - Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, wurden Hefe - Mikrosomen modifiziert nach Fujiyama und Tamanoi (1986) präpariert.

Hierzu wurden 60 ml SD -Leu mit dem Bait angeimpft und ü.N. bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,9 bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 2000 x g und 4°C pelletiert und anschließend in 30 ml Sorbitolpuffer (0,3 M Sorbitol; 0,1 M NaCl; 5 mM $MgCl_2$; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen. Das Pellet wurde für 10 min auf -80°C inkubiert und anschließend mit 300 µl Lysepuffer (Sorbitolpuffer plus 1 x Protease - Inhibitor) und 600 µl Glasbeads (425-600 µm) gemischt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mechanisch. Die Proben wurden sechsmal für je 1 min gevortext und dazwischen auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation des Überstandes (SS-34 Rotor, 1000 x g, 10 min, 4°C) wurden nicht-lysierte Zellen und grobe Zelltrümmer pelletiert. Der klare Überstand wurde auf 3,5 ml Lysepuffer gegeben und für 90 min bei 125.000 x g und 4°C ultrazentrifugiert (SW60 Rotor, Beckman). Die lösliche Proteinfraction wurde verworfen und das Mikrosomenpellet in 80 µl 2 x SDS-Probenpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 6,8; 9 M Harnstoff; 1 mM EDTA; 1 % SDS; 4 % β -Mercaptoethanol; 10 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau) für 30 min bei 37°C resuspendiert. Als Referenz wurde das Konstrukt pCCW-Alg5 eingesetzt, ein Kontroll - Bait aus der Fusion des ER-residenten Proteins Alg5 der Hefe und der Cub-LexA-VP16 Reporter-kassette.

4.4.3 Kontroll - Assay

Der Kontroll - Assay dient der Bestätigung der Expression der Baits in der Hefe sowie dem Nachweis der korrekten Topologie der Cub-LexA-VP16 Reporter-kassette. Er wurde unter Verwendung der Kontroll - Preys pAI-Alg5 und pDL2-Alg5 (Dualsystems Biotech) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bei dem Kontroll - Prey pAI-Alg5 handelt es sich um eine Fusion aus dem ER-residenten Protein Alg5 der Hefe und dem wildtyp Nub. Der Kontroll - Prey pDL2-Alg5 ist eine Fusion aus Alg5 mit NubG, einem mutierten Nub mit Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Glycin an Position 13. Beide Preys weisen den auxotrophen Marker *TRP1* auf, der ihnen Wachstum auf Tryptophan - Mangelmedium erlaubt.

4.4.4 Pilot Screen

Der Pilot Screen gibt Aufschluss darüber, ob der Bait bei Kotransformation mit dem leeren cDNA - Bank Vektor transaktivierende Eigenschaften aufweist. Der Einsatz von Selektionsplatten steigender Stringenz ermöglicht die Wahl der Selektionsbedingungen für den eigentlichen Screen der cDNA - Bank. Neben der Selektion auf Leucin-, Tryptophan- und Histidin - Mangelmedium wurde 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) mit einer Konzentration von 0 mM bis 30 mM eingesetzt. Dieses hemmt das *HIS3*-Genprodukt kompetitiv und erhöht somit die Stringenz der Selektion. Für den eigentlichen Screen der cDNA - Bank wird die Konzentration an 3-AT ausgewählt, bei der kein Hintergrundwachstum auf Selektionsplatten zu beobachten ist.

4.4.5 Amplifikation der cDNA - Bank

Die humane Leberzell - spezifische cDNA - Bank wurde auf eine Konzentration von 1 ng/ μ l verdünnt. Anschließend wurden parallel zehn Transformationen in chemisch-kompetente DH5 α *E. coli* (New England Biolabs) durchgeführt. Jeder Transformationsansatz wurde mit SOC - Medium auf 1 ml aufgefüllt und nach 1 h Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler auf vier separate LB - Amp (100 μ g/ml) Platten mit einem Durchmesser von 15 cm ausgestrichen. Nach einer Inkubation ü.N. bei 37°C wurden die Bakterienkolonien mit 4 ml

LB - Amp (100 µg/ ml) und einem Gummischaber abgelöst. Die Platten wurden mit 1 ml Medium nachgespült und die Bakteriensuspension aller Transformationsansätze vereint. Nach dem Anlegen von Dauerkulturen wurde die Bakteriensuspension für 2 h bei 37°C auf dem Schüttler (225 rpm) inkubiert. Die Kultur wurde pelletiert und anschließend in vier separaten Ansätzen Plasmid-DNA mit dem *Perfectprep® Plasmid Maxi Kit* (Eppendorf) isoliert.

4.4.6 Screen der Leberzell-spezifischen cDNA - Banken

Nach Ermittlung der Selektionsbedingungen durch Kontroll - Assay und Pilot Screen wurde der eigentliche Screen der humanen Leberzell-spezifischen cDNA - Banken (*Human adult liver X-NubG* und *NubG-X cDNA library*; Dualsystems Biotech) durchgeführt.

Zunächst wurde eine Übernachtskultur (100 ml SD-Leu) des NMY51-Reporterstamms mit dem Bait von Interesse angelegt. Hiervon wurden 200 ml 2 x YPAD so angeimpft, dass eine OD₅₄₆ von 0,15 resultierte. Die Kultur wurde für 4-5 h bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert, bis eine OD₅₄₆ von 0,6 erreicht war. Die 200 ml Hefesuspension wurde auf 4 Falcon-Tubes aufgeteilt und bei 700 x g für 5 min pelletiert. Jedes Pellet wurde in 30 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Die Zellpellets wurden in je 1 ml LiOAc/TE Mastermix (0,11 M LiOAc, 1 x TE-Puffer (pH 7,5)) resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut für 5 min bei 700 x g pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und jedes Pellet in 600 µl LiOAc/TE Mastermix resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Tubes überführt und je 7 µg cDNA - Bank Plasmid, 100 µl Carrier-DNA (*Herring Testes Carrier DNA* (2 mg/ ml; Clontech) und 2,5 ml PEG/ LiOAc Mix (0,1 M LiOAc; 1 x TE-Puffer (pH 7,5), 40 % (w/v) PEG 4000) hinzu gegeben. Die Ansätze wurden für eine Minute gevortext und anschließend für 45 min bei 30°C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 160 µl DMSO zu jedem Ansatz und Inkubation bei 42°C für 20 min. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 700 x g pelletiert und in jeweils 3 ml 2 x YPAD resuspendiert. Die vier Ansätze wurden vereint und für 90 min bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 min und 700 x g zentrifugiert, das Pellet in 4,8 ml 0,9% NaCl resuspendiert und jeweils 300 µl der Hefesuspension pro Selektionsplatte ausplattiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden von einer 1:100, einer 1:1000 und einer 1:10.000 Verdünnung je 100 µl auf einer SD- Leu/-Trp Platte ausplattiert. Die Platten wurden für vier Tage bei 30°C inkubiert. Eine weiße Farbe der Hefekolonien deutet auf eine Protein - Protein - Wechselwirkung hin. In Abwesenheit einer Protein - Protein - Interaktion wird das *ADE2* - Reportergen nicht transkribiert, so dass ein rötliches Zwischenprodukt des Adenin -

Syntheseweges akkumuliert. Demnach stellen Hefekolonien mit rosa bis roter Färbung mit großer Wahrscheinlichkeit Falschpositive dar.

4.4.7 Analyse der Klone

4.4.7.1 Beta-Galaktosidase - Test

Die beta-Galaktosidase - Aktivität putativer Klone wurde mit dem *HTX Kit High Throughput β -Galactosidase Assay* (Dualsystems Biotech) ermittelt. Hierbei wurde den Hefezellen zur Metabolisierung 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) angeboten. Die enzymatische Aktivität und damit Bestätigung der Interaktion wurde durch Blaufärbung des Hefelysats bestimmt.

4.4.7.2 Plasmidisolierung aus *Saccharomyces cerevisiae*

Plasmid - DNA aus *S. cerevisiae* wurde unter Anwendung der „*Yeast Boiling DNA Miniprep*“ Methode nach Robzyk und Kassir (1992) isoliert. Hierzu wurden 4 ml einer ü.N. - Kultur bei 16.000 x g für 1 min pelletiert. Das Pellet wurde in 100 μ l STET - Puffer resuspendiert, ca. 200 mg sterile Glasbeads zugegeben und 5-10 min gevortext. Nach Zugabe weiterer 100 μ l STET - Puffer wurde der Ansatz für 3 min bei 96°C aufgeköcht und anschließend grobe Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (13.000 x g, 10 min, 4°C). Von dem Überstand wurden 120 μ l mit 60 μ l 7,5 M Ammoniumacetat für 1 h bei minus 20°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der zweifachen Menge eiskaltem 100 % igen Ethanol für 30 min bei minus 20°C gefällt. Das Pelletieren der DNA erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 16.000 x g und 4°C. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 20 μ l ddH₂O aufgenommen. Hiervon wurden 10 μ l für die Transformation von *E. coli* DH5 α eingesetzt.

4.4.7.3 Sequenzanalyse der Klone

Die aus *E. coli* isolierte Prey - Plasmid DNA wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) sequenziert. Dabei wurde für Preys der NubG-X Bank der Sequenzierprimer pPR3-N_seqfw,

für Preys der X-NubG-Bank der Sequenzierprimer pDL2-xN_seqfw eingesetzt. Die Identität der Klone wurde durch einen Datenbankenabgleich, einen sog. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bestimmt.

4.4.7.4 Bestätigung der Interaktion in *S. cerevisiae* zur Selektion positiver Klone

Zur Bestätigung der im cDNA - Bank Screen identifizierten Interaktionspartner wurde die isolierte Plasmid-DNA der Preys gezielt mit dem Bait in den Reporterstamm *S. cerevisiae* NMY51 retransformiert. Zum Test auf Eigenaktivität erfolgte zusätzlich eine Retransformation mit dem leeren Bait-Vektor pBT3-STE. Die Transformationseffizienz wurde durch Wachstum auf SD -Leu/-Trp Platten abgeschätzt, die Stärke der Interaktion durch Wachstum auf Selektionsplatten. Putative Preys, die im Rücktest kein Wachstum unter Selektionsbedingungen zeigten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems, neue zelluläre Interaktionspartner des HBV L-Hüllproteins zu identifizieren. Dieses System ermöglicht insbesondere die Analyse von Membranproteinen und Membran-assoziierten Proteinen. Vielversprechende Interaktionspartner wurden weitergehend im humanen Zellkultursystem bearbeitet. Parallel hierzu wurde die bereits bekannte Interaktion von L und dem ER-luminalen Chaperon BiP näher charakterisiert. Hierbei stand die Beteiligung von BiP an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die Translokation-assoziierten Proteine Sec62 und Sec63, welche sich als essentiell für die posttranslationale Translokation in der Hefe erwiesen haben, wurden ebenfalls auf eine Beteiligung an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins hin überprüft.

5.1 Identifikation neuer Interaktionspartner des HBV L-Hüllproteins mit Hilfe des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems

Die im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System eingesetzten Fängerkonstrukte werden nachfolgend mit „Bait“, die aus der cDNA - Bank identifizierten Interaktionspartner mit „Prey“ bezeichnet. Zum besseren Verständnis des folgenden Ergebnisteils sind die im Hefesystem eingesetzten Vektoren mit ihren Eigenschaften in Tabelle 5-1 aufgeführt.

Tabelle 5-1: Vektoren des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems (Dualsystems Biotech).

Vektor	Auxotropher Marker in <i>S. cerevisiae</i>	Resistenz - Marker in <i>E. coli</i>	Eigenschaft
pBT3-STE	<i>LEU2</i>	Kanamycin	Bait - Vektor; Insert erhält a) N-terminale STE2 - Leader Sequenz (15 N-terminale AS des Hefe - Proteins Ste2), welche die Expression des Baits in der Hefe optimiert; b) C-terminale Fusion aus Cub und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16
pCCW-Alg5	<i>LEU2</i>	Kanamycin	Bait - Kontrollvektor; Hefeprotein Alg5 mit C-terminaler Fusion aus Cub und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16
pAI-Alg5	<i>TRP1</i>	Ampicillin	Prey - Kontrollvektor; Hefeprotein Alg5 mit C-

			terminaler Fusion von wtNub (Positivkontrolle)
pDL2-Alg5	<i>TRP1</i>	Ampicillin	Prey - Kontrollvektor; Hefeprotein Alg5 mit C-terminaler Fusion von NubG (Negativkontrolle)

Vor der Durchführung eines cDNA - Bank Screens muss der eingesetzte Bait auf seine Funktionalität überprüft und die optimalen Selektionsbedingungen ermittelt werden. Die nachfolgende Verifizierung der möglichen Interaktionspartner erfolgt in mehreren unabhängigen Analysen. Zum besseren Verständnis ist der zeitliche Ablauf des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems in Abbildung 5-1 schematisch dargestellt.

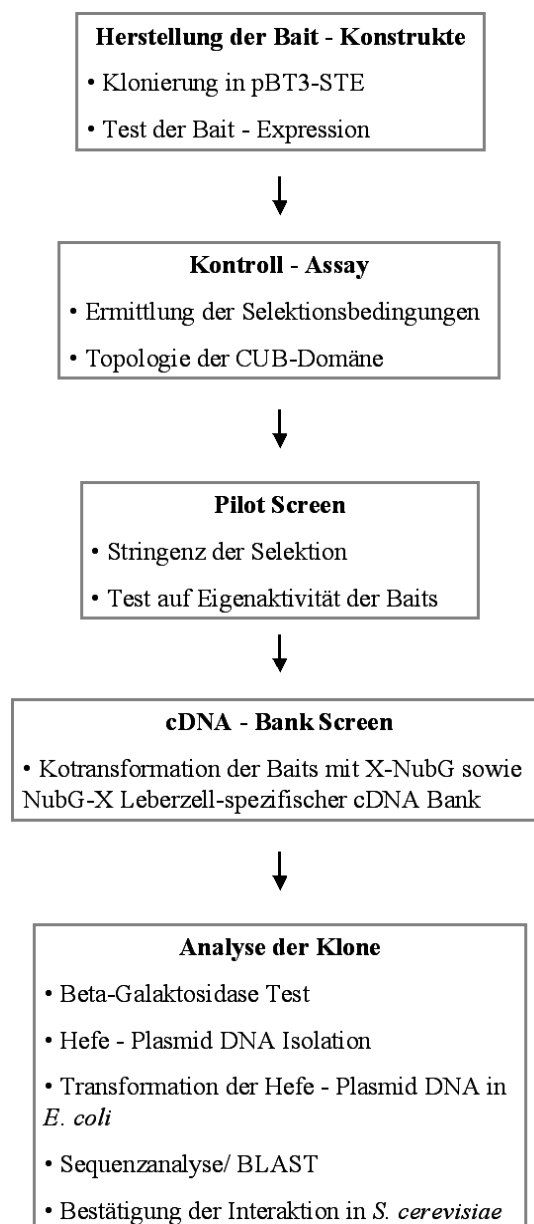


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Durchführung des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems.

5.1.1 Herstellung der Bait - Konstrukte

Der C-Terminus des großen L-Hüllproteins von HBV ist laut Vorhersagen in das ER-Lumen orientiert (vgl. Kapitel 1.1.2). Deshalb wurde L für den Screen der Leberzell-spezifischen cDNA - Banken zum einen in seiner vollen Länge mit HA-Markierung (LoHA), zum anderen mit einer C-terminalen Deletion der vierten Transmembrandomäne (Lo Δ TM4) als Bait eingesetzt. In beiden Fällen sind die internen Start - Kodons des mittleren M- und kleinen S-Hüllproteins mutiert, wodurch es zu alleiniger Expression des großen L-Hüllproteins in der Hefe kommt.

Unter Verwendung der Primerpaare pMSV 877-906_ *Pst*I und pMSV LHA 2084-2109_ *Pst*I bzw. pMSV L Δ TM4 1993-2019_ *Pst*I wurden LoHA und Lo Δ TM4 in den pBT3-STE Vektor kloniert. Hierdurch erhielten die Baits eine N-terminale STE2 - Leader Sequenz, wodurch ihre Expression in der Hefe optimiert wurde, sowie eine C-terminale Fusion aus Cub und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16.

Um die Spezifität der Protein - Protein - Wechselwirkung der mit dem L-Hüllprotein identifizierten Preys zu analysieren, wurden auch mit dem kleinen S-Hüllprotein direkte Interaktionstests durchgeführt. Hierzu wurde S mit C-terminaler HA-Markierung (SHA) unter Verwendung des Primerpaares fwpBT3-STE.SHA_ *Pst*I/ 3'pMSV LHA 2084-2109_ *Pst*I ebenfalls in den pBT3-STE Vektor kloniert.

5.1.2 Nachweis der Bait - Expression in *S. cerevisiae*

Der Nachweis der Bait - Expression in *S. cerevisiae* wurde im Western-Blot mit Hilfe eines PräS1-spezifischen Antikörpers geführt. Das Fusionsprotein LoHA-Cub-LexA-VP16 weist mit 782 AS ein theoretisches Molekulargewicht von 85,6 kDa auf. Das Fusionsprotein mit Deletion der vierten Transmembrandomäne besitzt mit 752 AS ein theoretisches Molekulargewicht von 82 kDa. Beide Proteine konnten erfolgreich mit dem PräS1-spezifischen Antikörper MA18/7 nachgewiesen werden (Abb. 5-2). Bei längerer Exposition des Films ist eine Doppelbande beider Proteine zu beobachten, die auf eine N-Glykosylierung hinweisen könnte. Die höher laufende Form überwiegt stark, so dass bei kurzer Exposition nur eine Einzelbande zu beobachten ist.

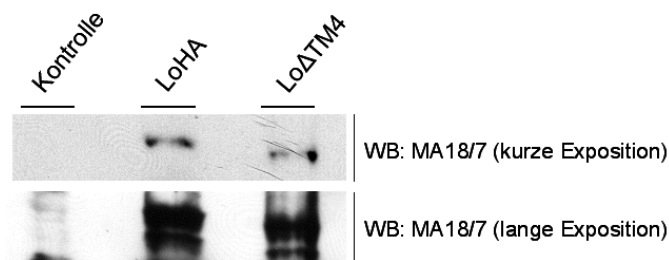


Abbildung 5-2: Nachweis der Bait - Expression. *S. cerevisiae* wurde mit den Bait - Vektoren pBT3-STE.LoHA sowie pBT3-STE.LoΔTM transformiert und Mikrosomen präpariert. LoHA und LoΔTM4 konnten unter Verwendung des PräS1-spezifischen Antikörpers MA18/7 mit ihrem erwarteten Molekulargewicht von 85 kDa bzw. 82 kDa nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde der Bait - Vektor pCCW-Alg5, der für das ER-residente Protein Alg5 der Hefe kodiert, eingesetzt.

Die Expression von LoHA und SHA konnte nicht mit einem HA-spezifischen Antikörper bestätigt werden. Dies könnte daran liegen, dass das HA-Epitop in den Baits durch die Fusion aus Cub und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16 nicht mehr C-terminal, sondern intern vorliegt. Nach Faltung der Proteine könnte das HA-Epitop im Innern zu liegen kommen und nicht mehr für den Antikörper zugänglich sein. Robustes Wachstum des Baits SHA mit dem positiven Kontroll - Prey pAI-Alg5 (Abb. 5-7 und 5-16) bestätigt aber dessen effiziente Expression in der Hefe.

5.1.3 Ermittlung der Selektionsbedingungen

Die auxotrophen Marker *LEU2* (Leucin) bzw. *TRP1* (Tryptophan) dienen zur Selektion der mit Bait bzw. Prey erfolgreich transformierten Hefeklone. Bei einer Protein - Protein - Interaktion werden zusätzlich die auxotrophen Marker *HIS3* (Histidin) und *ADE2* (Adenin) aktiviert. Vor dem Screen der cDNA - Banken wurden die optimalen Selektionsbedingungen ermittelt, um unspezifisches Hintergrundwachstum auszuschließen und somit die Anzahl falsch-positiver Interaktionspartner gering zu halten.

5.1.3.1 Kontroll - Assay

Der Kontroll - Assay dient der Bestätigung der Expression der Baits in der Hefe sowie dem Nachweis der korrekten Topologie der Cub-LexA-VP16 Reporter cassette. Des Weiteren wird über ihn die Stärke der Selektion festgelegt.

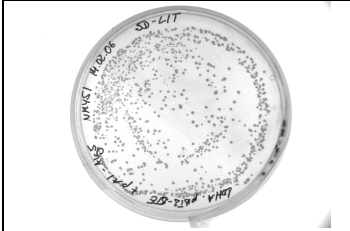
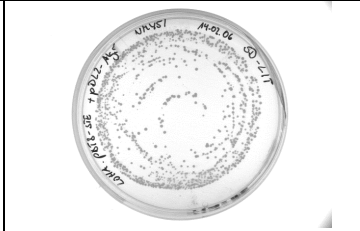
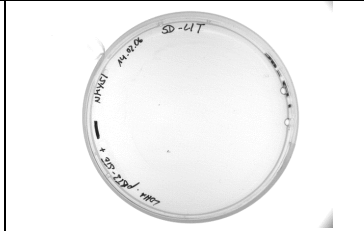



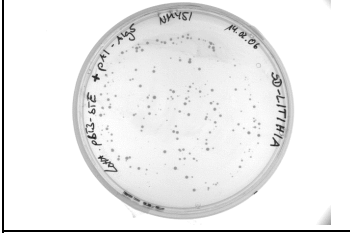


Werden die Baits in der Hefe exprimiert und weisen sie die korrekte Orientierung der Cub-LexA-VP16 Domäne in das Zytoplasma auf, kommt es bei Koexpression mit dem positiven Kontroll - Prey pAI-Alg5 aufgrund der hohen Affinität von Cub und wtNub zu einer spontanen Zusammenlagerung zu Split - Ubiquitin. Hierdurch wird der Transkriptionsfaktor durch Ubiquitin - spezifische Proteasen abgespalten und die Reportergene im Zellkern aktiviert. Dies äußert sich durch Wachstum der Hefen auf Selektionsmedium. Bei Kotransformation der Baits mit dem negativen Kontroll - Prey pDL2-Alg5 kommt es zu keiner Reassoziaton von Split - Ubiquitin, da Cub keine Affinität zu NubG aufweist und der Bait keine Affinität für das Hefeprotein Alg5 aufweisen sollte. Wachstum auf Selektionsmedium entspricht demnach unspezifischem Hintergrund.

Bei der Kotransformation der Baits pBT3-STE.LoHA und pBT3-STE.Lo Δ TM4 mit den Kontroll - Preys konnte Wachstum auf SD -Leu/-Trp Platten beobachtet werden (Abb. 5-3, A/B, a). Die Anzahl der Kolonien wurde als Referenzwert für das Wachstum auf Selektionsmedium verwendet. Die Baits zeigten auf dreifach Selektionsmedium (SD -Leu/-Trp/-His) ca. 40 % Wachstum bei Kotransformation mit der Positivkontrolle pAI-Alg5 (Abb. 5-3, A/B, b). Dabei bestätigt die weiße Koloniefarbe eine Protein - Protein - Wechselwirkung. Im Gegensatz dazu deutet eine rosa Koloniefarbe auf das Fehlen einer Protein - Protein - Wechselwirkung hin, was in der Akkumulation eines roten Zwischenproduktes des Adenin - Stoffwechselweges begründet liegt. Auf vierfach Selektionsmedium (SD -Leu/-Trp/-His/-Ade) wurde nur noch ca. 23 % bzw. 12 % Wachstum ermittelt (Abb. 5-3, A/B, c). Für den nachfolgenden Screen der cDNA - Banken wurde dementsprechend dreifach Selektionsmedium ausgewählt.

Wachstum auf Selektionsmedium bestätigt die effiziente Expression der Baits in der Hefe und bedeutet, dass die Cub - Domäne von LoHA und Lo Δ TM4 auf der zytosolischen Seite der Membran vorliegt. Für den Bait LoHA wurde aufgrund Computer-basierter Vorhersagen zunächst eine ER-luminale Ausrichtung des C-Terminus und damit der Cub - Domäne vermutet. Wahrscheinlich hat die Fusion der Cub-LexA-VP16 Reporter-kassette ein erneutes Durchspannen der Membran verhindert und hierdurch die zytosolische Ausrichtung des C-Terminus begünstigt.

Bei der Kotransformation der Baits mit der Negativkontrolle pDL2-Alg5 konnte kein Wachstum auf Selektionsmedium beobachtet werden. Dies bedeutet, dass weder LoHA noch Lo Δ TM4 transaktivierende Eigenschaften besitzen, die in der Anschaltung der Reportergene auch ohne das Vorhandensein einer Protein - Protein - Interaktion resultieren würden.

A

pBT3-STE.LoHA + pAI-Alg5	pBT3-STE.LoHA + pDL2-Alg5	pBT3-STE.LoHA / keine DNA
		
(a) SD -Leu/-Trp: Anzahl: ca. 1120 (= 100 %); Farbe: weiß	(a) SD -Leu/-Trp: Anzahl: ca. 1000; Farbe: rosa	(a) SD -Leu/-Trp: Anzahl: kein Wachstum
		
(b) SD -Leu/-Trp/-His: Anzahl: ca. 500 (= 45 %); Farbe: weiß	(b) SD -Leu/-Trp/-His: Anzahl: kein Wachstum	(b) SD -Leu/-Trp/-His: Anzahl: kein Wachstum
		
(c) SD -Leu/-Trp/-His/-Ade: Anzahl: ca. 256 (= 23 %); Farbe: weiß	(c) SD -Leu/-Trp/-His/-Ade: Anzahl: kein Wachstum	(c) SD -Leu/-Trp/-His/-Ade: Anzahl: kein Wachstum

B





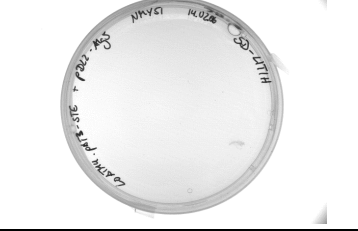
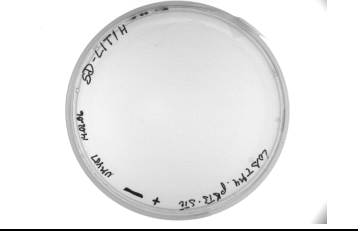
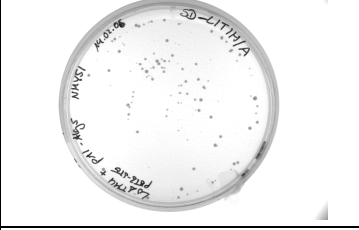


pBT3-STE.LoΔTM4 + pAI-Alg5	pBT3-STE.LoΔTM4 + pDL2-Alg5	pBT3-STE.LoΔTM4 / keine DNA
		
(a) SD -Leu/-Trp: Anzahl: ca. 1320 (= 100 %); Farbe: weiß	(a) SD -Leu/-Trp: Anzahl: ca. 1080 (= 100 %); Farbe: rosa	(a) SD -Leu/-Trp: Anzahl: kein Wachstum
		
(b) SD -Leu/-Trp/-His: Anzahl: ca. 460 (= 35 %); Farbe: weiß	(b) SD -Leu/-Trp/-His: Anzahl: kein Wachstum	(b) SD -Leu/-Trp/-His: Anzahl: kein Wachstum
		
(c) SD -Leu/-Trp/-His/-Ade: Anzahl: ca. 164 (= 12 %); Farbe: weiß	(c) SD -Leu/-Trp/-His/-Ade: Anzahl: kein Wachstum	(c) SD -Leu/-Trp/-His/-Ade: Anzahl: kein Wachstum

Abbildung 5-3: Kontroll - Assay zur Bestätigung der Expression sowie der Orientierung der Cub - Domäne. *S. cerevisiae* wurde mit den Bait - Vektoren pBT3-STE.LoHA (A) und pBT3-STE.LoΔTM4 (B) und den Kontroll - Preys pAI-Alg5 und pDL2-Alg5 kotransformiert. Die Transformationsansätze wurden auf drei verschiedenen Selektionsmedien ausplattiert: SD -Leu/-Trp (a), SD -Leu/-Trp/-His (b) und SD -Leu/-Trp/-His/-Ade (c). Die Baits zeigen ca. 40 % Wachstum auf dreifach Selektionsmedium bei Kotransformation mit der Positivkontrolle pAI-Alg5 und nur geringes Wachstum von ca. 10-20 % auf vierfach Selektionsmedium. Eine weiße Koloniefarbe deutet auf eine Protein - Protein - Wechselwirkung hin, wohingegen eine rosa Koloniefarbe auf eine fehlende Interaktion verweist. Weder LoHA noch LoΔTM4 zeigen Wachstum auf Selektionsmedium bei Kotransformation mit der Negativkontrolle pDL2-Alg5.

5.1.3.2 Pilot Screen

Der Pilot Screen ermöglicht es, die Stringenz der Selektion durch den Einsatz von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT), welches das *HIS3* - Genprodukt kompetitiv hemmt, zu optimieren. Des Weiteren wird ausgeschlossen, dass die Baits bei Kotransformation mit dem leeren cDNA - Bank Vektor transaktivierende Eigenschaften aufweisen. Es wurde die 3-AT Konzentration

für den Screen der Leberzell-spezifischen cDNA - Banken ausgewählt, bei der kein Hintergrundwachstum mehr zu beobachten war. Für den Screen der X-NubG cDNA - Bank wurde SD -Leu/-Trp/-His + 30 mM 3-AT als Selektionsmedium gewählt, für den der NubG-X cDNA - Bank SD -Leu/-Trp/-His + 12 mM 3-AT.

5.1.4 Screen von LoHA und Lo Δ TM4 gegen Leberzell-spezifische cDNA - Banken

In der NubG-X cDNA - Bank wird das cDNA - Fragment stromabwärts der NubG-kodierenden Sequenz fusioniert. Sie eignet sich für die Suche nach zytosolischen Interaktionspartnern sowie TypII integralen Membranproteine ($N_{\text{Zytoplasma}}/C_{\text{Lumen}}$). In der X-NubG cDNA - Bank liegt das cDNA - Fragment stromaufwärts der NubG-kodierenden Sequenz vor. Sie eignet sich für zytosolische Interaktionspartner sowie TypI integrale Membranproteine ($N_{\text{Lumen}}/C_{\text{Zytoplasma}}$). Für eine optimale Ausbeute an zellulären Interaktionspartnern des großen HBV L-Hüllproteins wurden deshalb beide Leberzell-spezifischen cDNA - Banken gescreent. Membranproteine, bei denen sowohl der N- als auch der C-Terminus nicht in das Zytoplasma orientiert vorliegt sowie lösliche Proteine von z.B. ER und Golgi - Apparat können mit dem Split - Ubiquitin System nicht als Interaktionspartner identifiziert werden, da für eine Anschaltung der Reportergene Cub und NubG im Zytoplasma reassoziieren müssen.

Die in Kontroll - Assay und Pilot Screen ermittelten Selektionsbedingungen für den Screen der X-NubG cDNA - Bank (SD -Leu/-Trp/-His + 30 mM 3-AT) hatten eine sehr geringe Anzahl an Interaktionspartnern zur Folge, sodass zwei weitere Screens mit 5 mM bzw. 3 mM 3-AT folgten. Des weiteren wurden die Baits zweimal gegen die NubG-X cDNA - Bank gescreent, wobei eine Selektion von SD -Leu/-Trp/-His + 12 mM und 3 mM 3-AT eingesetzt wurde. Bei der Analyse der Klone der NubG-X cDNA - Bank wurde i.d.R. *Rattus norvegicus* als Spezies durch den Datenbankabgleich ermittelt. Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Leberzell-spezifische cDNA - Bank aufgrund eines Fehlers des Herstellers nicht aus humanem Gewebe hergestellt wurde. Da das Genom von Ratte und Mensch zu 90 % homolog ist (Gibbs *et al.*, 2004), können die hier ermittelten Interaktionspartner dennoch verwendet werden, vorausgesetzt es erfolgt eine Bestätigung der Interaktion mit humaner cDNA in einem unabhängigen System.

Interaktionspartner, die mit unabhängigen Baits wiederholt identifiziert werden, repräsentieren typische Falschpositive im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System.

Hierzu zählen laut Hersteller ATPasen, Proteolipid - Proteine, Ubiquitin, ADE2, Histon - Deacetylasen, Komponenten des Translokons, Signal Peptidasen, Cytochrom C und Selenoprotein K. Sie wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Putative Interaktionspartner des L-Hüllproteins, die einen positiven beta-Galaktosidase - Test aufwiesen und deren Interaktion im Hefesystem durch Retransformation bestätigt wurde, sind ihrer Häufigkeit nach geordnet in Tabelle 5-2 aufgelistet.

Tabelle 5-2: Im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System ermittelte Interaktionspartner der Baits LoHA und Lo Δ TM4:

Putativer Interaktionspartner	Anzahl	Biologische Funktion
17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase	21 x	Regulation der Aktivität von Steroid - Hormonen
Albumin	9 x	Serumprotein
Cytochrom P450	8 x	Hämprotein mit Oxidoreduktase - Aktivität
Apolipoprotein A-II	6 x	Komponente der HDL (<i>High Density Lipoprotein</i>) - Komplexe
UDP-Glucuronosyltransferase	3 x	Elimination lipophiler Verbindungen aus dem Körper
FAM18B	2 x	hypothetisches Membranprotein mit 3 TMD
Chromosom 14 ORF 147	2 x	hypothetisches Membranprotein mit 2 TMD
Peroxisomaler Biogenese Faktor 16	2 x	Biogenese der peroxisomalen Membran; Assembly von Peroxisomen
Glucosetransporter (Slc2a2)	2 x	Transport von Glucose über die Zellmembran
SAC1	2 x	Regulation der ATP - Aufnahme ins ER; Kontrolle des Phosphatidylinositol-3- bzw. 4-Phosphat Pools im ER
Apolipoprotein A-I	2 x	Komponente der HDL (<i>High Density Lipoprotein</i>)-Komplexe
Apolipoprotein C-III	2 x	Komponente der VLDL (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>) - Komplexe
Apolipoprotein C-I	1 x	Komponente der HDL (<i>High Density Lipoprotein</i>) - Komplexe
OMA1 Homolog	1 x	Zink - Metallopeptidase
Sec24 Isoform A	1 x	<i>Cargo</i> -bindende Untereinheit des CoPII-Coat Komplexes
Bet1	1 x	v-SNARE; CoPII-vermittelter vesikulärer Transport zwischen ER und Golgi - Apparat
2,3-Biphosphoglycerat-Mutase	1 x	Regulation der 2,3-Biphosphoglycerat - Synthese und - Hydrolyse in Erythrocyten
Cyclophilin B	1 x	Peptidyl-Prolyl-cis/ trans- Isomerase; Proteinfaltung
HMGB1	1 x	Bindung von einzelsträngiger DNA; Entwindung von doppelsträngiger DNA; pro-inflammatorisches Cytokin
Chromosom 14 ORF 1	1 x	hypothetisches Membranprotein mit 4 TMD

Connexin 32	1 x	Aufbau der Gap Junctions: interzelluläre Kommunikation
Natrium-Phosphat-Transporter (Slc17a2)	1 x	Natrium-gekoppelter Transport von Phosphat
Aminosäure System N-Transporter (Slc38a3)	1 x	Natrium-gekoppelter Transport von Glutamin
Peroxisomale delta 3, delta 2-enoyl-Coenzym A Isomerase	1 x	Beta-Oxidation von Fettsäuren
Peroxisomales Membranprotein 2	1 x	Poren-formende Aktivität in peroxisomaler Membran
TMEM33	1 x	hypothetisches Membranprotein mit 3 TMD
TMEM86B	1 x	hypothetisches Membranprotein mit 5 TMD
TMEM125	1 x	hypothetisches Membranprotein mit 4 TMD
AT-Motiv-bindender Faktor 1	1 x	Transkriptionsregulation
Arylacetamid Deacetylase	1 x	Aktivierung von Arylamin - Substraten zu Karzinogenen
Myosin-leichte-Ketten-Kinase	1 x	Aktivierung der ATPase-Aktivität von Myosin
DAD1	1 x	Komponente des Oligosaccharyltransferase (OST) - Komplexes; N-Glykosylierung
Profilin 1	1 x	Regulation der Aktin - Polymerisation
Otud4	1 x	hypothetisches Protein
Beta-2 Mikroglobulin	1 x	Plasmaprotein aus der Beta-Globulinfraction; Komponente des MHC-Komplexes
SNARE Protein Sec20	1 x	v-SNARE; Retrograder Transport vom Golgi - Apparat zum ER; beteiligt an N- und O-Glykosylierung im Golgi - Apparat
Squalene Synthetase	1 x	Biosynthese von Squalene, ein Vorläufer von Cholesterin
Komplementkomponente 8	1 x	Komplementsystem

Die obige Zusammenstellung der neu ermittelten, zellulären Interaktionspartner des L-Hüllproteins zeigt deutlich die Vorzüge des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems auf. Neben löslichen Proteinen, welche auch mit einem konventionellen Hefe - Zwei - Hybrid System problemlos identifiziert werden können, wurden auch mehrere Membranproteine als neue Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert. Diese können im konventionellen System aufgrund ihrer hydrophoben Transmembrandomänen schlecht in den Zellkern importiert werden und neigen zur Aggregation, wenn sie außerhalb der Membran vorliegen. Wie häufig ein Prey identifiziert wird, sagt nichts über die Stärke oder die Spezifität der Interaktion aus. Proteine wie die 17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase oder Cytochrom P450 werden von der Leberzelle in großen Mengen synthetisiert. Sie sind in einer Leberzell-spezifischen cDNA - Bank stark überrepräsentiert, was die Ursache für ihre häufige Identifikation ist.

Für weitergehende Untersuchungen im humanen Zellkultursystem wurden die am CoPII-vermittelten vesikulären Transport beteiligten Preys Bet1 und Sec24A ausgewählt.

Interessanterweise konnten damit zwei Proteine als neue Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert werden, die an dem gleichen zellulären Prozess, dem vesikulären Transport zwischen ER und Golgi - Apparat, beteiligt sind. Sowohl Bet1 als auch Sec24A wurden aus der NubG-X cDNA - Bank identifiziert. Bet1 wurde mit dem Bait LoHA, Sec24A mit dem um die vierte Transmembrandomäne verkürzten Bait Lo Δ TM4 ermittelt. Beide Proteine wiesen aber bei Retransformation mit dem entsprechenden anderen Bait vergleichbares Wachstum auf Selektionsmedium auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System erfolgreich etabliert werden konnte. Die Baits LoHA, Lo Δ TM4 und SHA werden effizient in *S. cerevisiae* exprimiert und weisen keine transaktivierenden Eigenschaften auf. Die in dieser Arbeit identifizierten, zellulären Interaktionspartner des L-Hüllproteins bieten großes Potential für weitere Analysen, die zum besseren Verständnis der Virus - Wirt - Interaktion beitragen könnten.

5.1.5 Analyse des putativen Interaktionspartners Bet1

Die gerichtete Fusion von Transportvesikeln mit ihrem Zielkompartiment wird durch die Interaktion von v-SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) in der vesikulären Membran mit t-SNAREs in der Zielmembran vermittelt (Söllner *et al.*, 1993; Rothman, 1994; Ferro-Novick und Jahn, 1994). Dabei verdrillen sich die helikalen SNARE - Domänen vierer beteiligter SNAREs und ermöglichen durch die dabei frei werdende Energie die Fusion der Membran.

Bet1 (*Blocked early in transport 1*) ist als v-SNARE am vesikulären Transport zwischen ER und Golgi - Apparat beteiligt und wird in sich vom ER abschnürende CoPII (*Coatomer protein complex-II*) - Vesikel eingebaut (Abb. 5-4). Bet1 interagiert direkt mit der CoPII - Untereinheit Sec24A und induziert hierdurch möglicherweise die Abschnürung der CoPII - Vesikel von der ER-Membran (Mossessova *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Im Komplex mit den SNAREs Syn5, GS27 und Sec22b vermittelt Bet1 die homotype Fusion von CoPII - Vesikeln zum ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*), welches auch als VTC (*vesicular tubular cluster*) bekannt ist. Der SNARE - Komplex bestehend aus Bet1, Syn5, GS28 und Ykt6 ist für die späten Transportschritte zwischen ER und Golgi verantwortlich. Er vermittelt die Fusion gereifter ERGICs mit dem cis-Golgi (Xu *et al.*, 2000; Joglekar *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001).

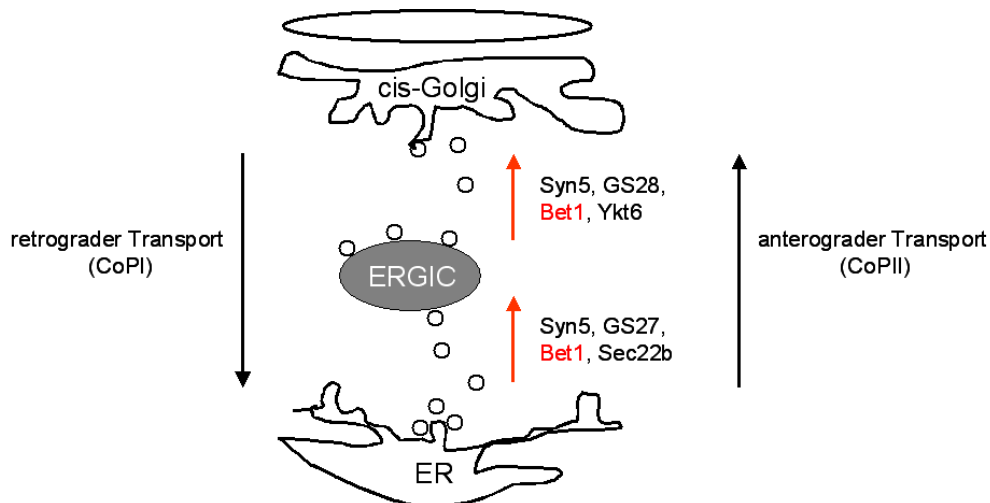


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung des vesikulären Transportes zwischen ER und Golgi - Apparat. Der v-SNARE Bet1 ist im Komplex mit den SNAREs Syn5, GS27 und Sec22b für die homotype Fusion von CoPII-Vesikeln zum ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*) verantwortlich. In einem späteren Transportschritt vermittelt Bet1 zusammen mit Syn5, GS28 und Ykt6 die Fusion des gereiften ERGICs mit dem cis-Golgi (modifiziert nach Hong, 2005).

Mit nur 118 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 13,3 kDa ist Bet1 ein relativ kleines Protein (Abb. 5-5). Es besitzt eine zentrale, hoch konservierte SNARE - Domäne (AS 36-88), welche in das Zytoplasma ragt. Aufgrund eines Glutaminrestes im zentralen, sonst hydrophoben Bereich seiner SNARE - Domäne, wird Bet1 strukturell als Qc-SNARE eingruppiert (Hong, 2005; Jahn und Scheller, 2006).

SNARE - Domänen sind das charakteristische Merkmal aller SNARE - Proteine und bestehen aus 60-70 Aminosäuren. Sie sind in einem sich wiederholenden Sequenzmotiv aus sieben Aminosäuren, dem *Heptad Repeat* - Motiv organisiert, welches die Grundlage für die Ausbildung von *coiled coil* - Strukturen bildet. Position eins und vier sind mit hydrophoben Aminosäuren, die übrigen Positionen mit polaren, hydrophilen Aminosäuren besetzt. Die SNARE - Domänen monomerer SNAREs liegen unstrukturiert vor. Treffen aber geeignete v- und t-SNAREs aufeinander, verdrillen sich ihre SNARE - Domänen in helikalen, parallelen Bündeln enormer Stabilität. Dabei bilden immer vier SNARE - Domänen einen sog. Trans - SNARE - Komplex aus. Durch die bei der Konformationsänderung frei werdende Energie kommt es zur Fusion der Vesikel mit der Zielmembran (Jahn und Scheller, 2006). Nach erfolgreicher Membranfusion wird der SNARE - Komplex in einem ATP-abhängigen Schritt durch NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) und α -SNAP (*soluble NSF attachment protein*) aufgelöst, um v- und t-SNAREs für weitere Fusionsprozesse zur Verfügung zu stellen.

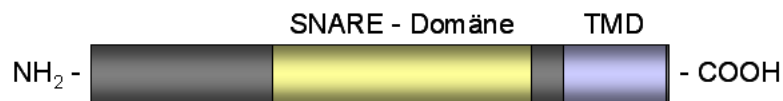


Abbildung 5-5: Modell des SNARE - Proteins Bet1. Bet1 ist ein kleines Protein von 118 AS. Zentral weist es eine konservierte SNARE - Domäne (AS 36-88), C-terminal eine Transmembrandomäne (AS 96-115) auf.

Eine Transmembrandomäne (AS 96-115) am äußersten C-Terminus weist Bet1 als Mitglied der sog. *tail-anchored* Proteinfamilie aus. Die Integration von Bet1 in die ER-Membran erfolgt posttranslational unter Vermittlung des TRC (*TMD recognition complex*) (Kutay *et al.*, 1995; Stefanovic und Hegde, 2007).

5.1.5.1 Der Prey Bet1 zeigt einen positiven beta-Galaktosidase - Nachweis

Bei einer Protein - Protein - Wechselwirkung kommt es im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System neben der Aktivierung der auxotrophen Marker *HIS3* und *ADE2*, welche Wachstum auf Selektionsmedium ermöglichen, ebenfalls zur Aktivierung des *lacZ*-Reportergens. Dieses ermöglicht zusätzlich eine kolorimetrische Analyse der Protein - Protein - Interaktion.

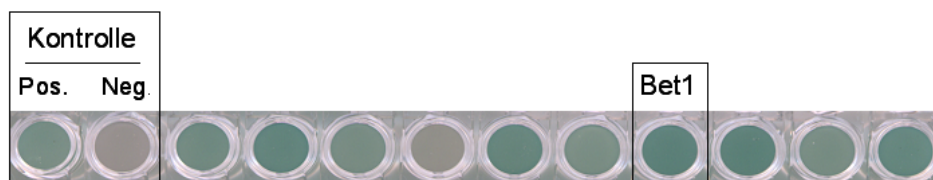


Abbildung 5-6: Bet1 zeigt einen positiven beta-Galaktosidase - Test. Die beta-Galaktosidase - Aktivität wurde mit dem *HTX Kit High Throughput β -Galactosidase Assay* ermittelt. Bet1 zeigt wie die Positivkontrolle pBT3-STE.LoHA/ pAI-Alg5 eine intensive Blaufärbung. Diese grenzt sich deutlich von der Rosafärbung der Negativkontrolle pBT3-STE.LoHA/ pDL2-Alg5 ab.

Die beta-Galaktosidase - Aktivität putativer Klone wurde mit dem *HTX Kit High Throughput β -Galactosidase Assay* (Dualsystems Biotech) bestimmt. Als Positivkontrolle wurde *S. cerevisiae* mit pBT3-STE.LoHA und pAI-Alg5, als Negativkontrolle mit pBT3-STE.LoHA und pDL2-Alg5 kotransformiert. Der Prey Bet1 zeigt wie die Positivkontrolle eine intensive Blaufärbung, die sich deutlich von der Rosafärbung der Negativkontrolle abgrenzt (Abb. 5-6). Zusammen mit dem Wachstum auf Selektionsmedium, weist dies auf eine Protein - Protein - Interaktion zwischen dem L-Hüllprotein und Bet1 hin.

5.1.5.2 Bestätigung der Interaktion von Bet1 und L in *S. cerevisiae*

Zur Bestätigung der Protein - Protein - Interaktion von Bet1 und L wurde die Bet1 Plasmid-DNA mit dem Bait - Vektor pBT3-STE.LoHA in *S. cerevisiae* retransformiert. Um die Interaktion näher zu spezifizieren, wurde der Versuch parallel mit dem kleinen S-Hüllprotein als Bait und dem leeren Bait - Vektor durchgeführt.

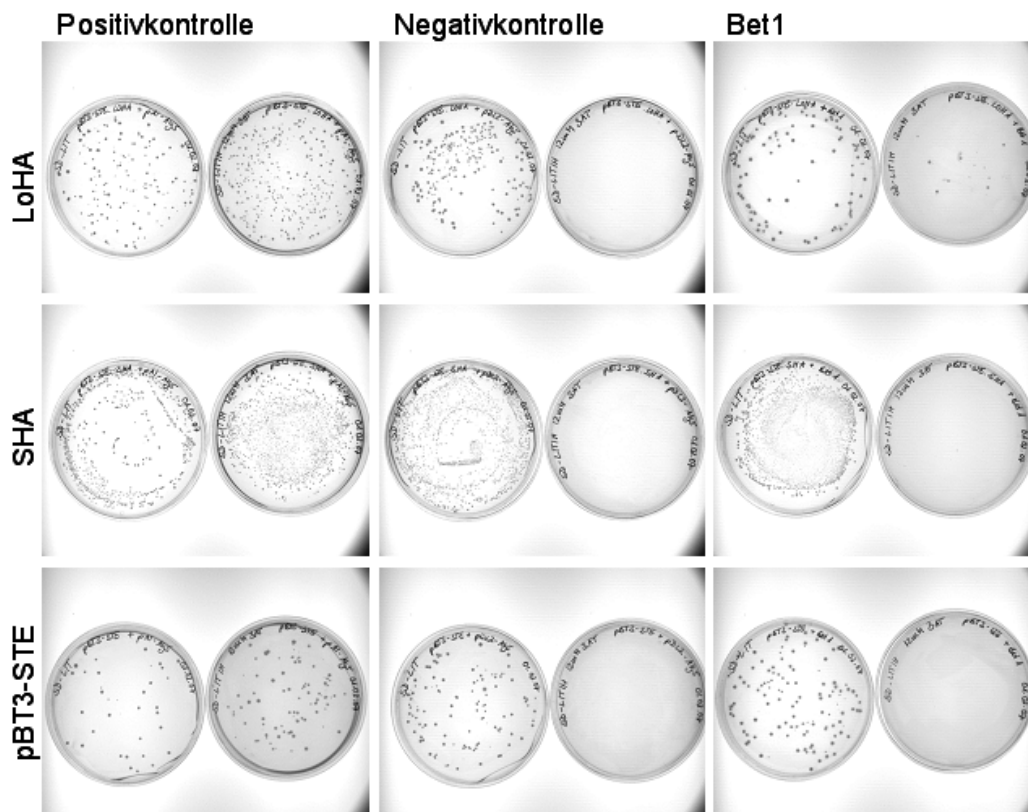


Abbildung 5-7: Bestätigung der Interaktion von Bet1 und L in *S. cerevisiae*. Bet1 Plasmid-DNA wurde mit den Baits LoHA (oben), SHA (mitte) und dem leeren Bait - Vektor (unten) in *S. cerevisiae* retransformiert. Der Transformationsansatz wurde jeweils auf SD -Leu/-Trp (links) sowie auf SD -Leu/-Trp/-His + 12 mM 3-AT (rechts) ausplattiert. Bei Retransformation von LoHA und Bet1 konnte Wachstum auf Selektionsplatten beobachtet werden, bei SHA oder dem leeren Bait - Vektor hingegen nicht.

Als Positivkontrolle wurde pAI-Alg5, als Negativkontrolle pDL2-Alg5 als Prey eingesetzt. Die Transformationseffizienz wurde durch Wachstum auf SD -Leu/-Trp Platten abgeschätzt, die Stärke der Interaktion durch Wachstum auf Selektionsplatten (SD -Leu/-Trp/-His + 12 mM 3-AT). Bet1 zeigt schwaches, aber reproduzierbares Wachstum mit LoHA. Kein Wachstum konnte hingegen mit dem S-Hüllprotein beobachtet werden (Abb. 5-7). Dies bestätigt die Protein - Protein - Wechselwirkung von Bet1 und L und zeigt zugleich, dass diese spezifisch für das große HBV - Hüllprotein ist. Des Weiteren kann eine intrinsische, transaktivierende Aktivität von Bet1 ausgeschlossen werden, da kein Wachstum auf

Selektionsplatten bei Kotransformation mit dem leeren Bait - Vektor beobachtet werden konnte.

5.1.5.3 Herstellung von Bet1 - Expressionskonstrukten

Für weitergehende Versuche im humanen Zellsystem wurden Expressionskonstrukte von Bet1 hergestellt. Ausgangsmaterial für die folgenden Klonierungen war der cDNA - Klon pCMV-SPORT6.Bet1 (*Accession Number* BC000899; RZPD) des humanen Bet1. Unter Verwendung des Primerpaares Bet1 fw_*EcoRI*/ Bet1 rv_*BamHI* wurde Bet1 in den Vektor p3xFLAG-CMV-14 kloniert und erhielt dadurch C-terminal eine dreifache FLAG-Markierung. Das theoretische Molekulargewicht von Bet1.FLAG wurde mit Hilfe von *ExPASy Peptide Mass* auf 16,4 kDa bestimmt. Des Weiteren wurde Bet1 unter Verwendung des Primerpaares Bet1Myc_fw_*EcoRI*/ Bet1Myc_rv_*BglIII* in den Vektor pCMV-Myc kloniert und erhielt hierdurch eine N-terminal gelegene Myc-Markierung. Das Molekulargewicht von Myc.Bet1 wurde mit 15,5 kDa berechnet.

Es wurden zwei Expressionskonstrukte von Bet1 hergestellt, da zunächst nicht sicher war, ob die C-terminale FLAG-Markierung die posttranslationale Integration von Bet1 in die Membran negativ beeinflussen könnte. Die N-terminal gelegene Myc-Markierung sollte keinen Einfluss auf die Insertion oder Orientierung von Bet1 in der Membran haben.

5.1.5.4 Bet1.FLAG und Myc.Bet1 werden effizient in humanen Zellen exprimiert

HuH7-Zellen wurden mit den Bet1 - Expressionskonstrukten pCMV-Myc.Bet1 und p3xFLAG-CMV-14.Bet1 transfiziert und die Proteine mit einem Bet1-spezifischen Western-Blot nachgewiesen. Neben endogenem Bet1 bei 14,5 kDa konnte Myc.Bet1 bei ca. 15 kDa und Bet1.FLAG bei ca. 18,5 kDa detektiert werden (Abb. 5-8, A).

Bet1.FLAG weist beim Nachweis mit einem anti-FLAG Antikörper drei Banden im Western-Blot auf. Eine Behandlung mit Peptid:N-Glykosidase F (PNGaseF), welche die Bindung zwischen dem Asparaginrest des Proteins und dem N-Acteylglukosamin eines gebundenen Oligosaccharids spaltet, konnte die zwei oberen Banden als N-Glykosylierungsformen von Bet1.FLAG identifizieren (Abb. 5-8, B). Eine mögliche Ursache dieser ungewöhnlichen Glykosylierung könnte in der C-terminalen Fusion der FLAG-Markierung liegen. Für ein weiteres *tail-anchored* Protein, Sec61 β , wurde nämlich beobachtet, dass eine C-terminale

CFP - Fusion in einer kotranslationalen anstatt der sonst üblichen posttranslationalen Insertion in die ER-Membran resultiert, wohingegen eine N-terminale Fusion keinen Einfluss hat (Stefanovic und Hegde, 2007).

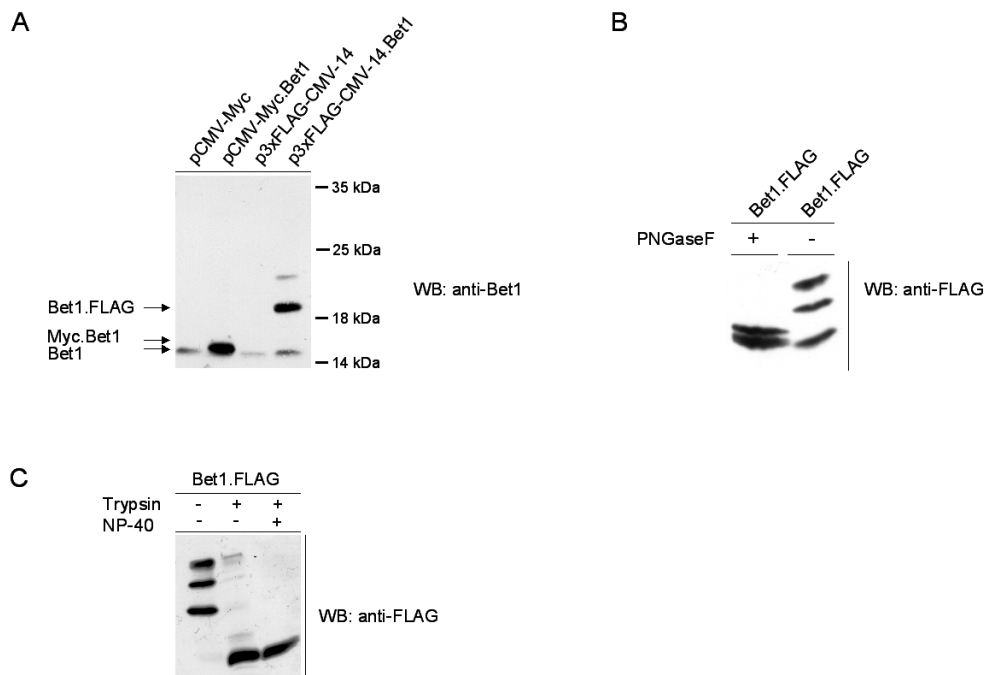


Abbildung 5-8: Nachweis der Expression und Orientierung in der Membran von Bet1. (A) HuH7-Zellen wurden mit den Bet1 - Expressionskonstrukten transfiziert. Neben endogenem Bet1 (14,5 kDa) wurde Myc.Bet1 bei ca. 15 kDa und Bet1.FLAG bei 18,5 kDa mit einem Bet1-spezifischen Western-Blot detektiert. (B) Bet1.FLAG zeigt beim Nachweis mit einem anti-FLAG Antikörper drei Banden im Western-Blot. Die beiden oberen Banden wurden durch Behandlung mit PNGaseF als N-Glykosylierungsformen identifiziert. (C) Mikrosomen transfizierter HEK293-TT Zellen wurden präpariert und ein Proteaseschutz - Versuch von Bet1.FLAG durchgeführt. In Anwesenheit von Trypsin wird Bet1.FLAG vollständig degradiert.

Die Vermutung, dass Bet1.FLAG ebenfalls kotranslational in die ER-Membran integriert wird, liegt nahe. Deshalb wurde ein Proteaseschutz - Versuch durchgeführt, um auszuschließen, dass die Orientierung von Bet1.FLAG in der ER-Membran verändert ist (Abb. 5-8, C). Mikrosomen transfizierter HEK293-TT Zellen wurden präpariert und entweder nicht behandelt, mit Trypsin behandelt oder mit Trypsin in Anwesenheit von NP-40 behandelt. Bet1.FLAG wurde durch die Behandlung mit Trypsin sowohl in intakten Mikrosomen (Abb. 5-8, C; Spur 2) als auch in zerstörten Mikrosomen (Abb. 5-8, C; Spur 3) vollständig degradiert. Dies bedeutet, dass die zytosolische Ausrichtung von Bet1 durch die FLAG-Markierung nicht beeinflusst wird.

Die korrekte intrazelluläre Lokalisation von Bet1.FLAG und Myc.Bet1 wurde immun-histochemisch in HuH7-Zellen überprüft. HuH7-Zellen eignen sich aufgrund ihrer Größe gut für Immunfluoreszenzanalysen, da intrazelluläre Strukturen deutlich besser voneinander

abzugrenzen sind als bei den kleineren HEK293-TT Zellen. Um eine mögliche Kolo­kalisierung mit dem L-Hüllprotein nachzuweisen, wurden einige Ansätze mit pNI2.LoHA kotransfiziert. In diesem Konstrukt ist die Expression des kleinen und mittleren Hüllproteins durch Mutation ihrer Start - Kodons inhibiert (Löffler-Mary *et al.*, 2000), so dass es zu alleiniger Expression des L-Hüllproteins kommt.

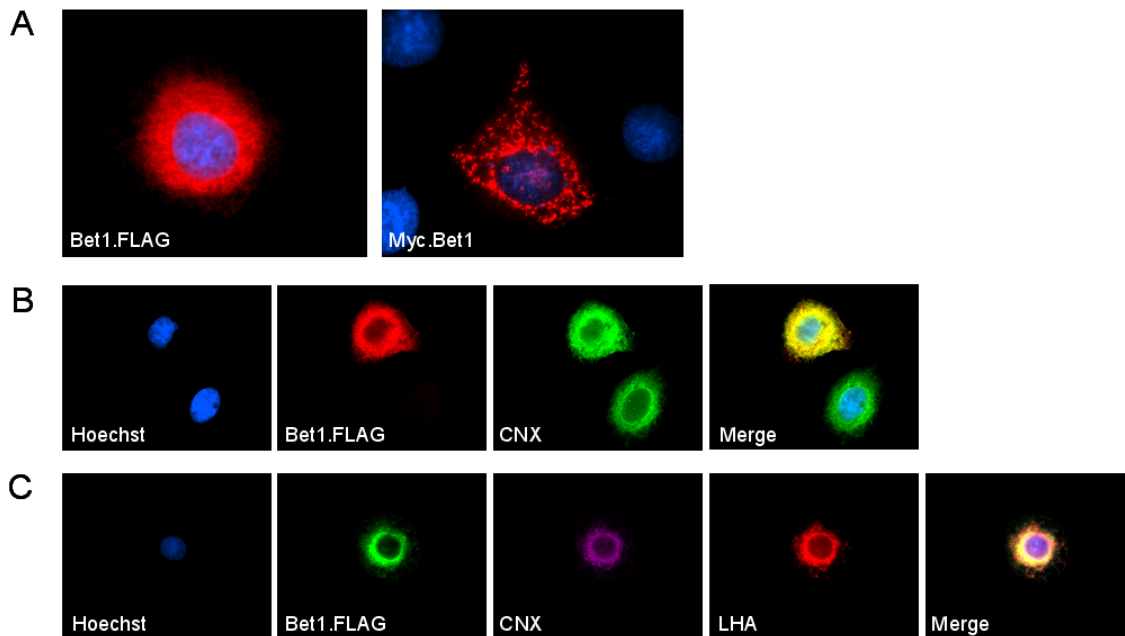


Abbildung 5-9: Immunfluoreszenzanalyse zur Expression und zellulären Lokalisation von Bet1.FLAG und Myc.Bet1. Zum Nachweis der Bet1 - Expression wurden HuH7-Zellen mit den Bet1 - Expressionskonstrukten alleine oder in Kombination mit pNI2.LoHA transfiziert. Bet1.FLAG wurde mit einem FLAG-spezifischen AK, Myc.Bet1 mit einem Myc-spezifischen AK immun-histochemisch nachgewiesen. LHA wurde mit K47, einem PräS1-spezifischen AK, oder bei gleichzeitiger Detektion des ER-Markers Calnexin mit einem HA-spezifischen Antikörper markiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte über Alexa Fluor-gekoppelte Sekundärantikörper. Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 markiert.

Als ein am CoPII-vermittelten Transport beteiligter v-SNARE wurde Bet1 zwischen ER und Golgi - Apparat erwartet. Bedingt durch seine C-terminale Transmembrandomäne sollte eine Membranfärbung von ER, ERGIC oder Golgi - Apparat vorliegen bzw. vesikuläre Strukturen der CoPII - Vesikel zu beobachten sein. So wurde von Zhang *et al.* (1997) für endogenes Bet1 der Ratte eine punktartige Verteilung im Zytoplasma mit besonderer Anreicherung im ERGIC beschrieben. Myc.Bet1 zeigt eine vesikuläre Verteilung innerhalb der Zelle, die in Kernnähe verstärkt vorliegt (Abb. 5-9, A), und entspricht damit dem von Zhang *et al.* beschriebenen punktartigen Phänotyp. Im Gegensatz dazu weist Bet1.FLAG eine netzartige intrazelluläre Verteilung auf, wie sie bei Proteinen des ERs zu beobachten ist (Abb. 5-9, A). Sie zeichnet sich durch membranartige Strukturen mit besonders starker Konzentration in Kernnähe aus. Ein derartiger Phänotyp wurde von Zhang *et al.* ebenfalls beschrieben. Sie konnten nach

viraler Infektion und Akkumulation von *Cargo* - Proteinen im ER eine Umverteilung des endogenen Bet1 von vesikulären Strukturen zu einer reinen ER-Lokalisation beobachten. Da die Abschnürung der CoPII - Vesikel am ER erfolgt, wurde endogenes, membranständiges Calnexin ebenfalls immun-histochemisch markiert. Bet1 assoziiert sowohl mit der ER-Membran, wie die Kolokalisation von Bet1.FLAG und Calnexin bestätigt (Abb. 5-9, B), als auch mit dem L-Hüllprotein (Abb. 5-9, C).

Die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung von Bet1.FLAG und Myc.Bet1 könnte in ihren Markierungen begründet sein. Womöglich hält der relativ große, mit sauren Aminosäuren angereicherte, dreifache FLAG-Tag Bet1 in der Membran des ERs zurück, wohingegen der nur aus 13 Aminosäuren bestehende N-terminal fusionierte Myc-Tag keinerlei Auswirkung auf den Einbau von Bet1 in die sich vom ER abschnürenden Vesikel hat.

5.1.5.5 Analyse der Interaktion von Bet1 und L

Bet1 konnte als Interaktionspartner von L im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei -Hybrid System identifiziert werden. Bet1 zeigt Wachstum auf Selektionsmedium, einen positiven beta-Galaktosidase - Test sowie Wachstum bei Retransformation der Prey - DNA mit dem Bait LoHA. Da falsch-positive Ergebnisse im Hefe - Zwei -Hybrid System nicht ausgeschlossen werden können, wurde die Protein - Protein - Interaktion von Bet1 und L im humanen Zellkultursystem mittels Ko-Immunpräzipitation überprüft.

HEK293-TT Zellen tragen das T-Antigen des Simian - Virus 40 zweimal stabil integriert (Buck *et al.*, 2004). Sie ermöglichen eine starke ektopische Expression von Proteinen, deren Plasmid einen SV40 Ori (*origin of replication*) aufweist, wie z.B. das pNI2.LoHA Plasmid. Deshalb wurden für nachfolgende Versuche, bei denen L in großer Menge benötigt wurde, wie z.B. Ko-Immunpräzipitationen und Proteaseschutz - Versuche, HEK293-TT Zellen verwendet.

HEK293-TT Zellen wurden transient mit p3xFLAG-CMV-14.Bet1 bzw. pCMV-Myc.Bet1 und pNI2.LoHA kotransfiziert. Die Durchführung der Immunpräzipitation erfolgte wie unter Punkt 4.3.7 beschrieben. Für den Nachweis der Interaktion von Bet1.FLAG mit L wurden Tosyl - aktivierte *Dynabeads* mit dem PräS1-spezifischen Antikörper MA18/7 oder BSA gekoppelt. L wurde effizient präzipitiert (Abb. 5-10, A; Spur 5). Es wurde wiederholt die nicht-glykosylierte Form von Bet1.FLAG mit L kopräzipitiert (Abb. 5-10, A; Spur 5).

Für den Nachweis der Interaktion von Myc.Bet1 mit L wurden Tosyl - aktivierte *Dynabeads* mit dem Antikörper MA18/7 oder Maus IgG gekoppelt. Die Zellen wurden im Gegensatz zu dem sonst für Ko-Immünpräzipitationen verwendeten milden CHAPS - Lysepuffer in NP-40 Lysepuffer aufgeschlossen, um unspezifische Bindungen von Myc.Bet1 an die *Dynabeads* zu minimieren. Myc.Bet1 konnte, wie auch Bet1.FLAG, spezifisch mit L kopräzipitiert werden (Abb. 5-10, B; Spur 3).

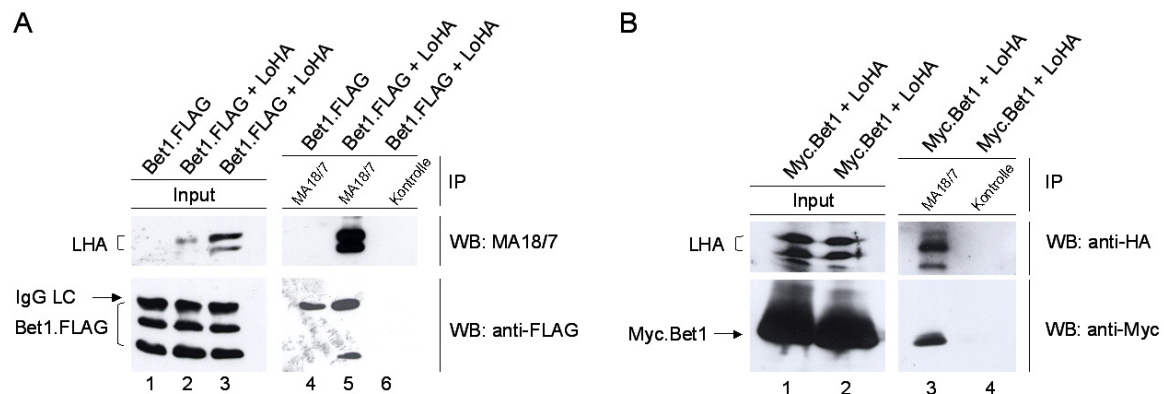


Abbildung 5-10: Nachweis der Interaktion von Bet1 und L mittels Ko-Immünpräzipitation. (A/B) HEK293-TT Zellen wurden mit Bet1.FLAG bzw. Myc.Bet1 und pN12.LoHA kotransfiziert. Zum Nachweis der Interaktion von Bet1 und L wurden Tosyl - aktivierte *Dynabeads* mit MA18/7 oder einer Kontrolle (BSA (A); Maus IgG (B)) gekoppelt. Sowohl Bet1.FLAG (A; Spur 5) als auch Myc.Bet1 (B; Spur 3) konnten spezifisch mit L kopräzipitiert werden. Abkürzungen: IgG LC = Immunglobulin G leichte Kette.

Die drei Hüllproteine des Hepatitis B - Virus weisen C-terminal die Sequenz des S-Proteins auf und unterscheiden sich lediglich in der Länge ihrer N-terminalen Extension (vgl. Kapitel 1.1.2). Nachfolgend wurde der Bereich innerhalb von L charakterisiert, der für die Bindung an Bet1 verantwortlich ist. Hierzu wurden die drei Hüllproteine S, M und L unter Verwendung von *Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG* und dem S-spezifischen Antikörper K38 präzipitiert. Des weiteren wurde eine Mutante von L (Llle9.HA) eingesetzt, bei der das Signalpeptid des humanen Interleukin-9 N-terminal an die Sequenz des L-Proteins fusioniert wurde (Hartmann-Stühler und Prange, 2001). Dies resultiert in einer kotranslationalen Translokation der PräS-Region in das ER, was eine rein luminalen Lokalisation zur Folge hat. Bet1 konnte mit dem M- und dem L-Hüllprotein sowie der Llle9.HA-Mutante kopräzipitiert werden, nicht aber mit dem S-Hüllprotein (Abb. 5-11). Die Beobachtung, dass Bet1 nicht mit dem kleinen Hüllprotein kopräzipitiert werden konnte, bestätigt das Ergebnis des direkten Interaktionstests in der Hefe (Abb. 5-7), bei dem ebenfalls keine Interaktion von Bet1 mit dem Bait SHA detektiert werden konnte.

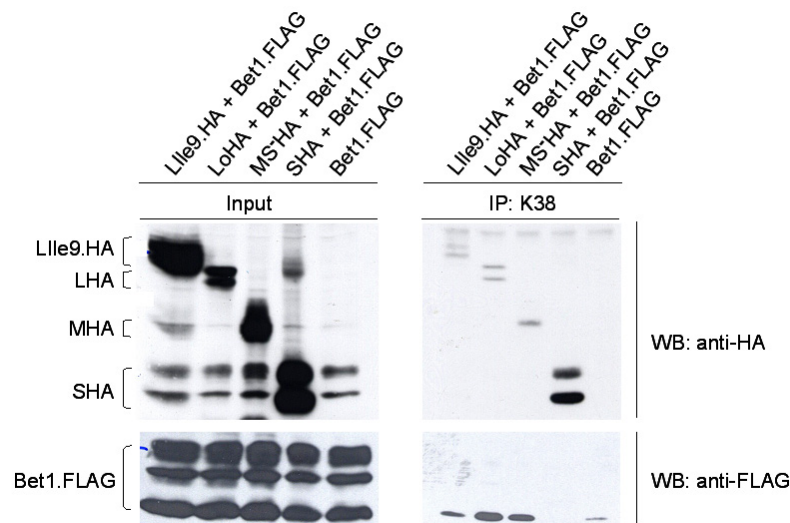


Abbildung 5-11: Charakterisierung des Bet1 - Bindungsbereiches innerhalb des L-Hüllproteins. Bet1.FLAG und die HBV - Hüllproteine S, M und L sowie eine L-Mutante mit kotranslatationaler Translokation der PräS1-Region (Llle9.HA) wurden in HEK293-TT Zellen exprimiert. Die Hüllproteine wurden mit dem S-spezifischen Antikörper K38 präzipitiert. Bet1.FLAG konnte mit dem L- und M-Hüllprotein sowie der Llle9.HA-Mutante kopräzipitiert werden, nicht aber mit dem S-Hüllprotein.

Der Bindungsbereich für Bet1 scheint demnach innerhalb der PräS2 - Region zu liegen, da sowohl M als auch L diese Region als N-terminale Extension zum S-Protein aufweisen. *In vivo* sollte Bet1 allerdings nicht mit der PräS2 - Region des M-Hüllproteins oder der PräS - Region von Llle9.HA interagieren können, da diese rein luminal orientiert vorliegen. Bet1 hingegen besitzt bis auf drei Aminosäurereste eine rein zytosolische Ausrichtung. Die hier beobachtete Interaktion von Bet1 mit M und Llle9.HA scheint demnach unphysiologischer Natur zu sein und durch die Solubilisierung der Hüllproteine mit Detergenz-haltigem Lysepuffer hervorgerufen zu sein. Das L-Hüllprotein sollte aufgrund seiner dualen Topologie und der damit verbundenen partiellen zytosolischen Ausrichtung der PräS-Region sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit Bet1 interagieren können.

5.1.5.6 Einfluss der Depletion von Bet1 auf die Freisetzung subviraler Partikel

Nachdem die Bindung von L und Bet1 im humanen Zellkultursystem bestätigt werden konnte, wurde die Relevanz dieser Protein - Protein - Interaktion für das Hepatitis B - Virus ermittelt. Hierzu wurde die Freisetzung subviraler Partikel (SVP) nach Depletion von Bet1 gemessen. Da humane Leberzellen die natürlichen Wirtszellen von HBV darstellen und virale Promotor - und Enhancer - Elemente durch leberspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert werden (vgl. Kapitel 1.1.3), wurden für die Analyse subviraler Partikel HuH7-Zellen eingesetzt.

Es wurden sowohl subvirale Partikel, die einzig das S-Hüllprotein in ihre Lipidmembran integriert haben (S-haltige SVP), als auch solche, die neben dem S- auch das M- und L-Hüllprotein aufweisen (L-haltige SVP), getestet. HuH7-Zellen wurden mit Bet1-spezifischer oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit pMSV.SHA, einem Plasmid, bei dem das kleine S-Hüllprotein in HA-markierter Form unter Kontrolle des humanen Metallothionein-IIa-Promotors steht, oder mit pHBV.C. In diesem Plasmid ist ein kloniertes HBV - Genom integriert, so dass die drei Hüllproteine S, M und L mit ihren natürlichen Promotoren vorliegen. Aufgrund einer Mutation, die die Expression von Core und somit die Bildung von Kapsiden verhindert, findet beim Einsatz von pHBV.C keine HBV - Replikation statt.

Die Anzahl intrazellulär vorliegender SVP wurde aus dem Lysat, die der extrazellulär vorliegenden SVP aus dem Überstand bestimmt. Die Angabe Prozent Freisetzung ergibt sich durch Division des Wertes der extrazellulär vorliegenden durch den für die intrazellulär vorliegenden SVP. Die Kontroll - Werte wurden anschließend auf 100 % gesetzt. Die Freisetzung S-haltiger SVP wurde unter Verwendung des *Auszyme Monoclonal Kits* (ABBOTT) im HBsAg - ELISA ermittelt, die der L-haltigen SVP wurde mit einem PräS1 - spezifischen ELISA gemessen.

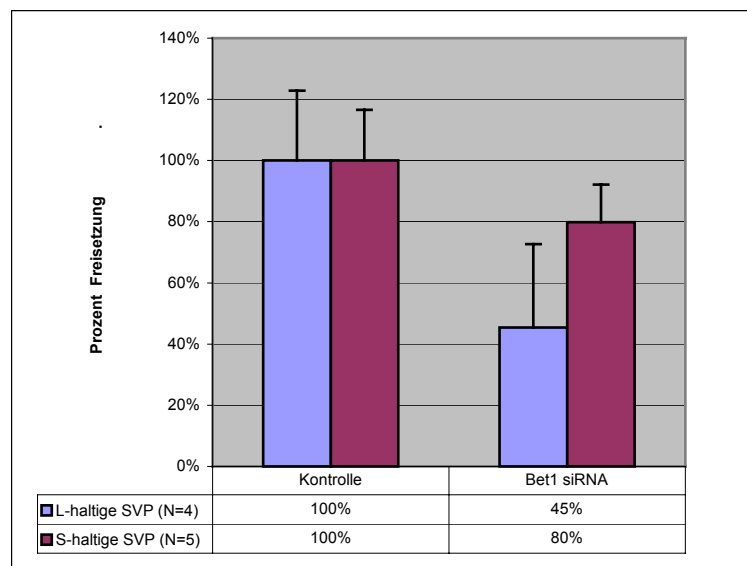


Abbildung 5-12: Freisetzung subviraler Partikel nach Depletion von Bet1. HuH7-Zellen wurden mit Kontroll- oder Bet1-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit pMSV.SHA oder pHBV.C. Nach Depletion von Bet1 findet eine Reduktion der Freisetzung L-haltiger SVP auf ca. 45 % und S-haltiger SVP auf ca. 80 % statt.

Die Depletion von Bet1 bewirkt eine deutliche Reduktion der Freisetzung L-haltiger subviraler Partikel auf ca. 45 %. Im Gegensatz hierzu wird die Freisetzung S-haltiger SVP nur

geringfügig auf ca. 80 % des Kontroll - Wertes reduziert (Abb. 5-12). Dies bedeutet, dass die mittels Ko-Immünpräzipitation beobachtete L-spezifische Interaktion von Bet1 auch *in vivo* relevant ist.

Um die Effizienz der Depletion von Bet1 zu ermitteln, wurden Aliquots der im HBsAg - und PräS1 - ELISA eingesetzten Lysate elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Bet1 wird durch die Bet1-spezifische siRNA nahezu vollständig depletiert. Die Depletion von Bet1 hat weder einen Einfluss auf die Signalstärke noch auf das Glykosylierungsmuster von S oder L, was dafür spricht, dass deren Proteinbiosynthese nicht beeinflusst wird (Abb. 5-13). Geht man davon aus, dass die zelluläre Proteinkonzentration von S und L nicht verändert wird, bedeutet dies, dass die im ELISA ermittelte Reduktion der Freisetzung subviraler Partikel nach Depletion von Bet1 aus einer geringeren Anzahl an SVP im Überstand resultieren müsste.

Das sekretorische Protein Hämopexin (HXP) zeigt nach Depletion von Bet1 eine Reduktion der Signalstärke sowohl in der zellulären als auch in der sekretierten Form (Abb. 5-13). Die Depletion von Bet1 scheint die Proteinbiosynthese von Hämopexin negativ zu beeinflussen. Da die Zellen die siRNA - Behandlung an sich gut vertragen, wie die konstante zelluläre Proteinkonzentration von S und L bestätigt, könnte die Ursache in einem sogenannten *off-target* Effekt der Bet1 siRNA liegen, d.h. einem unspezifischen Effekt unabhängig von der Ziel - mRNA.

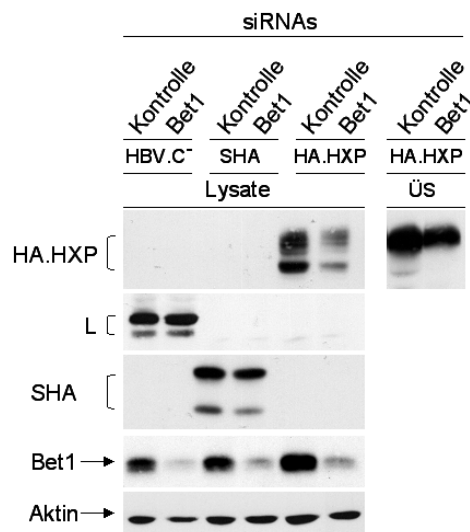


Abbildung 5-13: Depletion von Bet1 und ihre Auswirkung auf die Expression von S und L. Aliquots der im HBsAg - und PräS1 - ELISA eingesetzten Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Der Einsatz der Bet1-spezifischen siRNA inhibiert die Expression von Bet1 nahezu vollständig im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Nach Depletion von Bet1 konnte kein Unterschied in der Signalstärke von S und L detektiert werden. Das sekretorische Protein Hämopexin (HXP) zeigt nach Bet1-Depletion ein reduziertes Signal sowohl der zellulären als auch der sekretierten Form. Ein Western-Blot gegen endogenes Aktin dient als Ladekontrolle.

Zusammenfassend konnte das im Hefesystem als neuer Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifizierte Bet1 auch im humanen Zellkultursystem bestätigt werden. Sowohl Bet1.FLAG als auch Myc.Bet1 konnten erfolgreich mit L kopräzipitiert werden. Im Gegensatz dazu konnte Bet1 nicht mit dem kleinen Hüllprotein kopräzipitiert werden und zeigte auch im Hefesystem kein Wachstum auf Selektionsmedium mit dem Bait SHA. Der Bindungsbereich für Bet1 konnte auf die PräS2-Region eingegrenzt werden, welche aufgrund der zytosolischen Ausrichtung von Bet1 im Zytoplasma vorliegen muss. Dies bedeutet, dass die Bet1 - Interaktion *in vivo* L-spezifisch ist. Dies wird dadurch untermauert, dass eine Depletion des endogenen Bet1 die Freisetzung L-haltiger subviraler Partikel drastisch, die der S-haltigen SVP nur minimal reduziert.

5.1.6 Analyse des putativen Interaktionspartners Sec24A

Die Unterteilung eukaryotischer Zellen in einzelne Kompartimente erfordert effektive Transportmechanismen, die eine intrazelluläre Kommunikation ermöglichen. Bislang sind drei Proteinkomplexe, Clathrin, CoPI und CoPII bekannt, die Transportvesikel umgeben und deren Abschnürung vermitteln (Gürkan *et al.*, 2006; Stagg *et al.*, 2007). Das in dieser Arbeit als Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifizierte Sec24A ist eine Untereinheit des CoPII - Coat Komplexes. Dieser vermittelt den anterograden Transport zwischen ER und Golgi - Apparat unter Abschnürung von CoPII - Vesikeln an spezialisierten Strukturen des ERs, den sog. ERES (*ER export sites*) (Palade, 1975; Watson und Stephens, 2005; Watson *et al.*, 2006). CoPII - Vesikel haben einen Durchmesser von ca. 60 bis 65 nm, sind aber durch einen sehr flexiblen Aufbau auch für den Export großer Proteinkomplexe geeignet.

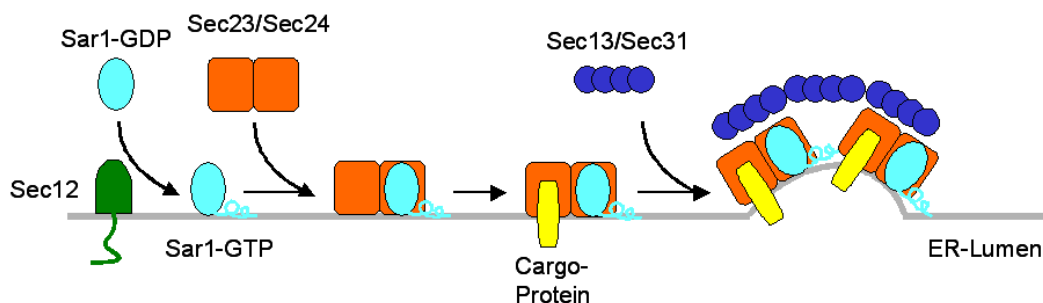


Abbildung 5-14: Assembly des CoPII - Coat Komplexes. Die GTPase Sar1 wird durch den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sec12 an die ER-Membran rekrutiert. Durch den Austausch von Sar1-GDP nach Sar1-GTP wird das Assembly des CoPII - Coats initiiert (1). Sar1-GTP rekrutiert den heterodimeren Adapterprotein-Komplex aus Sec23 und Sec24, wobei Sec23 direkt mit Sar1 interagiert (2). Sec24 bindet ER-Exportsequenzen der *Cargo* - Proteine, welche CoPII-transportiert werden sollen (3). Die Rekrutierung eines weiteren heterotetrameren Komplexes aus Sec13 und Sec31 führt schließlich zur Deformation der Membran und Abknospung der CoPII - Vesikel (4). Modifiziert nach Lee *et al.*, 2004.

Die Rekrutierung des CoPII - Coats wird durch die Aktivierung der kleinen GTPase Sar1 durch den Guanin - Nukleotid - Austauschfaktor Sec12 initiiert (Weissman *et al.*, 2001). Sar1-GTP wird durch eine Konformationsänderung in der Membran des ERs verankert und rekrutiert daraufhin den heterodimeren Adapterprotein - Komplex Sec23-Sec24. Die molekulare Struktur dieses sog. *prebudding* - Komplexes konnte durch Röntgenstruktur - Analyse aufgeklärt werden (Bi *et al.*, 2002; Mancias und Goldberg, 2005). Bei der Untereinheit Sec23 handelt es sich um ein Sar1-spezifisches GTPase aktivierendes Protein, wohingegen Sec24 *Cargo* - Proteine über deren ER-Exportmotive bindet. Membranständige *Cargo* - Proteine interagieren dabei direkt mit Sec24, lösliche indirekt über einen membranständigen *Cargo* - Rezeptor in der ER-Membran. In Säugerzellen kommen vier Sec24 Isoformen (A - D) vor, welche unterschiedliche ER-Exportmotive erkennen und sich z.T. in ihrer Funktion ersetzen (Pagano *et al.*, 1999; Tang *et al.* 1999; Nufer *et al.*, 2002; Wendeler *et al.*, 2007). Die Rekrutierung des heterotetrameren Komplexes aus Sec13 und Sec31, der das eigentliche Gerüst der CoPII - Vesikel bildet, führt schließlich zur Deformation der Membran und Abknospung von CoPII - Vesikeln (Stagg *et al.*, 2006; 2007).

5.1.6.1 Der Prey Sec24A zeigt einen positiven beta-Galaktosidase - Nachweis

Die beta-Galaktosidase - Aktivität des Preys Sec24A wurde mit dem *HTX Kit High Throughput β -Galactosidase Assay* analog zu dem Prey Bet1 bestimmt. Sec24A zeigt wie die Positivkontrolle eine intensive Blaufärbung, die sich deutlich von der Rosafärbung der Negativkontrolle abgrenzt (Abb. 5-15).

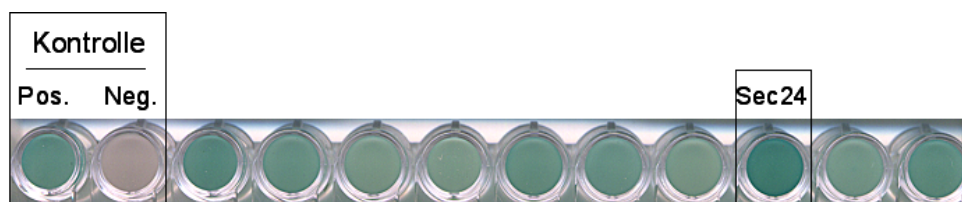


Abbildung 5-15: Sec24A weist einen positiven beta-Galaktosidase - Test auf. Die beta-Galaktosidase - Aktivität wurde mit dem *HTX Kit High Throughput β -Galactosidase Assay* ermittelt. Sec24A zeigt wie die Positivkontrolle pBT3-STE.Lo Δ TM4/ pAI-Alg5 eine intensive Blaufärbung. Diese grenzt sich deutlich von der Rosafärbung der Negativkontrolle pBT3-STE.Lo Δ TM4/ pDL2-Alg5 ab.

Dies bedeutet, dass das *lacZ* - Reporter gen und damit das Enzym beta-Galaktosidase aktiviert wurde. Zusammen mit dem Wachstum auf Selektionsmedium, weist dies auf eine Protein - Protein - Interaktion zwischen dem L-Hüllprotein und Sec24A hin.

5.1.6.2 Bestätigung der Interaktion von Sec24A mit S und L in *S. cerevisiae*

Zur Bestätigung der Protein - Protein - Interaktion von Sec24A und L wurde die Sec24A Plasmid-DNA mit dem Bait - Vektor pBT3-STE.Lo Δ TM4 in *S. cerevisiae* retransformiert. Um die Interaktion näher zu spezifizieren wurde der Versuch parallel mit dem S-Hüllprotein als Bait und dem leeren Bait - Vektor analog zu dem Prey Bet1 durchgeführt (vgl. Kapitel 5.1.5.2). Sec24A zeigt robustes Wachstum sowohl mit dem Bait Lo Δ TM4 als auch mit SHA (Abb. 5-16). Die Protein - Protein - Wechselwirkung von Sec24A und L scheint demnach nicht spezifisch für das große L-Hüllprotein zu sein. Des weiteren konnten vereinzelt Kolonien auf Selektionsmedium mit dem leeren Bait - Vektor beobachtet werden. Dies deutet auf eine geringe transaktivierende Aktivität von Sec24A hin.

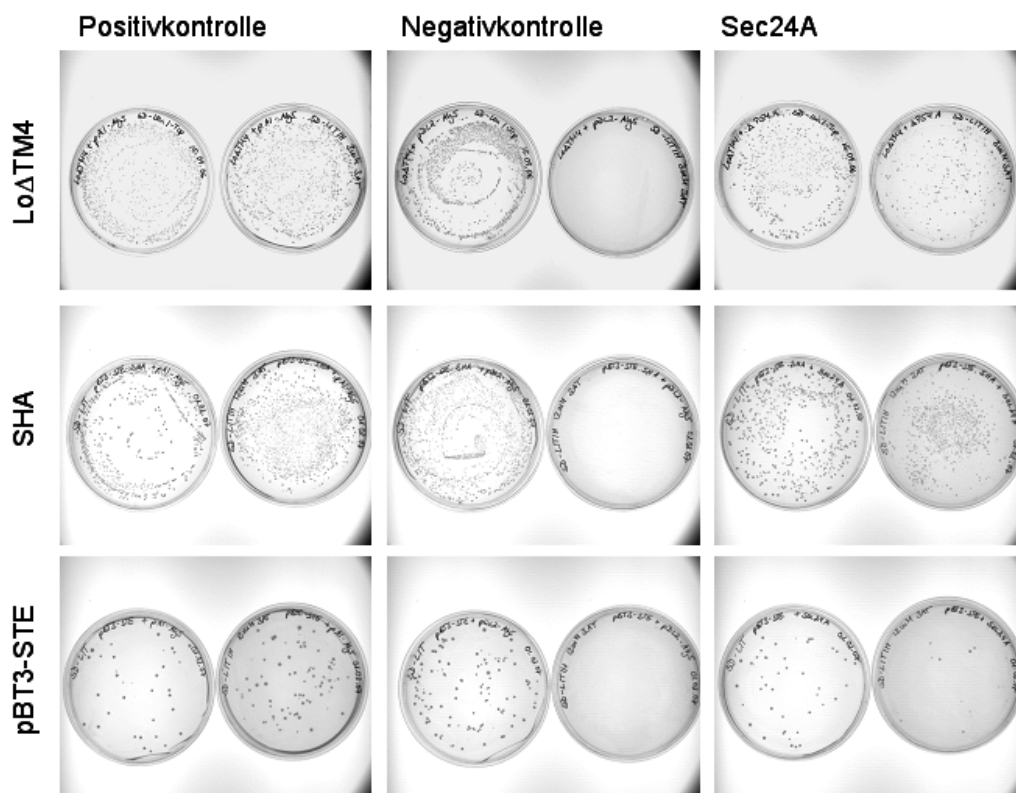


Abbildung 5-16: Bestätigung der Interaktion von Sec24A mit S und L in *S. cerevisiae*. Sec24A Plasmid-DNA wurde mit den Baits Lo Δ TM4 (oben), SHA (mitte) und dem leeren Bait - Vektor (unten) in *S. cerevisiae* retransformiert. Der Transformationsansatz wurde auf SD -Leu/-Trp (links) sowie auf Selektionsmedium (rechts) ausplattiert. Sec24A zeigte robustes Wachstum mit Lo Δ TM4 und SHA sowie vereinzelt Kolonien mit dem leeren Bait - Vektor.

5.1.6.3 Herstellung eines Sec24A - Expressionskonstruktes

Für weitergehende Versuche im humanen Zellkultursystem wurde die cDNA - Sequenz des humanen Sec24A in den Vektor p3xFLAG-CMV-10 kloniert, so dass Sec24A N-terminal eine dreifache FLAG-Markierung erhielt. Für die Herstellung des Expressionskonstruktes wurde der cDNA - Klon pOTB7.Sec24A (*Accession Number* BC019341; RZPD) und das Primerpaar Sec24A_fw_BC019341/ Sec24A_rv_BC019341 verwendet. FLAG-markiertes Sec24A weist mit 646 AS ein theoretisches Molekulargewicht von 69 kDa auf. Sec24A liegt mehrfach annotiert in der Datenbank vor. Die hier eingesetzte Form ist C-terminal verkürzt, weist aber die für alle Mitglieder der Sec24 - Familie hoch konservierte Region bestehend aus zwei Cystein - Tandems im Abstand von 17 bzw. 18 Aminosäuren auf. Es wird angenommen, dass diese einem Zink - Finger - Motiv ähnliche Region essentiell an der *Cargo* - Bindung beteiligt ist (Pagano *et al.*, 1999).

5.1.6.4 Nachweis der Expression von FLAG.Sec24A

Für den Nachweis der Expression von FLAG.Sec24A wurden HuH7-Zellen mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A transfiziert. In einem FLAG-spezifischen Western-Blot konnte ein deutliches Signal knapp oberhalb der 66 kDa Markerbande beobachtet werden, welches dem vorhergesagten Molekulargewicht von 69 kDa entspricht. Des weiteren konnte wiederholt eine Bande bei ca. 48 kDa detektiert werden, welche wahrscheinlich auf ein Abbauprodukt von FLAG.Sec24A zurück zu führen ist (Abb. 5-17).

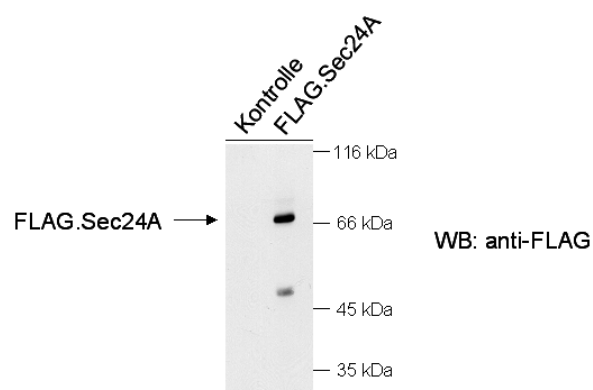


Abbildung 5-17: Nachweis der Expression von FLAG.Sec24A. HuH7-Zellen wurden mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A transfiziert. FLAG.Sec24A konnte in einem FLAG-spezifischen Western-Blot bei ca. 69 kDa neben einer Abbaubande bei 48 kDa detektiert werden.

Die korrekte intrazelluläre Lokalisation von FLAG.Sec24A wurde nachfolgend durch eine immun-histochemische Analyse überprüft. HuH7-Zellen wurden mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A transfiziert und nach 48 h fixiert. Zum Nachweis einer möglichen Kolo-kalisation mit dem L-Hüllprotein wurden einige Ansätze mit pNI2.LoHA kotransfiziert.

Bei Sec24A handelt es sich um ein lösliches Protein des Zytoplasmas, das aufgrund seiner Funktion als Komponente des CoPII - Coats zur ER-Membran rekrutiert wird. Eine Färbung der ER-Membran erfolgte durch Markierung des endogenen Proteins Calnexin. FLAG.Sec24A zeigt eine zytosolische Verteilung mit besonderer Anreicherung im Bereich des ERs. Mit dem ER-Marker Calnexin und dem L-Hüllprotein konnte eine partielle Kolo-kalisation in Kernnähe beobachtet werden (Abb. 5-18).

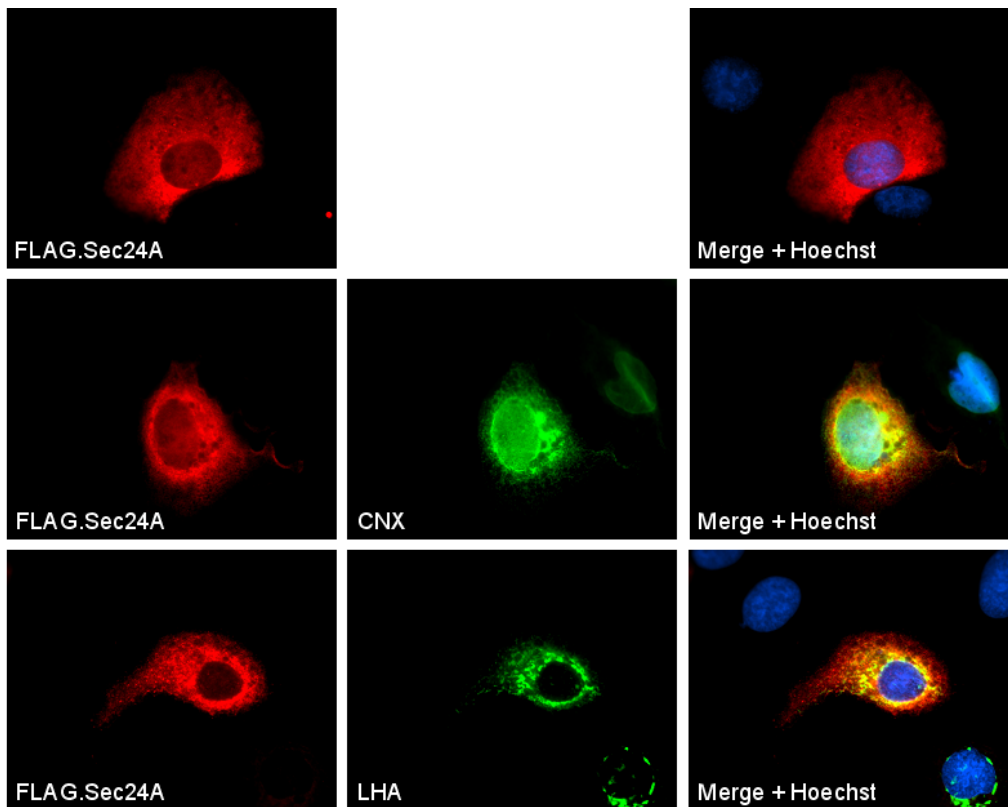


Abbildung 5-18: Immun-histochemischer Nachweis der Expression und intrazellulären Lokalisation von FLAG.Sec24A. HuH7-Zellen wurden mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A und z.T. mit pNI2.LoHA kotransfiziert. FLAG.Sec24A wurde mit einem anti-FLAG Antikörper, das L-Hüllprotein mit dem PräS1-spezifischen Antikörper K47 und Calnexin mit einem Calnexin-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch Alexa Fluor-gekoppelte Sekundäntikörper. Die Zellkerne wurden durch den Farbstoff Hoechst 33342 markiert.

5.1.6.5 Analyse der Interaktion von Sec24A und L

Sec24A konnte als Interaktionspartner von L im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei -Hybrid System identifiziert werden. Sec24A zeigt Wachstum auf Selektionsmedium, einen positiven beta-Galaktosidase - Test sowie Wachstum bei Retransformation der Prey - DNA mit den Baits Lo Δ TM4 und SHA. Nachfolgend wurde die Protein - Protein - Interaktion von FLAG.Sec24A und L im humanen Zellkultursystem mittels Ko-Immunpräzitation überprüft.

HEK293-TT Zellen wurden mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A und pNI2.LoHA kotransfiziert. FLAG.Sec24A wurde spezifisch mit anti-FLAG gekoppelten *Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG* präzipitiert. Das L-Hüllprotein konnte mit FLAG.Sec24A kopräzipitiert werden, nicht aber mit Kontroll IgG-gekoppelten *Dynabeads*, was für eine spezifische Interaktion von L und Sec24A im humanen Zellkultursystem spricht (Abb. 5-19; Spur 3).

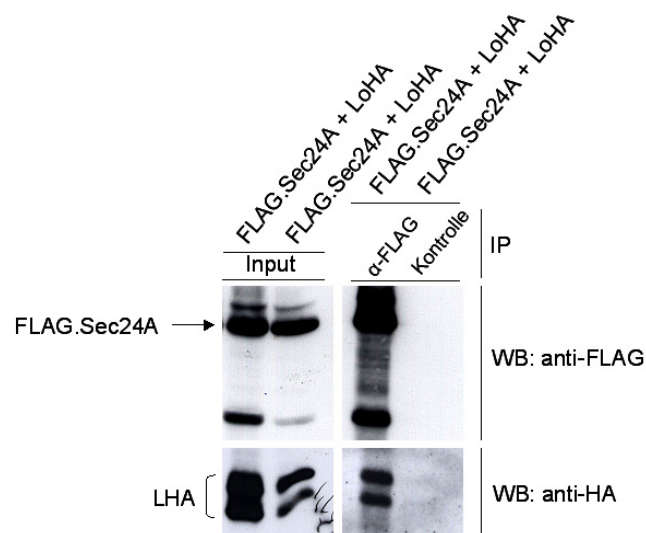


Abbildung 5-19: Nachweis der Interaktion von Sec24A und L mittels Ko-Immunpräzitation. HEK293-TT Zellen wurden mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A und pNI2.LoHA kotransfiziert. Für die spezifische Immunpräzitation von FLAG.Sec24A wurden *Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG* mit anti-FLAG Antikörper oder einer Kontrolle (anti-Myc Antikörper) gekoppelt. FLAG.Sec24A wurde effizient präzipitiert. Das L-Hüllprotein konnte spezifisch mit FLAG.Sec24A kopräzipitiert werden und zeigt keine unspezifische Bindung an Myc-gekoppelte *Dynabeads*.

Um den Bereich des L-Hüllproteins, der für die Bindung an Sec24A verantwortlich ist, näher zu charakterisieren, wurde eine Immunpräzitation der drei HBV - Hüllproteine S, M und L sowie der L-Mutante Llle9.HA (vgl. Kapitel 5.1.5.5) durchgeführt. Hierzu wurden *Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG* mit dem S-spezifischen Antikörper K38 gekoppelt. Ein HA-

spezifischer Western-Blot zeigt eine effiziente Präzipitation der Hüllproteine. FLAG.Sec24A konnte mit den drei Hüllproteinen sowie der Lille9.HA-Mutante kopräzipitiert werden (Abb. 5-20). Dies deutet darauf hin, dass der Bindungsbereich für Sec24A innerhalb der S-Region liegt. Der positive Interaktionstest des Preys Sec24A mit dem Bait SHA (Abb. 5-16) unterstützt dieses Ergebnis.

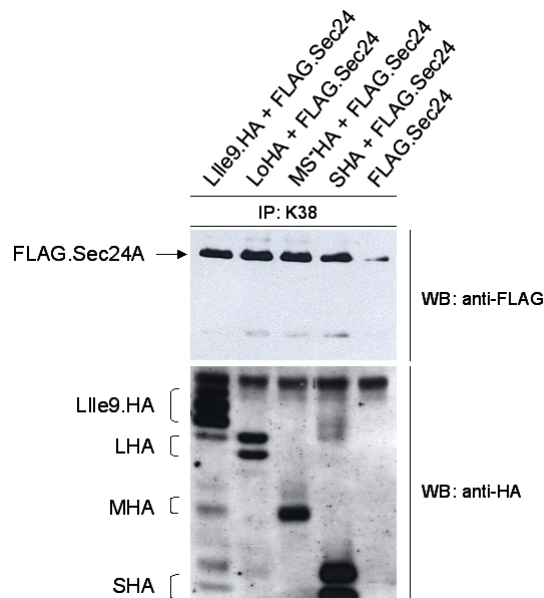


Abbildung 5-20: FLAG.Sec24A wird mit den drei HBV - Hüllproteinen kopräzipitiert. FLAG.Sec24A und die HBV - Hüllproteine S, M und L sowie die Mutante Lille9.HA wurden in HEK293-TT Zellen exprimiert. Die Hüllproteine wurden mit dem S-spezifischen Antikörper K38 unter Verwendung von *Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG* präzipitiert. FLAG.Sec24A konnte mit den drei Hüllproteinen und der Mutante Lille9.HA kopräzipitiert werden.

Die Erkennung von *Cargo* - Proteinen durch die Sec24 - Untereinheit des CoPII - Coats wird durch ER-Exportmotive vermittelt. Bislang sind drei unterschiedliche Sequenzmotive als ER-Exportmotiv identifiziert worden. Häufig findet man zwei aufeinander folgende saure Aminosäurereste der Sequenz E/D-X-E/D (E: Glutaminsäure, D: Asparaginsäure, X: beliebige Aminosäure). Auch zwei hydrophobe bzw. aromatische Aminosäurereste, wie z.B. FF, YY, FY, LL, IL, VV und LV (F: Phenylalanin, Y: Tyrosin, L: Leucin, I: Isoleucin, V: Valin) oder zwei basische Aminosäurereste der Sequenz R/K-(X)-R/K (R: Arginin, K: Lysin) wurden als ER-Exportmotiv beschrieben (Barlowe, 2003; Bonifacino und Glick, 2004). Für eine erfolgreiche Erkennung der ER-Exportmotive durch eine der Sec24 - Isoformen müssen sie eine zytosolische Orientierung aufweisen. Vermutlich werden mehrere Sequenzmotive für einen effizienten Export der *Cargo* - Proteine benötigt (Nufer *et al.*, 2003).

Die PräS-Region weist mehrere potentielle ER-Exportmotive auf, welche aufgrund der dualen Topologie des L-Proteins von der Sec24 - Untereinheit des CoPII-Coats erkannt werden

könnten. In der PräS1-Region sind dies die Sequenzmotive FF (AS 13, 14), DWD (AS 31-33), LL (AS 63, 64) und IL (AS 73, 74), in der PräS2-Region RVR (AS 16-18), LYF (AS 20-22) und VL (AS 35, 36). Die Motive in der PräS2-Region können allerdings nur vom großen und nicht vom mittleren Hüllprotein genutzt werden, da bei diesem die PräS2-Region rein luminal orientiert vorliegt. Des Weiteren hat das L-Protein bei zytosolischer Ausrichtung seiner PräS-Region theoretisch die Möglichkeit Sequenzmotive innerhalb der ersten Transmembrandomäne der S-Region zu nutzen. Diese liegt unter diesen Umständen nicht in die Membran integriert vor und weist aufgrund ihres hydrophoben Charakters gleich mehrere ER-Exportsignale auf. Die S-Region weist zwei in das Zytoplasma ragende Bereiche auf. Zwischen Transmembrandomäne I und II liegen die potentiellen ER-Exportmotive IL (AS 25, 26), FL (AS 41, 42) und RR (AS 78, 79), zwischen Transmembrandomäne III und IV das Motiv VI (AS 194, 195). Da die drei Hüllproteine den Bereich der S-Region gemeinsam aufweisen (vgl. Kapitel 1.1.2) und sich der Bindungsbereich für Sec24A im Bereich der S-Region befindet, liegt die Vermutung nahe, dass die drei Hüllproteine ein oder mehrere ER-Exportsignale der S-Region gemeinsam nutzen. Zusätzlich kann das L-Hüllprotein weitere ER-Exportsignale der PräS-Region für einen effizienten Einbau in CoPII - Vesikel nutzen.

5.1.6.6 Einfluss der Depletion von Sec24 auf die Freisetzung subviraler Partikel

Um zu ermitteln, ob die Interaktion von Sec24A mit den HBV - Hüllproteinen für das Virus relevant ist, wurde die Freisetzung subviraler Partikel nach Depletion der vier Sec24 Isoformen (A bis D) untersucht. Da sich die Isoformen in ihrer Funktion, der Erkennung von ER-Exportsignalen, kompensieren, wurden sie einzeln oder in Kombination mittels siRNA depletiert.

Humane Hepatoma HuH7-Zellen wurden mit Sec24-spezifischer oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit pMSV.SHA oder mit pHBV.C'. Die Freisetzung S- und L-haltiger subviraler Partikel wurde wie für Bet1 beschrieben (vgl. Kapitel 5.1.5.6) ermittelt. L-haltige subvirale Partikel zeigen eine deutliche Reduktion der Freisetzung nach Depletion von Sec24A alleine (34 %) oder in Kombination mit Sec24B (50 %), wohingegen S-haltige SVP nur eine geringe Reduktion auf 85 % bzw. 67 % zeigen (Abb. 5-21, A). Dies ist erstaunlich, da sowohl L als auch S mit Sec24A interagieren, wie die Ko-Immunpräzipitation von Sec24A mit diesen beiden Proteinen zeigt (Abb. 5-20). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die von Wendeler *et al.* (2007) beschriebene Spezifität der Isoform A für ER-Exportmotive des Typs LL sein. Nur die PräS-Region und damit das L-

Protein, nicht aber die S-Region weist dieses Sequenzmotiv auf. Die Isoformen C und D scheinen nur einen geringen Einfluss auf die Freisetzung sowohl L- als auch S-haltiger subviraler Partikel zu haben. Dies könnte in der hohen Redundanz der Sec24 Isoformen und ihrer geringen Spezifität einzelnen ER-Exportmotiven gegenüber begründet sein. Dadurch, dass die Funktion der depletierten Isoformen durch die noch verfügbaren übernommen wird, kann nur ein geringer Effekt beobachtet werden. Der CoPII-vermittelte Transport wurde durch die gemeinsame Depletion der vier Sec24 Isoformen zum Erliegen gebracht. Sowohl L-haltige als auch S-haltige SVP zeigen eine deutliche Reduktion der Freisetzung auf ca. 30 %. Dies spricht dafür, dass die Freisetzung L- und S-haltiger subviraler Partikel vom CoPII-vermittelten Transportweg abhängig ist.

Parallel hierzu wurde die Proteinexpression mittels Western-Blot überprüft. Erwartet wurde eine gleichbleibende Menge des S- und L-Hüllproteins, da eine Depletion der Sec24 Isoformen keinen Einfluss auf die Proteinexpression haben sollte. Beide Proteine konnten in der nicht- und einfach-glykosylierten Form mit einer gleichbleibenden Signalstärke detektiert werden (Abb. 5-21, B). Demnach werden sowohl die Proteinexpression als auch die N-Glykosylierung von S und L nicht durch die Depletion der Sec24 Isoformen beeinflusst. Die im ELISA ermittelte Reduktion der Freisetzung subviraler Partikel resultiert folglich aus einer geringeren Anzahl von SVP im Überstand bei einem gleichbleibenden zellulären Proteingehalt. Um zu überprüfen, ob der im ELISA beobachtete Effekt HBV-spezifisch ist, wurde das sekretorische Protein Hämopexin als Kontrolle eingesetzt. Nach Depletion der vier Sec24 Isoformen konnte ein Anstieg der zellulären Hämopexin - Konzentration beobachtet werden, was auf einen gestörten CoPII-vermittelten Transport zurück zu führen ist. Bei Depletion von Sec24A und B in Kombination zeigt sich eine leichte Reduktion des sekretierten Hämopexins. Entscheidend ist, dass nach alleiniger Depletion der Sec24A Isoform keine Reduktion in der Signalstärke zu beobachten ist. Dies spricht dafür, dass die für L-haltige Partikel beobachtete Reduktion der Freisetzung subviraler Partikel auf 34 % HBV-spezifisch ist.

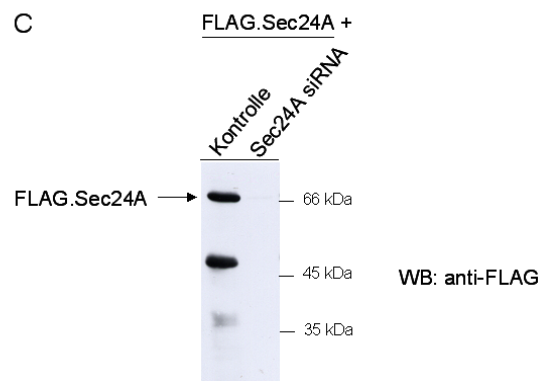
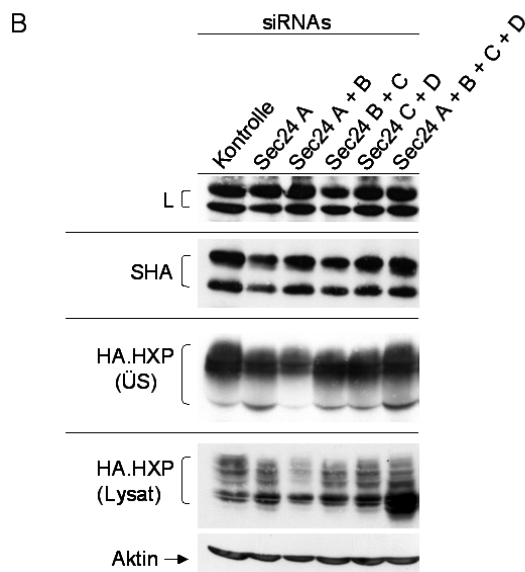
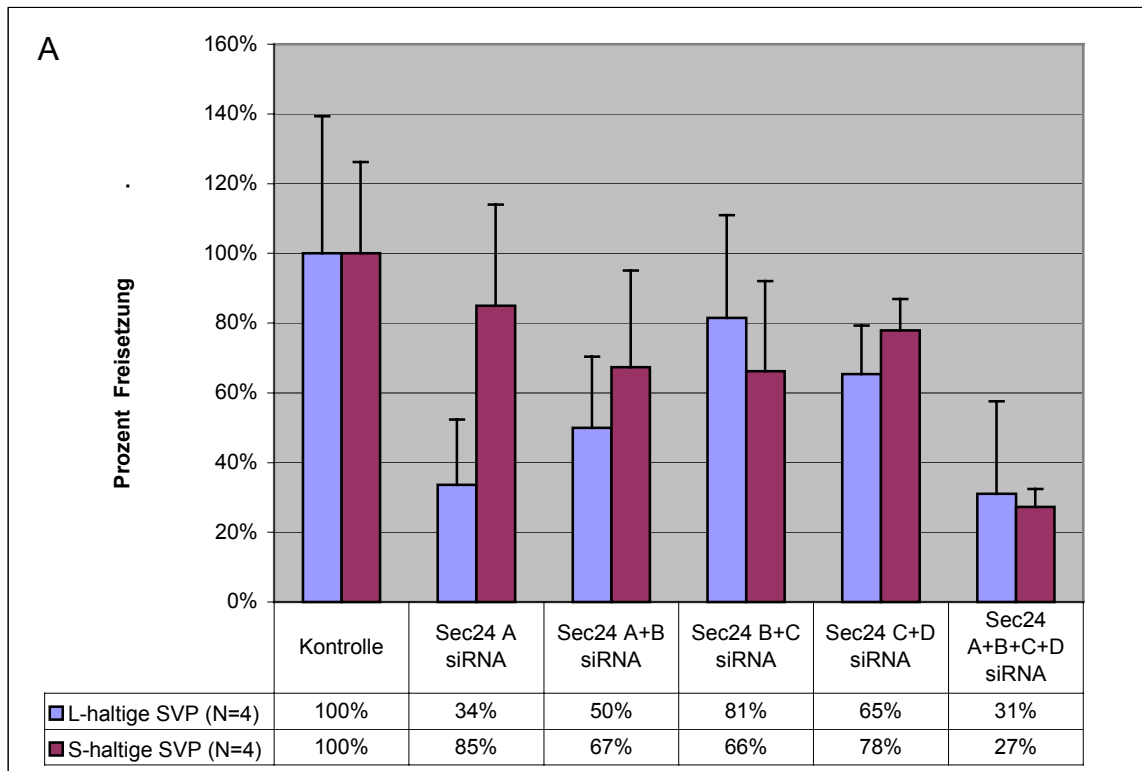


Abbildung 5-21: Einfluss der Depletion von Sec24 auf die Freisetzung subviraler Partikel. HuH7-Zellen wurden mit siRNA gegen die vier Sec24 Isoformen transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit pMSV.SHA oder pHBV.C'. Nach 72 h Proteinexpression wurden die Zellen aufgearbeitet und ein HBsAg-ELISA oder PräS1-ELISA (A) bzw. ein Nachweis der Proteinexpression mittels Western-Blot (B) durchgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf unterschiedlichen Gelen (Markierungsstriche). (A) Nach Depletion von Sec24A wird die Freisetzung L-haltiger SVP auf 34 % reduziert. Die Depletion der vier Sec24 Isoformen führt zu einer Reduktion der Freisetzung sowohl L- als auch S-haltiger Partikel auf ca. 30 %. (B) Die Expression des großen L- und kleinen S-Hüllproteins wird durch die Depletion von Sec24 nicht beeinflusst. Das sekretorische Protein Hämopexin wurde als Kontrolle eingesetzt. Endogenes Aktin dient als Ladekontrolle. (C) HuH7-Zellen wurden mit Kontroll- oder Sec24A-spezifischer siRNA und nach 24 h mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A transfiziert. Die Expression von FLAG.Sec24 wird effizient durch die Sec24A-spezifische siRNA inhibiert.

Die Depletion der Sec24 Isoformen konnte nicht überprüft werden, da kein Antikörper gegen die endogenen Proteine erhältlich ist. Die Effektivität der Sec24A-spezifischen siRNA wurde daher unter Verwendung von FLAG.Sec24A getestet (Abb. 5-21, C). Als Zielsequenz weist die eingesetzte siRNA den Bereich von Nukleotid 130-148 der Sec24A-kodierenden mRNA auf und sollte demnach auch das C-terminal verkürzte Abbauprodukt depletieren. Hierzu wurden HuH7-Zellen mit Kontroll- oder Sec24A-spezifischer siRNA und nach 24 h mit p3xFLAG-CMV-10.Sec24A transfiziert. In einem FLAG-spezifischen Western-Blot konnte nur in der Kontrollspur ein Signal von FLAG.Sec24A bei ca. 69 kDa neben einer Abbaubande bei ca. 48 kDa detektiert werden. In dem mit Sec24A-spezifischer siRNA behandelten Ansatz konnte kein Signal im Western-Blot detektiert werden, was für eine effiziente Depletion von Sec24A durch die eingesetzte siRNA spricht.

Zusammenfassend konnte das im Hefesystem als neuer Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifizierte Sec24A auch im humanen Zellkultursystem bestätigt werden. Die Interaktion scheint allerdings nicht L-spezifisch zu sein, da FLAG.Sec24A ebenso mit dem mittleren und kleinen Hüllprotein kopräzipitiert werden konnte. In der PräS- und S-Region wurden mehrere potentielle ER-Exportsignale detektiert, welche die Interaktion mit Sec24A vermitteln könnten. Obwohl sowohl S als auch L mit Sec24A interagieren, zeigten sich Unterschiede in der Freisetzung subviraler Partikel. Interessanterweise inhibierte die Depletion des endogenen Sec24A die Freisetzung L-haltiger Partikel deutlich, wohingegen die Freisetzung S-haltiger Partikel fast unbeeinflusst blieb. Die Sec24 Isoformen C und D hatten nur einen geringen Effekt auf L- und S-haltige SVP, was in ihrer hohen Redundanz begründet sein könnte. Nach Inhibition des CoPII-vermittelten Transportweges durch kombinierte Depletion der vier Sec24 Isoformen wurde die Freisetzung sowohl L- als auch S-haltiger SVP fast vollständig blockiert, was die Bedeutung dieses Transportweges für das Hepatitis B - Virus unterstreicht.

5.2 Einfluss des ER-luminalen Chaperons BiP auf die duale Topologie des HBV L-Hüllproteins

Neben der Suche nach neuen zellulären Interaktionspartnern des HBV L-Hüllproteins stand in dieser Arbeit die Charakterisierung der bereits bekannten Interaktion des L-Hüllproteins mit dem ER-luminalen Chaperon BiP (Lambert und Prange, 2003; Cho *et al.*, 2003) im Vordergrund. Die zentrale Frage war, ob BiP, auch Grp78 (*glucose-regulated protein 78 kDa*)

genannt, am Prozess der partiellen posttranslationalen Translokation der PräS-Region (vgl. Kapitel 1.1.2) beteiligt ist. Hierzu wurde der BiP ATPase - Zyklus und damit die Substratbindende Kapazität von BiP durch Überexpression seiner Ko-Chaperone ERdj4 und BAP manipuliert. ERdj4, ein Mitglied der Hsp40-Proteinfamilie, stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP, was zur Ausbildung eines stabilen BiP - Substrat - Komplexes führt (Shen *et al.*, 2002). Der Nukleotid - Austauschfaktor BAP hingegen bewirkt die Ablösung von ADP und Neubindung von ATP an BiP (Chung *et al.*, 2002), was zur Freisetzung des Substrates führt (vgl. Kapitel 1.3).

5.2.1 Herstellung bicistronischer Vektoren

Um einen Effekt der ektopischen Expression bzw. der Manipulation von BiP auf die posttranslationale Translokation der PräS-Region beobachten zu können, musste gewährleistet sein, dass die (Ko-) Chaperone in jeder L-exprimierenden Zelle vorliegen. Hierzu wurden bicistronische Vektoren hergestellt, bei denen die Sequenz des C-terminal HA-markierten L-Proteins unter Kontrolle des humanen Metallothionein-IIa-Promotors in den Expressionsvektor p3xFLAG-CMV-14 eingebracht wurde. Dieser enthielt bereits die FLAG-markierten (Ko-) Chaperone unter Kontrolle des CMV-Promotors, so dass Expressionsvektoren mit zwei Transkriptionseinheiten entstanden.

Murines ERdj4 weist 91 % Homologie zum humanen ERdj4 auf. Es wurde unter Verwendung des Primerpaares ERdj4 5'/ 3'-Primer ausgehend von dem Plasmid 3HA.DSL.ERdj4 (Shen *et al.*, 2002) in den Vektor p3xFLAG-CMV-14 kloniert. Hierdurch erhielt ERdj4 C-terminal eine dreifache FLAG-Markierung. Das theoretische Molekulargewicht von ERdj4.FLAG wurde von *ExpASy Peptide Mass* mit 28,6 kDa bestimmt.

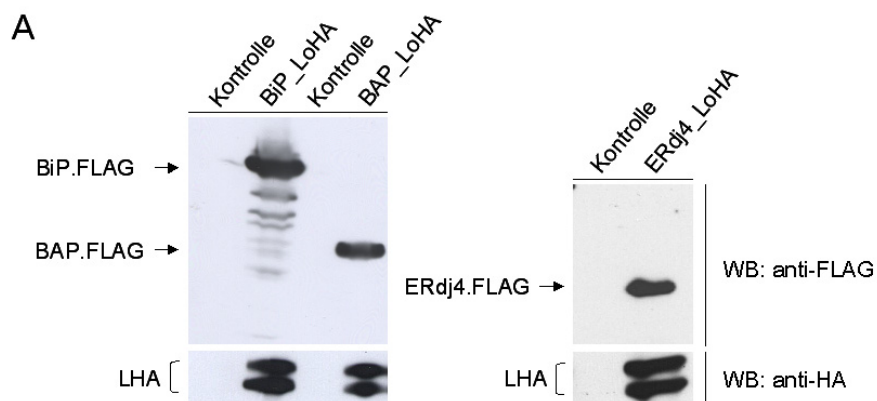
Humanes BAP wurde mit Hilfe des Primerpaares BAP_fw_NotI/ BAP 3'-Primer ausgehend von dem Plasmid pDSL-BAP (Chung *et al.*, 2002) amplifiziert. Mit 489 AS weist BAP.FLAG ein theoretisches Molekulargewicht von 55,4 kDa auf.

Humanes BiP wurde ausgehend von dem cDNA-Klon pOTB7.BiP (*Accession Number* BC020235; RZPD) unter Verwendung des Primerpaares BiP 5'/ 3'-Primer in den Vektor p3xFLAG-CMV-14 kloniert. Das theoretische Molekulargewicht von C-terminal dreifach FLAG-markiertem BiP (BiP.FLAG) wurde mit 75,4 kDa bestimmt, wobei posttranslationale Modifikationen nicht berücksichtigt sind.

Die Expressionsvektoren p3xFLAG-CMV-14.ERdj4 und p3xFLAG-CMV-14.BiP wurden mit *HpaI*, p3xFLAG-CMV-14.BAP mit *NotI* und *BglII* restringiert. Der L-kodierende Expressionsvektor pNI2.LoHA wurde mit *HpaI* und *ScaI* restringiert. Anschließend wurde der L-kodierende Bereich mit dem humanen Metallothionein-IIa-Promotor in den FLAG-Hintergrund eingebracht. Dies geschah für BAP über mehrere Zwischenstufen. Hierdurch entstanden Vektoren, die die gleichzeitige Expression von HA-markiertem L und FLAG-markierten (Ko-) Chaperonen innerhalb einer Zelle ermöglichen.

5.2.2 Nachweis der Expression der (Ko-) Chaperone BiP, BAP und ERdj4

Zunächst wurde die Expression der (Ko-) Chaperone bei gleichzeitiger Expression des L-Hüllproteins überprüft. Hierzu wurden HEK293-TT Zellen mit den bicistronischen Vektoren transfiziert und nach 48 h Proteinexpression in NP-40 Lysepuffer aufgearbeitet. Ein FLAG-spezifischer Western-Blot zeigt deutliche Signale von BiP.FLAG (80 kDa), BAP.FLAG (56 kDa) und ERdj4.FLAG (29 kDa), wobei Abbaubanden von BiP.FLAG beobachtet werden konnten. Das L-Hüllprotein konnte für alle drei bicistronischen Vektoren in der erwarteten Doppelbande der nicht-glykosylierten (39 kDa) und einfach-glykosylierten Form (42 kDa) mit einem HA-spezifischen Western-Blot detektiert werden (Abb. 5-22, A).



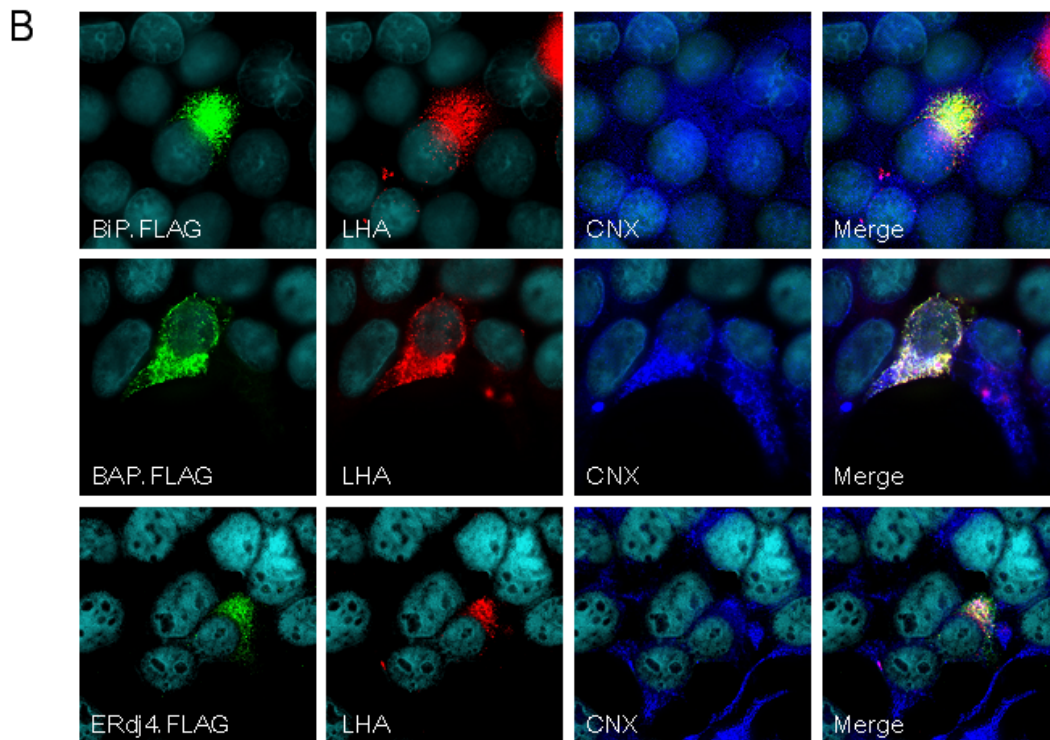


Abbildung 5-22: Kontrolle der Expression und subzellulären Lokalisation der bicistronischen Expressionskonstrukte. (A) HEK293-TT Zellen wurden mit den bicistronischen Vektoren oder leerem Vektor transfiziert. Die Expression der FLAG-markierten (Ko-) Chaperone wurde mit einem FLAG-spezifischen Western-Blot bestätigt. Ein HA-spezifischer Western-Blot bestätigte die gleichzeitige Expression des L-Hüllproteins bei Expression von BiP.FLAG, BAP.FLAG und ERdj4.FLAG. (B) HEK293-TT Zellen wurden mit den bicistronischen Vektoren transfiziert und nach 24 h fixiert. Die Markierung der (Ko-) Chaperone (grün) erfolgte mit einem anti-FLAG Antikörper, die von L (rot) mit einem anti-HA Antikörper und die des ER-Markers Calnexin (blau) mit einem anti-Calnexin Antikörper. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Alexa Fluor-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop betrachtet und anschließend mit Hilfe der AxioVision Software dekonvolviert.

Zur Kontrolle der subzellulären Lokalisation der FLAG-markierten (Ko-) Chaperone wurden HEK293-TT Zellen mit den bicistronischen Vektoren transfiziert. Das L-Hüllprotein sowie die drei (Ko-) Chaperone zeigen eine perinukleäre Verteilung und koloalisieren mit dem ER-Marker Calnexin (Abb. 5-22, B). Dies bedeutet, dass die korrekte intrazelluläre Lokalisation der (Ko-) Chaperone nicht durch die FLAG-Markierung beeinträchtigt wird.

5.2.3 Kontrolle der endogenen BiP - Konzentration

Es wurde vereinzelt beobachtet, dass die ektopische Expression des L-Proteins durch eine Aktivierung des BiP - Promotors zu ER - Stress führt (Xu *et al.*, 1997; Chua *et al.*, 2005). Deshalb wurde die endogene BiP - Konzentration nach Transfektion von pNI2.LoHA bzw. den bicistronischen Vektoren von BAP und ERdj4 überprüft. HEK293-TT Zellen wurden nach 72 h Proteinexpression in NP-40 Lysepuffer aufgearbeitet. Eine gleichmäßige

Expression von BiP konnte in Kontroll-transfizierten Zellen sowie in den mit pNI2.LoHA oder den bicistronischen Vektoren transfizierten Zellen durch einen BiP-spezifischen (anti-Grp78) Western-Blot detektiert werden (Abb. 5-23, A). Dies spricht dafür, dass weder die ektopische Expression des L-Proteins noch die der Ko-Chaperone die endogene BiP - Konzentration beeinflusst und somit ER - Stress verursacht.

Die Expression von BiP wird strikt auf Ebene der Translation reguliert, um eine gleichbleibende zelluläre Konzentration an BiP zu gewährleisten. In Zeiten von ER-Stress wird die Translationseffizienz der BiP - Transkripte erhöht, wodurch die Menge an BiP ansteigt (Gülow *et al.*, 2002). Deshalb wurde überprüft, ob unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Überexpression von BiP.FLAG überhaupt möglich ist, oder ob dessen ektopische Expression die endogene BiP - Konzentration negativ beeinflusst. Hierzu wurden HEK293-TT Zellen mit p3xFLAG-CMV-14.BiP oder dem bicistronischen BiP - Konstrukt transfiziert. BiP wurde durch einen Grp78-spezifischen Western-Blot nachgewiesen. Eine effiziente Expression von BiP.FLAG konnte für beide Konstrukte beobachtet werden, ohne dass die endogene BiP - Konzentration beeinflusst wird, wie ein Vergleich mit Kontroll-transfizierten Zellen zeigt (Abb. 5-23, B).

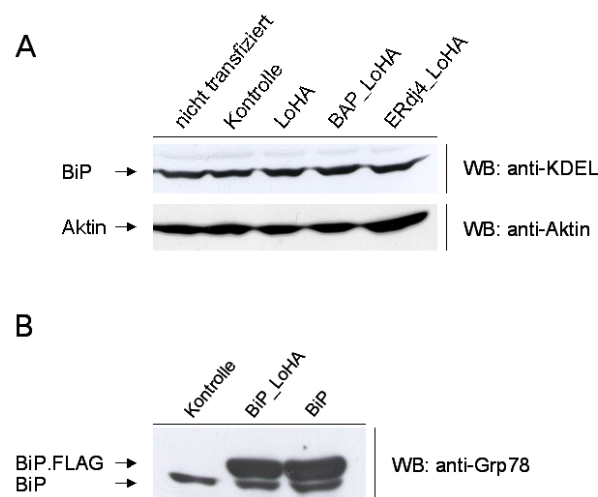


Abbildung 5-23: Die ektopische Expression von L oder BiP beeinflusst die endogene BiP - Konzentration nicht. (A) HEK293-TT Zellen wurden mit pNI2.LoHA oder den bicistronischen Vektoren von BAP und ERdj4 transfiziert. Ein BiP-spezifischer Western-Blot (anti-Grp78) zeigt eine gleichmäßige Signalstärke von BiP in den Kontroll - Ansätzen sowie in den mit L transfizierten Proben. Ein Western-Blot gegen endogenes Aktin dient als Ladekontrolle. (B) HEK293-TT Zellen wurden mit p3xFLAG-CMV-14.BiP oder dem bicistronischen Konstrukt von BiP transfiziert und ein BiP-spezifischer Western-Blot (anti-Grp78) durchgeführt. Die Expression von BiP.FLAG alleine oder in Kombination mit LHA hat keinen Einfluss auf die endogene BiP - Konzentration.

5.2.4 Die ektopische Expression von BAP destabilisiert die Bindung von L und BiP

Durch die ektopische Expression seiner Ko-Chaperone BAP und ERdj4 sollte BiP in seiner Substrat-bindenden Aktivität manipuliert werden. Um dies experimentell zu bestätigen, wurde endogenes BiP präzipitiert und ermittelt, ob die Bindung von L an BiP durch die Überexpression von FLAG-markiertem BiP, BAP oder ERdj4 beeinflusst wird.

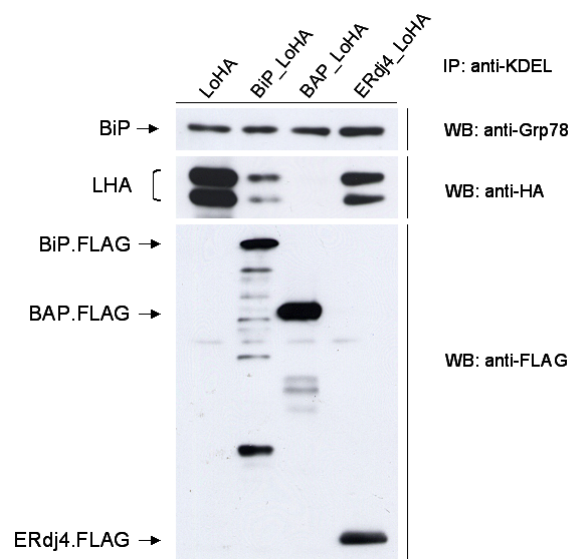


Abbildung 5-24: Die ektopische Expression von BAP destabilisiert die Bindung von L und BiP. HEK293-TT Zellen wurden transient mit pNI2.LoHA bzw. den bicistronischen Vektoren transfiziert und in NP-40 Lysepuffer aufgearbeitet. Endogenes BiP wurde mit anti-KDEL-gekoppelten Tosyl - aktivierten *Dynabeads* präzipitiert und mit einem BiP-spezifischen Western-Blot (anti-Grp78) nachgewiesen. Ein HA-spezifischer Western-Blot zeigt eine Kopräzipitation von L mit BiP, wobei die Signalstärke von L bei ektopischer Expression von BiP.FLAG leicht und BAP.FLAG deutlich reduziert ist. Ein FLAG-spezifischer Western-Blot zeigt die mit endogenem BiP kopräzipitierten FLAG-markierten (Ko-) Chaperone BiP, BAP und ERdj4.

Lysat der mit pNI2.LoHA oder den bicistronischen Vektoren transfizierten HEK293-TT Zellen wurde mit anti-KDEL gekoppelten Tosyl - aktivierten *Dynabeads* inkubiert. Ein BiP-spezifischer Western-Blot (anti-Grp78) bestätigte die effektive und gleichmäßige Präzipitation von endogenem BiP. Anschließend wurde mit einem HA-spezifischen Western-Blot untersucht, ob das L-Hüllprotein mit BiP kopräzipitiert werden kann und welchen Einfluss die ektopische Expression der FLAG-markierten (Ko-) Chaperone diesbezüglich hat. L wird effektiv mit BiP kopräzipitiert, wobei das Signal von L bei ektopischer Expression von BiP.FLAG leicht reduziert ist (Abb. 5-24). Während ERdj4.FLAG, welches die Bindung des BiP - Substrat - Komplexes stabilisiert, keinen Einfluss auf die Kopräzipitation von L mit BiP

hat, führt die ektopische Expression des Nukleotid - Austauschfaktors BAP.FLAG zu einer drastischen Abnahme des kopräzipitierten L-Hüllproteins. Erst bei längerer Exposition des Films konnte eine schwache Doppelbande detektiert werden (Abb. 5-24). Eine Manipulation der Substrat-bindenden Aktivität von BiP scheint demnach durch ektopische Expression seiner Ko-Chaperone BAP und ERdj4 möglich. Abschließend konnte mit einem FLAG-spezifischen Westernblot die Kopräzipitation der Ko-Chaperone mit endogenem BiP gezeigt werden, was unterstreicht, dass die FLAG-Markierung keinen Einfluss auf deren physiologische Funktion hat.

5.2.5 Einfluss der Ko-Chaperone BAP und ERdj4 auf die duale Topologie des L-Proteins

Um zu überprüfen, ob die Manipulation der Substrat-bindenden Aktivität von BiP einen Einfluss auf die duale Topologie des L-Proteins hat, wurden Proteaseschutz - Versuche durchgeführt. Nach der kotranslationalen Integration von L in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums verbleibt die PräS-Region initial auf der zytosolischen Seite. Erst im Verlauf des Reifungsprozesses findet eine partielle posttranslationale Translokation der PräS-Region in das ER-Lumen statt (vgl. Kapitel 1.1.2). Die PräS-Region weist mehrere Schnittstellen der Protease Trypsin auf. Liegt sie auf der zytosolischen Seite der Membran vor, führt die Zugabe von Trypsin zu einer Degradation der PräS-Region, liegt sie auf der ER-luminalen Seite vor, ist sie vor proteolytischer Spaltung geschützt. *Pulse-Chase* Versuche mit radioaktiv-markiertem Schwefel (Prange und Streeck, 1995; Lambert und Prange, 2001) oder der induzierbaren Zelllinie EcR-LHA-293 (Lambert und Prange, 2004; vgl. Kapitel 5.2.6) konnten zeigen, dass die PräS-Region zunächst sensitiv, mit zunehmender Reifung des L-Proteins aber resistent gegen proteolytische Spaltung ist. In der Wildtyp - Situation weist ungefähr die Hälfte der L-Proteine eine PräS-Region mit zytosolischer Ausrichtung auf, während die andere Hälfte eine PräS-Region mit ER-luminaler Ausrichtung aufweist.

Mikrosomen transfizierter HEK293-TT Zellen wurden präpariert und entweder nicht behandelt (Ansatz 1), mit Trypsin behandelt (Ansatz 2) oder mit Trypsin in Anwesenheit von NP-40 behandelt (Ansatz 3). Bei alleiniger Expression liegt LHA nach Trypsin - Behandlung zu ca. 50 % geschützt vor (Abb. 5-25, Spur 2). Bei gleichzeitiger Behandlung mit Trypsin und NP-40 wird die mikrosomale Membran zerstört, so dass die Protease Trypsin ungehinderten Zugriff auf das L-Protein hat. Ein Signal von L konnte wie erwartet nicht beobachtet werden.

Die ektopische Expression von BiP.FLAG hat keinen Einfluss auf die posttranslationale Translokation der PräS-Region, wie ein gleichbleibender prozentualer Anteil geschützter L-Proteine zeigt (Abb. 5-25, Spur 5). Interessanterweise führte die ektopische Expression von BAP.FLAG oder ERdj4.FLAG zu einer deutlichen Reduktion des Schutzes auf 22 % bzw. 24 %.

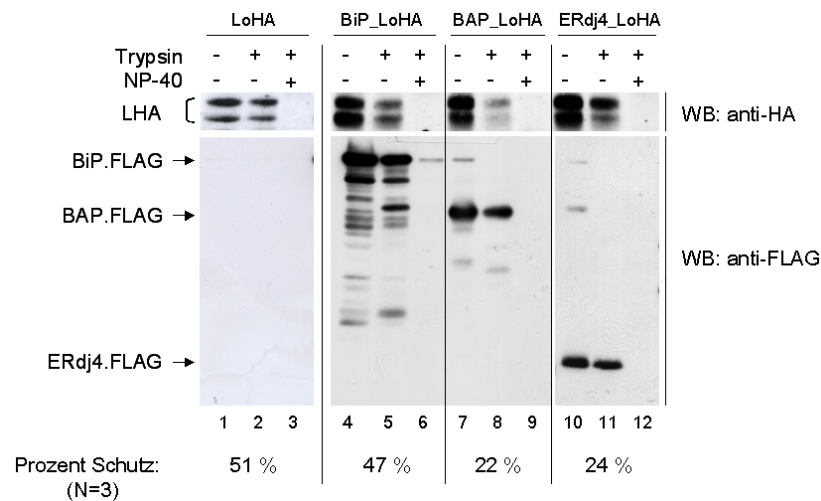


Abbildung 5-25: Die ektopische Expression von BAP oder ERdj4 inhibiert die posttranslationale Translokation der PräS-Region. Mikrosomen transfizierter HEK293-TT Zellen, welche entweder HA-markiertes L alleine (Spur 1-3) oder in Kombination mit BiP.FLAG (Spur 4-6), BAP.FLAG (Spur 7-9) oder ERdj4.FLAG (Spur 10-12) exprimierten, wurden präpariert und Proteaseschutz - Versuche durchgeführt. Hierzu wurden Mikrosomen entweder unbehandelt belassen oder mit Trypsin in An-/ Abwesenheit von NP-40 behandelt. Die Expression von L wurde mit einem HA-spezifischen Western-Blot, die der (Ko-) Chaperone mit einem FLAG-spezifischen Western-Blot detektiert.

Dies bedeutet, dass nach Manipulation der Substrat-bindenden Aktivität von BiP nur noch die Hälfte der PräS-Regionen im Vergleich zur Wildtyp - Situation in das ER transloziert werden, unabhängig davon, ob der BiP - Substrat - Komplex gestärkt (ERdj4) oder geschwächt (BAP) wird. Die (Ko-) Chaperone wurden mit einem FLAG-spezifischen Western-Blot nachgewiesen. Da sie eine ER-luminale Lokalisation aufweisen, wurden sie als Marker für die Integrität der mikrosomalen Membran verwendet. Auch nach Behandlung mit der Protease Trypsin konnten sie erfolgreich detektiert werden (Abb. 5-25, Spur 5, 8, 11), was die Stabilität der Mikrosomen bestätigt.

5.2.6 Einfluss der Depletion zellulären ATPs auf die duale Topologie des HBV L-Hüllproteins

Da der ATPase - Zyklus die Grundlage der molekularen Funktion von Chaperonen bildet, wurde nachfolgend untersucht, ob die Depletion zellulären ATPs einen Einfluss auf die duale

Topologie des L-Hüllproteins hat. Dies würde darauf hinweisen, dass Chaperone, wie das zytosolisch vorliegende Hsc70 oder das ER-luminale BiP, entscheidend an der posttranslationalen Translokation der PräS-Region beteiligt sind.

Die Zelllinie EcR-LHA-293 exprimiert das L-Hüllprotein stabil unter Kontrolle des induzierbaren Ecdyson - Promotors (Lambert und Prange, 2004). Dies ermöglicht ein gezieltes Anschalten der L-Synthese durch Zugabe eines geeigneten Induktors. Auch können einzelne L-Populationen in sog. *Pulse-Chase* Versuchen verfolgt werden, indem die L-Synthese initial induziert und anschließend der Induktor ausgewaschen wird, so dass es zu keiner Neusynthese des L-Proteins kommen kann.

Die Synthese der L-Expression wurde durch Zugabe von 8 μ M Ponasteron A induziert. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde der Induktor ausgewaschen. In Ansatz eins wurden die Zellen direkt aufgearbeitet, Mikrosomen präpariert und ein Proteaseschutz - Versuch durchgeführt. In Ansatz zwei folgten auf den Mediumwechsel weitere 15 h (*Chase*) Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂, bevor Mikrosomen präpariert und ein Proteaseschutz - Versuch durchgeführt wurde. In Ansatz drei wurde der zelluläre ATP - Spiegel durch Zugabe von 5 mM Na-Azid und 5 mM Deoxy-D-Glucose zum *Chase* - Medium depletiert. Nach 15 h Inkubation wurden Mikrosomen präpariert und ein Proteaseschutz - Versuch durchgeführt. Die Integrität der Mikrosomen wurde durch einen Western-Blot gegen die endogene, ER-luminale Protein - Disulfid - Isomerase (PDI) bestätigt. Für die Messung der zellulären ATP - Konzentration wurden EcR-LHA-293 Zellen parallel im 6-Well Format ausgesät und wie unter Punkt 4.3.6 beschrieben aufgearbeitet.

Beim Einsatz von Mikrosomen, die direkt nach Induktion der L-Expression aufgearbeitet wurden, konnte im Proteaseschutz - Versuch nach Trypsin - Behandlung kein Signal von L detektiert werden (Abb. 5-26, Spur 2). Dies resultiert aus der ursprünglich rein zytosolischen Ausrichtung der PräS-Domäne. Nach einer *Chase* - Periode von 15 h konnte hingegen ein Signal von L auch nach Trypsin - Behandlung detektiert werden (Abb. 5-26, Spur 5). Eine Quantifizierung mit der Kodak 1D Image Analysis Software ermittelte einen Schutz von ca. 51 % verglichen mit der nicht Trypsin-behandelten Spur. Nach Zugabe von Natrium-Azid und Deoxy-D-Glucose zum *Chase* - Medium wurde die zelluläre ATP - Konzentration auf ca. 40 % reduziert. Unter diesen Bedingungen ist die posttranslationale Translokation der PräS-Region inhibiert, wie ein sehr schwaches L-Signal nach Trypsin - Behandlung zeigt (Abb. 5-26, Spur 8). Eine Quantifizierung ermittelte einen Schutz von nur noch ca. 15 %. Die zelluläre ATP - Konzentration scheint demnach ein kritischer Parameter bei der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins zu sein.

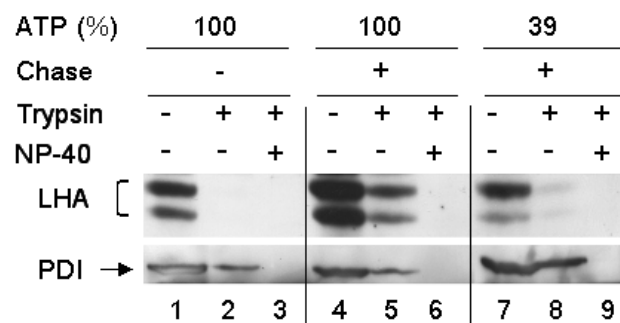


Abbildung 5-26: Depletion von ATP verhindert die posttranslationale Translokation der PräS-Region. EcR-LHA-293 Zellen wurden mit Ponasteron A behandelt, um die Expression des L-Proteins zu induzieren. Mikrosomen wurden direkt (Spur 1-3) oder nach einem *Chase* von 15 h in der Abwesenheit (Spur 4-6) oder Anwesenheit (Spur 7-9) von ATP-depletierenden Substanzen präpariert. Proteaseschutz - Versuche wurden durchgeführt und die Integrität der Mikrosomen mit einem PDI-spezifischen Western-Blot bestätigt. Der zelluläre ATP - Spiegel wurde mit dem *ATP bioluminescence assay Kit HS II* bestimmt.

Zusammenfassend konnte eine Beteiligung des ER-luminalen Chaperons BiP an der posttranslationalen Translokation der PräS-Region gezeigt werden. Dies erfolgte durch die Manipulation der Substrat-bindenden Aktivität von BiP durch ektopische Expression seiner Ko-Chaperone BAP und ERdj4. Der Einsatz bicistronischer Vektoren gewährleistete dabei die gleichzeitige Expression der Ko-Chaperone in jeder L-exprimierenden Zelle. Interessanterweise inhibierte sowohl der Nukleotid - Austauschfaktor BAP als auch ERdj4, ein Chaperon der Hsp40-Proteinfamilie, die posttranslationale PräS - Translokation, obwohl ERdj4 die Ausbildung eines stabilen BiP - Substrat - Komplexes fördert und BAP den gegenteiligen Effekt hat. Ein funktioneller BiP ATPase - Zyklus, mit wiederholter Substratbindung und Substratfreisetzung scheint demnach für die Ausbildung der dualen Topologie essentiell zu sein. Dieser Befund wird weiter durch die Beobachtung gestärkt, dass eine Depletion des endogenen ATPs die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins ebenfalls inhibiert.

5.3 Einfluss der Translokation-assozierten Proteine Sec62 und Sec63 auf die posttranslationale Translokation des L-Hüllproteins

In der Hefe sind für den Prozess der posttranslationalen Translokation neben dem BiP - Homolog Kar2p auch Sec61p, Sec62p und Sec63p des heptameren Sec - Komplexes essentiell. Da die Manipulation der Substrat-bindenden Aktivität von BiP einen Einfluss auf die posttranslationale Translokation der PräS-Region bewirkt (vgl. Kapitel 5.2.5), wurde

nachfolgend untersucht, ob auch für humanes Sec62 und Sec63 eine Beteiligung an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins beobachtet werden kann.

5.3.1 Herstellung von Sec62 - und Sec63 - Expressionskonstrukten

Humanes Sec62 wurde ausgehend von dem cDNA Klon pCMV-Sport6.Sec62 (*Accession Number* BC012035, RZPD) unter Verwendung des Primerpaares Sec62_Myc_fw_BgIII/Sec62_Myc_rv_NotI in den Vektor pCMV-Myc kloniert. Hierdurch erhielt Sec62 N-terminal eine Myc-Markierung. Das theoretische Molekulargewicht von Myc.Sec62 beträgt 48,7 kDa. Humanes Sec63 wurde ausgehend von dem cDNA Klon pBluescriptR.Sec63 (*Accession Number* BC047221; imaGenes) mit dem Primerpaar Sec63_Myc_fw_BgIII/Sec63_Myc_rv_NotI in den Vektor pCMV-Myc kloniert. Hierdurch erhielt Sec63 N-terminal eine Myc-Markierung und weist ein theoretische Molekulargewicht von 90,8 kDa auf.

5.3.2 Nachweis der Expression von Myc.Sec62 und Myc.Sec63

Für den Nachweis der Expression von Myc.Sec62 und Myc.Sec63 wurden HuH7-Zellen transfiziert. In einem Myc-spezifischen Western-Blot konnte ein Signal bei ca. 50 kDa sowie eine Abbaubande für Myc.Sec62 detektiert werden. Für Myc.Sec63 konnte ein Signal bei ca. 90 kDa detektiert werden (Abb. 5-27, A). Beide Myc-markierten Proteine konnten demnach mit ihrem vorhergesagten Molekulargewicht nachgewiesen werden.

Die Effizienz der Depletion durch Sec62- bzw. Sec63-spezifische siRNAs wurde in HuH7- und HEK293-TT Zellen getestet. Ein Western-Blot gegen endogenes Sec62 bzw. Sec63 bestätigt deren erfolgreiche Depletion in beiden Zelllinien (Abb. 5-27, B).

Zur Bestätigung der korrekten subzellulären Lokalisation von Myc.Sec62 und Myc.Sec63 wurden immun-histochemische Analysen durchgeführt. Hierfür wurden HuH7-Zellen mit pCMV-Myc.Sec62 bzw. pCMV-Myc.Sec63 in Kombination mit pNI2.LoHA transfiziert und nach 48 h fixiert. Die Markierung von Sec62 und Sec63 erfolgte mittels anti-Myc Antikörper, die Markierung von LHA mit dem PräS1-spezifischen Antikörper K47. Myc.Sec62 und Myc.Sec63 zeigen eine netzartige Verteilung im Bereich des ERs mit besonders intensiver Färbung in Kernnähe. Sec62 und Sec63 scheinen demnach nicht durch die Myc-Markierung in ihrer subzellulären Lokalisation beeinflusst zu sein. Eine fast vollständige Kolo-kalisation

konnte mit dem L-Hüllprotein detektiert werden (Abb. 5-27, C), was eine mögliche Beteiligung von Sec62 und Sec63 bei der Posttranslokation der PräS-Region impliziert.

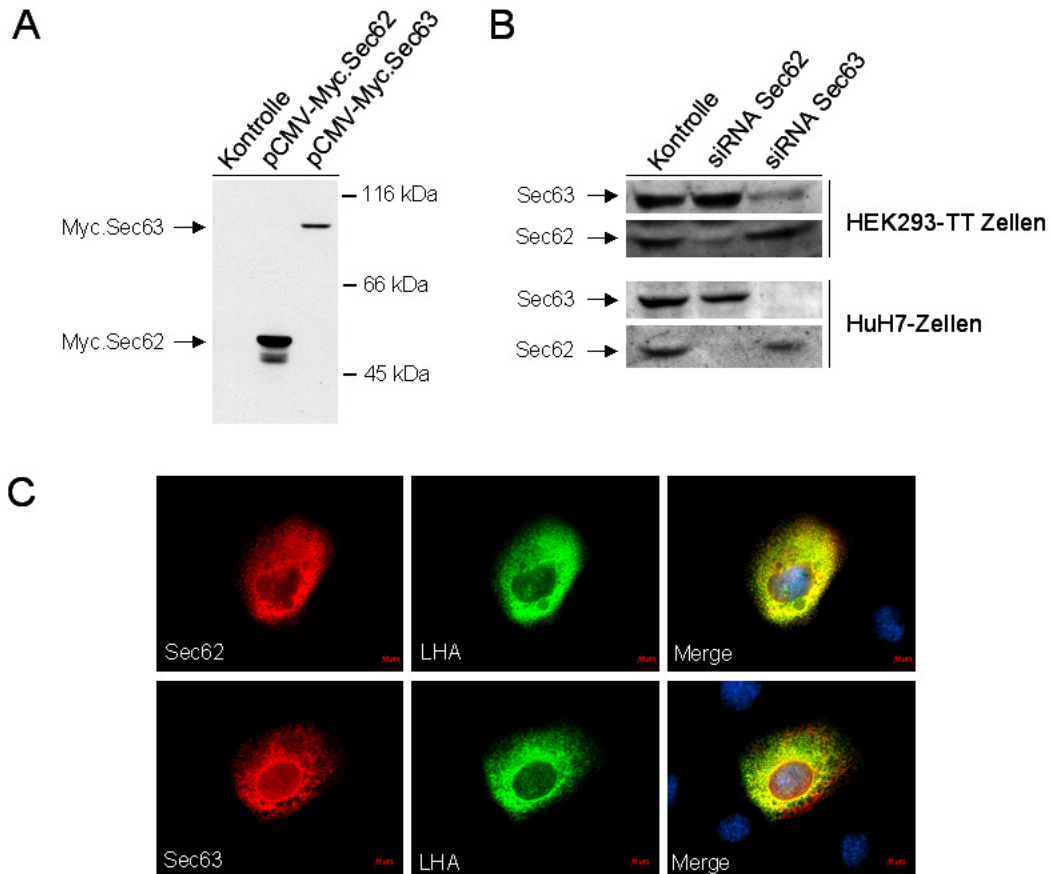


Abbildung 5-27: Nachweis der Expression von Myc.Sec62 und Myc.Sec63. (A) HuH7-Zellen wurden transient mit pCMV-Myc.Sec62 oder pCMV-Myc.Sec63 transfiziert. Mit einem Myc-spezifischen Western-Blot wurde Myc.Sec62 bei ca. 50 kDa und Myc.Sec63 bei ca. 90 kDa detektiert. (B) HuH7- und HEK293-TT Zellen wurden mit Sec62- oder Sec63-spezifischer siRNA transfiziert. Ein Western-Blot gegen endogenes Sec62 bzw. Sec63 bestätigt deren erfolgreiche Depletion. (C) HuH7-Zellen wurden mit pCMV-Myc.Sec62 bzw. pCMV-Myc.Sec63 in Kombination mit pNI2.LoHA transfiziert. Sec62 und Sec63 wurden mittels anti-Myc Antikörper (rot), LHA mit dem PräS1-spezifischen Antikörper K47 (grün) markiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Alexa Fluor-gekoppelten Sekundärantikörpern.

5.3.3 Einfluss von Sec62 und Sec63 auf die duale Topologie des L-Hüllproteins

Sec62 und Sec63 üben in der Hefe eine essentielle Funktion in der posttranslationalen Translokation von Proteinen über die ER-Membran aus. Nachfolgend wurde untersucht, ob die posttranslationale Translokation der PräS-Region durch die ektopische Expression von Myc.Sec62 bzw. Myc.Sec63 oder die siRNA-vermittelte Depletion von endogenem Sec62 bzw. Sec63 beeinflusst werden kann.

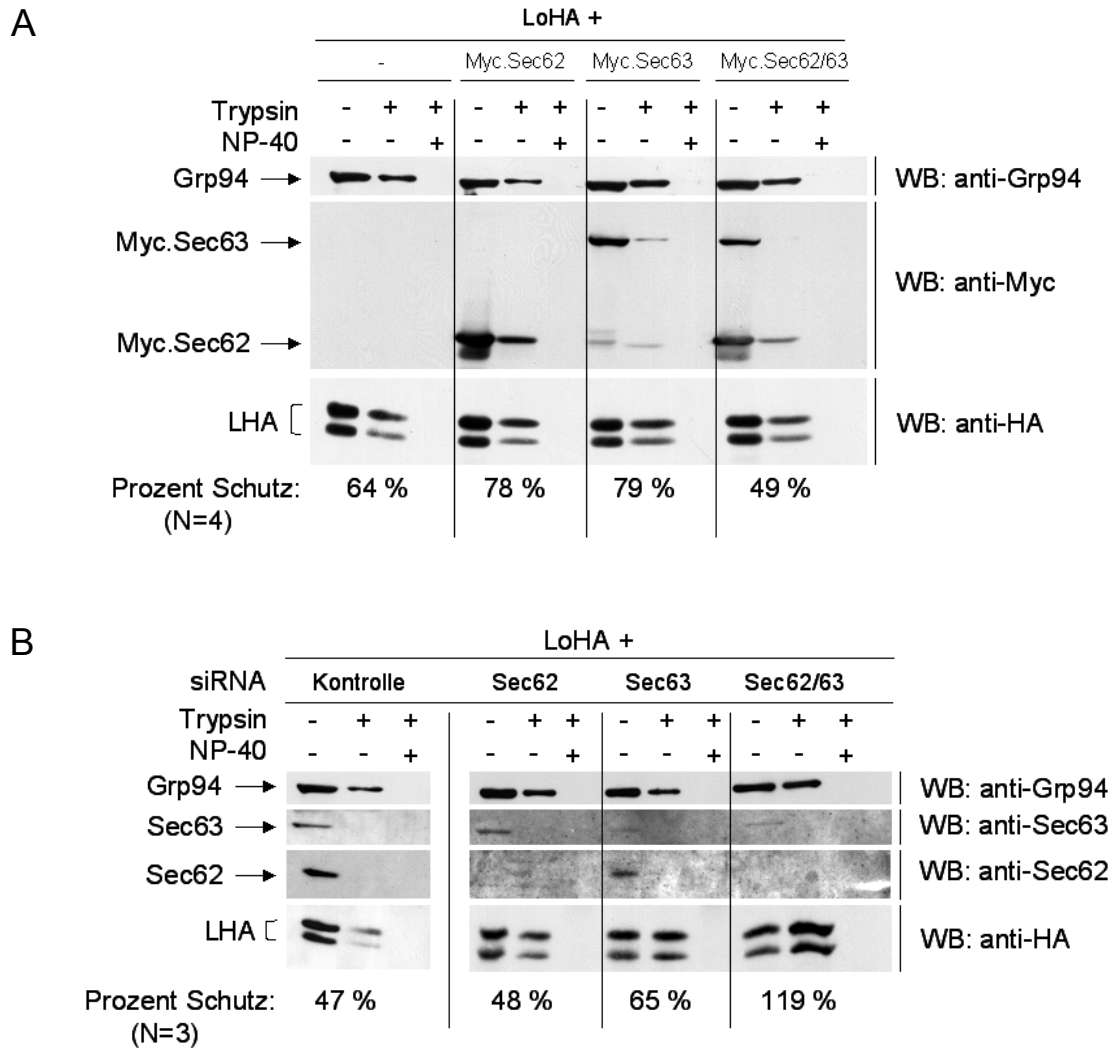


Abbildung 5-28: Einfluss von Sec62 und Sec63 auf die duale Topologie des L-Hüllproteins. Mikrosomen transfizierter HEK293-TT Zellen wurden präpariert und Proteaseschutz - Versuche durchgeführt. Die Integrität der mikrosomalen Membran wurde mit einem Western-Blot gegen das ER-luminale Protein Grp94 bestimmt. (A) Nach ektopischer Expression von Myc.Sec62 oder Myc.Sec63 konnte ein leichter Anstieg des Schutzes von L beobachtet werden. Die Expression beider Proteine in Kombination führte zu einer leichten Reduktion des Schutzes. (B) Die Depletion von Sec62 und Sec63 in Kombination führte zu einem deutlichen Anstieg des Schutzes von L auf 119 %. Die Depletion von Sec62 oder Sec63 alleine hatte keinen Effekt.

Hierzu wurden Mikrosomen transfizierter HEK293-TT Zellen präpariert und Proteaseschutz - Versuche durchgeführt. Die Mikrosomen wurden entweder nicht behandelt, mit Trypsin behandelt oder mit Trypsin in Anwesenheit von NP-40 inkubiert. Die Integrität der mikrosomalen Membran wurde mit einem Western-Blot gegen das ER-luminale Protein Grp94 bestimmt. Nach Überexpression von Myc.Sec62 bzw. Myc.Sec63 konnte ein leichter Anstieg des Schutzes der PräS-Region beobachtet werden, nach ektopischer Expression beider Proteine in Kombination eine leichte Reduktion (Abb. 5-28, A). Nach siRNA-vermittelter Depletion von Sec62 und Sec63 in Kombination konnte ein deutlicher Anstieg

des Schutzes der PräS-Region auf 119 % ermittelt werden. Dies bedeutet, dass die PräS-Region unter diesen Bedingungen vollständig geschützt im ER-Lumen vorliegt. Eine alleinige Depletion von Sec62 oder Sec63 hatte keine Auswirkung (Abb. 5-28, B).

5.3.4 Sec63 und Sec62 beeinflussen die Freisetzung subviraler Partikel

Nachfolgend wurde überprüft, ob die Translokon-assoziierten Komponenten Sec62 und Sec63 einen Einfluss auf die HBV - Morphogenese haben. Hierzu wurde die Freisetzung subviraler Partikel zum einen nach ektopischer Expression von Myc.Sec62 und Myc.Sec63, zum anderen nach Depletion von endogenem Sec62 und Sec63 ermittelt.

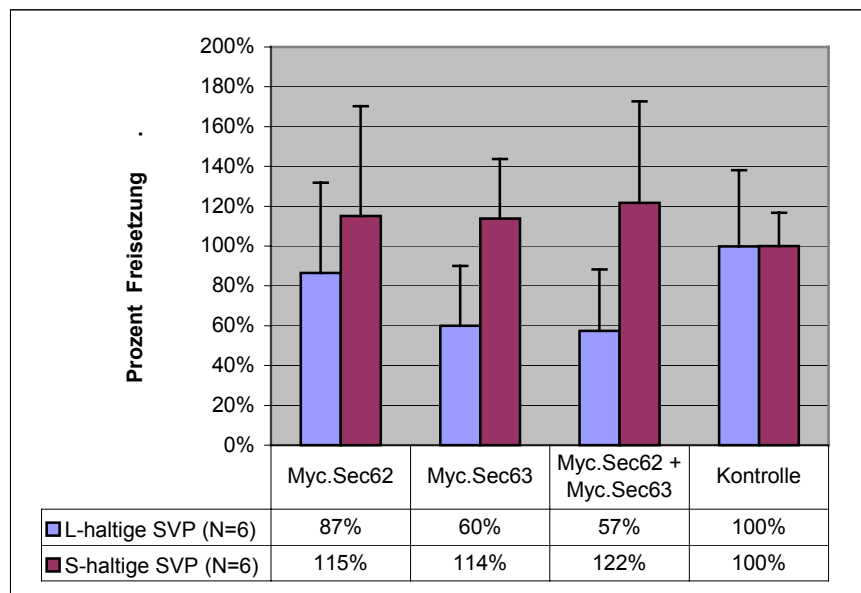


Abbildung 5-29: Die ektopische Expression von Myc.Sec63 reduziert die Freisetzung L-haltiger SVP. HuH7-Zellen wurden mit Myc.Sec62/ Sec63 zusammen mit pMSV.SHA oder pHBV.C⁻ transfiziert. Die Freisetzung S-haltiger Partikel wurde mit einem HBsAg - ELISA ermittelt, die der L-haltigen Partikel mit einem PräS1 - ELISA.

HuH7-Zellen wurden mit Myc.Sec62/ Sec63 zusammen mit pMSV.SHA oder pHBV.C⁻ transfiziert. Die Freisetzung S-haltiger subviraler Partikel, die einzig das S-Hüllprotein in ihre Lipidmembran integriert haben, wurde im HBsAg - ELISA ermittelt. Die Freisetzung L-haltiger SVP, die neben dem S- auch das M- und L-Hüllprotein aufweisen, wurde mit einem PräS1 - spezifischen ELISA gemessen. Eine deutliche Reduktion in der Freisetzung L-haltiger Partikel auf ca. 60 % konnte nach ektopischer Expression von Myc.Sec63 alleine oder in Kombination mit Myc.Sec62 beobachtet werden (Abb. 5-29). Im Gegensatz dazu erhöhte sich

die Freisetzung S-haltiger SVP nach ektoischer Expression von Myc.Sec62 oder Myc.Sec63 minimal.

Die ektoische Expression von Myc.Sec63 alleine oder in Kombination mit Myc.Sec62 resultierte in einer Reduktion der Signalstärke des S- und L-Hüllproteins im Western-Blot (Abb. 5-30, A und B). Das sekretorische Kontrollprotein Hämopexin zeigte ein ähnliches Expressionsmuster, wobei die Reduktion der Signalstärke gering ausfiel (Abb. 5-30, C). Möglicherweise hat die unphysiologisch hohe Proteinkonzentration von Myc.Sec63 einen leicht inhibitorischen Effekt auf die Sec61-vermittelte Translokation. Dies würde erklären, warum die an der ER-Membran synthetisierten viralen Hüllproteine sowie das sekretorische Protein Hämopexin nach ektoischer Expression von Myc.Sec63 einen Effekt zeigen, das an freien Ribosomen des Zytoplasmas synthetisierte Aktin hingegen unbeeinflusst bleibt.

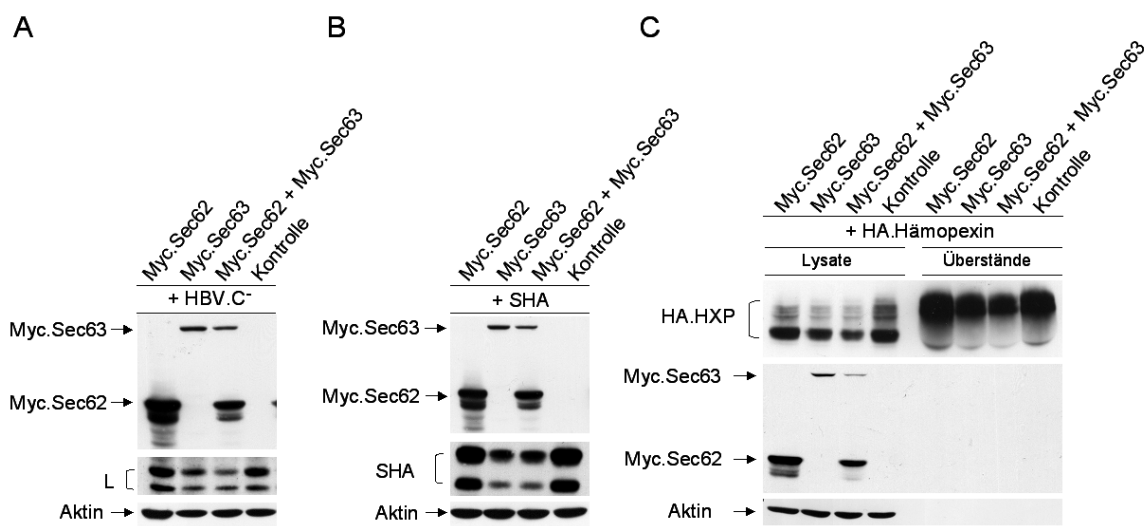


Abbildung 5-30: Auswirkung der ektoischen Expression von Myc.Sec62/ Sec63 auf die Expression von S und L. HuH7-Zellen wurden mit Myc.Sec62/ Sec63 zusammen mit pMSV.SHA bzw. pHBV.C⁻ transfiziert. Das S-Hüllprotein und das sekretorische Protein Hämopexin wurden mit einem HA-spezifischen Antikörper, das L-Hüllprotein mit dem Antikörper MA18/7 detektiert. Ein Western-Blot gegen endogenes Aktin dient als Ladekontrolle.

Nach siRNA-vermittelter Depletion des endogenen Sec62 wurde die Freisetzung sowohl S- als auch L-haltiger Partikel geringfügig reduziert. Ein deutlich größerer Effekt konnte nach Depletion des endogenen Sec63 beobachtet werden. Die alleinige Depletion von Sec63 reduzierte die Freisetzung L-haltiger Partikel bereits auf ca. 60 %. S-haltige Partikel zeigten hingegen erst nach kombinierter Depletion von Sec62 und Sec63 eine Reduktion der Freisetzung auf ca. 67 % (Abb. 5-31).

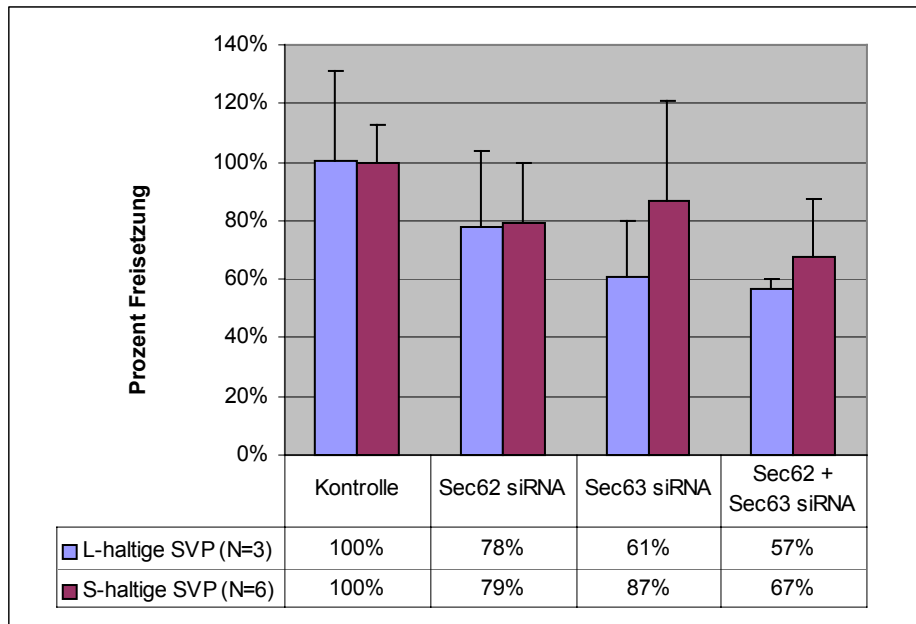


Abbildung 5-31: Die Depletion von Sec63 führt zu einer Reduktion der Freisetzung von L-Partikeln. HuH7-Zellen wurden mit siRNA gegen Sec62 oder Sec63 und nach 24 h mit pMSV.SHA bzw. pHBV.C transfiziert. Nach Depletion von Sec63 konnte eine deutliche Reduktion in der Freisetzung L-haltiger Partikel auf ca. 60 % beobachtet werden. Wurden Sec62 und Sec63 in Kombination depletiert, wurden auch die Freisetzung S-haltiger Partikel inhibiert.

Zur Bestätigung der Depletion von Sec62 und Sec63 wurden Aliquots der im ELISA eingesetzten Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Sowohl Sec62 als auch Sec63 konnten erfolgreich depletiert werden, wie ein Western-Blot gegen die endogenen Proteine zeigt (Abb. 5-32). Die Expression des L-Hüllproteins wird nicht durch die Depletion von Sec62 oder Sec63 beeinflusst, wie eine gleichbleibende Signalstärke in einem MA18/7-spezifischen Western-Blot zeigt. Das sekretorische Kontrollprotein Hämopexin zeigt ebenfalls eine relativ gleichbleibende Proteinkonzentration sowohl in der zellulären als auch in der sekretierten Form (Abb. 5-32).

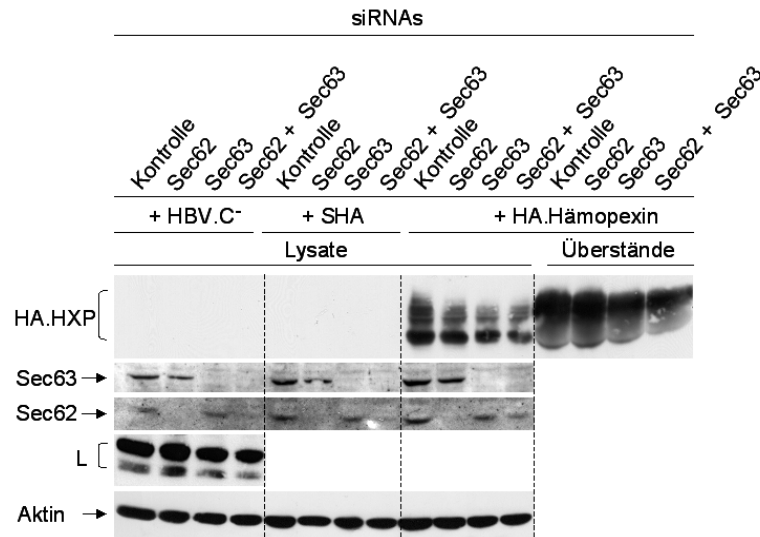


Abbildung 5-32: Einfluss der Depletion von Sec62 und Sec63 auf die Expression des L-Hüllproteins. HuH7-Zellen wurden mit Sec62- bzw. Sec63-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit pMSV.SHA, pHBV.C⁻ oder einem Plasmid, welches für das sekretorische Kontroll-Protein Hämopexin kodiert. Die erfolgreiche Depletion von Sec62 und Sec63 wurde mit einem Western-Blot gegen die endogenen Proteine bestätigt. L wurde mit dem Antikörper MA18/7 nachgewiesen, Hämopexin mit einem HA-spezifischen Western-Blot.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Sec62 und Sec63 sowohl bei der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins, als auch bei der Freisetzung subviraler Partikel beteiligt zu sein scheinen. Dabei kommt Sec63 mit seiner ins ER-Lumen ragenden J-Domäne die zentrale Aufgabe zu. Sec62 hingegen verstärkt in der Regel nur den für Sec63 beobachteten Effekt, zeigt aber bei alleiniger ektopischer Expression oder Depletion geringe Auswirkungen. Interessanterweise lag die PräS-Region im Proteaseschutz-Versuch nach Depletion von Sec62 und Sec63 in Kombination vollständig geschützt im ER-Lumen vor. Folglich könnte Sec63 zusammen mit seinem Partner Sec62 dafür verantwortlich sein, eine kotranslationale Translokation der PräS-Region zu verhindern und damit deren partielle posttranslationale Translokation zu ermöglichen, welche in der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins resultiert.

Vergleicht man die Ergebnisse der siRNA-vermittelten Depletion von Sec62 und Sec63 mit den Werten der ektopischen Expression, scheint insbesondere Sec63 für die Freisetzung L-haltiger subviraler Partikel eine wichtige Funktion zu erfüllen. Sowohl die Überexpression von Myc.Sec63 als auch die Depletion des endogenen Sec63 führt zu einer Reduktion der Freisetzung L-haltiger SVP auf ca. 60 %. Dies könnte in der Beteiligung von Sec63 an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins begründet liegen. Allerdings zeigen auch S-haltige SVP nach kombinierter Depletion von Sec62 und Sec63 eine Reduktion in ihrer Freisetzung, so dass auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen könnten.

6 Diskussion

Das große L-Hüllprotein nimmt eine zentrale Rolle im Lebenszyklus des Hepatitis B - Virus ein. Durch die Ausbildung seiner ungewöhnlichen dualen Topologie in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und im reifen Virion kann es vielfältigste Funktionen ausüben. Hierzu zählen die Bindung an den Leberzell - Rezeptor während der frühen Phase der Infektion (Neurath *et al.*, 1986) sowie die Umhüllung des Nukleokapsids während der Virusmorphogenese (Bruss und Ganem, 1991; Bruss und Vieluf, 1995). In dieser Arbeit stand deshalb die Betrachtung des L-Hüllproteins im Vordergrund. Ein Schwerpunkt war die nähere Charakterisierung des Mechanismus, der zur Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins führt. Dabei konnte das ER-luminale Chaperon BiP sowie die Translokon-assoziierten Komponenten Sec62 und Sec63 als bedeutende Faktoren der posttranslationalen Translokation der PräS-Region identifiziert werden.

Aufgrund seiner geringen Genomgröße ist das Hepatitis B - Virus auf zelluläre Strukturen für seinen Lebenszyklus angewiesen. Virusaufnahme, intrazellulärer Transport, Virusmorphogenese und -ausschleusung können nur durch die Rekrutierung zellulärer Proteine realisiert werden. Mit Hilfe des sogenannten Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems konnten in dieser Arbeit neue zelluläre Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert werden. Ihre eingehende Untersuchung ermöglicht es, das Zusammenspiel des Virus mit der Wirtszelle zukünftig besser zu verstehen.

6.1 Betrachtung des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass Protein - Protein - Interaktionen von Membranproteinen im konventionellen Hefe - Zwei - Hybrid System selten detektiert werden (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). Dies beruht zum einen darauf, dass Membranproteine aufgrund ihrer hydrophoben Transmembrandomänen nur unzureichend in den Zellkern gelangen können und zur Aggregation neigen, wenn sie außerhalb der Membran vorliegen (Stagljär und Fields, 2002). Zum anderen werden Membranproteine häufig posttranslational modifiziert (z.B. Glykosylierung, Palmitoylierung) oder oligomerisieren über ihre Transmembrandomänen, was im herkömmlichen System unberücksichtigt bleibt. Bedenkt man, dass ca. ein Drittel der zellulären Proteine verankert in

einer Membran vorliegt (von Heijne, 2006), wird deutlich, dass viele Protein - Protein - Wechselwirkungen aufgrund der Schwäche der Methode bislang nicht identifiziert werden konnten. Deshalb wurde das L-Hüllprotein von HBV in dieser Arbeit mit einem neuen System erneut gegen Leberzell-spezifische cDNA - Banken gescreent, um so die bereits vorliegenden Interaktionsstudien von L mit dem konventionellen Hefe - Zwei - Hybrid System zu vervollständigen (Harvey *et al.*, 1999; Hartmann-Stühler, 2001; Hartmann-Stühler und Prange, 2001; Bai *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Das in dieser Arbeit eingesetzte Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System eignet sich insbesondere zur Analyse von Membranproteinen und Membran-assoziierten Proteinen. Der Vorteil besteht darin, dass nicht nur einzelne hydrophile Domänen des Proteins von Interesse als Bait eingesetzt werden können, sondern das Protein als Ganzes inklusive seiner Transmembrandomänen. Die Integration des Baits in seine natürliche Zielmembran und die damit einhergehende Ausbildung seiner nativen Konformation bietet großes Potential für die Entdeckung physiologisch-relevanter Protein - Protein - Interaktionen. Ziel dieser Arbeit war es, insbesondere Membranproteine als neue Interaktionspartner des L-Hüllproteins zu identifizieren. Sie sollten neue Anregungen für z.B. den Ort und den Mechanismus der Virusmorphogenese geben oder aber auch den Prozess der partiellen posttranslationalen Translokation der PräS-Region weiter aufklären helfen.

In der Tat konnten neben löslichen Proteinen mehrere Membranproteine als neue Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert werden. DAD1 ist einer derjenigen, die aufgrund ihrer biologischen Relevanz für HBV im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen. DAD1 besitzt drei Transmembrandomänen, mit denen es in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert ist. Es handelt sich bei DAD1 um eine Untereinheit des Oligosaccharyltransferase (OST) - Komplexes, welcher die ko- und posttranslationale N-Glykosylierung vermittelt (Kelleher und Gilmore, 2006; Ruiz-Canada, 2009). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung reifer Hepatitis B - Virionen, nicht aber subviraler Partikel, strikt von der Glykosylierungs - Maschinerie der Zelle abhängt (Lu *et al.*, 1995; Mehta *et al.*, 1997; Werr und Prange, 1998). Lambert und Prange konnten durch Mutation viraler Glykosylierungsstellen zeigen, dass für die HBV - Morphogenese wahrscheinlich die Glykosylierung zellulärer Proteine, nicht aber der viralen Hüllproteine von Bedeutung ist (Lambert und Prange, 2007). Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass HBV für die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins oder den Zusammenbau reifer Virionen auf zelluläre Proteine angewiesen ist. Eine fehlende N-Glykosylierung könnte

in der fehlerhaften Faltung und dem damit verbundenen Funktionsverlust essentiell an der Morphogenese beteiligter Faktoren führen. Nun stellt sich die Frage, welche Bedeutung die N-Glykosylierung der Hüllproteine selbst im HBV - Lebenszyklus hat. Die Vermutung liegt nahe, dass diese erst nach der Freisetzung reifer Virionen bei der Neuinfektion eine Rolle spielt. Für andere Viren, wie z.B. das Hepatitis C - Virus (HCV), das humane Immundefizienz - Virus Typ 1 (HIV-1) und das humane Cytomegalie - Virus (HCMV), konnte gezeigt werden, dass die N-Glykane ihrer Hüllproteine für die Erkennung der Wirtszelle von Bedeutung sind (Smith und Helenius, 2004). So könnten auch die N-Glykane der auf dem Virusäußern exponierten PräS-Region des L-Hüllproteins einen initialen Kontakt zur Leberzelle schaffen, bevor die PräS1-spezifische Bindung an den Leberzell - Rezeptor erfolgt. Die Rekrutierung der OST-Untereinheit DAD1 durch das L-Hüllprotein könnte dessen effiziente N-Glykosylierung sicher stellen und damit die Grundlage für die L-vermittelte Bindung an die Leberzelle schaffen. Diese Hypothese könnte weiterführend mit HBV - Infektionssystemen, wie primären Hepatozyten des Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* (Köck *et al.*, 2001) oder der humanen Hepatoma Zelllinie HepaRG (Gripon *et al.*, 2002) überprüft werden.

Ein weiterer interessanter Interaktionspartner des L-Hüllproteins ist SAC1 (*suppressor of actin mutations 1*), eine integrale Lipid - Phosphatase der ER- und Golgi - Membran. Die Interaktion des L-Hüllproteins mit SAC1 wurde in einer weiterführenden Masterarbeit analysiert und bestätigt (Dötsch, 2007). SAC1 reguliert die zelluläre Konzentration an Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PtdIns(4)P), welches insbesondere in der Membran des Golgi - Apparates und in geringen Mengen auch in der ER-Membran lokalisiert ist. PtdIns(4)P ist für die Vesikelbildung am Golgi - Apparat und den anterograden Transport zur Zellperipherie von Bedeutung (Schorr *et al.*, 2001). Denkbar ist, dass die im ER synthetisierten und im Golgi - Apparat modifizierten viralen Hüllproteine über PtdIns(4)P-angereicherte Vesikel zum Ort der Virusmorphogenese, vermutlich das Multivesikuläre Endosom, gelangen. Des weiteren reguliert SAC1 die Aufnahme von ATP in das ER. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die ATP - Konzentration ein maßgeblicher Faktor bei der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins (Awe *et al.*, 2008), so dass auch hier eine interessante Verbindung besteht.

Neben den Interaktionspartnern mit bekannter biologischer Funktion wurden mehrere Membranproteine unbekannter Natur identifiziert (FAM18B, C14ORF1, C14ORF147, TMEM33, TMEM86B und TMEM125). Eine auffällige Gemeinsamkeit ist, dass sie mit bis zu fünf Transmembrandomänen bei einer Größe von ca. 150 bis 250 Aminosäuren eine enorm

hohe Dichte an Membrandurchgängen aufweisen. Möglicherweise decken zukünftige Untersuchungen weitere Gemeinsamkeiten dieser potentiellen Interaktionspartner auf. Die Analyse ihrer biologischen Funktion birgt die Möglichkeit, völlig neue Aspekte der Virus - Wirt - Interaktion aufzudecken.

Auch die neu identifizierten zytosolischen Interaktionspartner bieten interessante Schnittstellen zwischen zellulärer Funktion und viralem Lebenszyklus. Mit Profilin 1 konnte ein die Aktin - Polymerisation regulierendes Protein identifiziert werden. Durch seine drei Bindedomänen, eine für Aktin, eine für Phosphoinositole und eine für Prolin-reiche Regionen, steht Profilin 1 mit einer Vielzahl an Liganden in Kontakt. Neben der Regulation des Zytoskeletts ermöglichen diese Profilin 1 die Beteiligung an weiteren zellulären Prozessen, wie z.B. der Endozytose, der Organisation zellulärer Membranen und der Abschnürung von Vesikeln am Golgi - Apparat (Witke, 2004). Die Interaktion des L-Hüllproteins mit Profilin 1 wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Dötsch, 2007) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Bindungsbereich in der PräS1-Region liegt. Interessanterweise wurde das im Zytoplasma vorliegende Profilin 1 nach Kotransfektion mit dem L-Hüllprotein verstärkt Membran-assoziiert vorgefunden, was für eine aktive Rekrutierung von Profilin 1 durch das L-Hüllprotein spricht. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich HBV die Funktion von Profilin 1 für seinen Lebenszyklus zunutze macht. Auch andere Viren rekrutieren Profilin und nutzen das nachfolgende Rearrangement des Aktin - Zytoskeletts. So wurde für das Respiratorische Synzytial - Virus (RSV) gezeigt, dass Virusreifung und Virus-vermittelte Zell - Zell - Fusion Profilin 1-abhängig sind (Bitko *et al.*, 2003). Und auch HIV-1 benötigt Profilin 1 für seine interzelluläre Ausbreitung über sogenannte virologische Synapsen (Kadiu *et al.*, 2007). Welche Funktion Profilin 1 im Lebenszyklus von HBV ausübt ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Mit Cyclophilin B (CypB) konnte eine Peptidyl-Prolyl-cis/ trans - Isomerase identifiziert werden, welche maßgeblich bei der Faltung von Proteinen beteiligt ist. Cyclophilin B ist ein sekretorisches Protein, liegt aber zu einem geringen Anteil auch im Zytoplasma vor. CypB bindet mit hoher Affinität an Heparansulfat - Proteoglykane (HSPG) auf der Zelloberfläche (Hanouille *et al.*, 2007). Für HBV wurde kürzlich beschrieben, dass der initiale Kontakt mit der Leberzelle HSPG-vermittelt erfolgt (Zahn und Allain, 2005; Schulze *et al.*, 2007; Leistner *et al.*, 2008), womöglich über das hier als identifizierte CypB. Anschließend könnte CypB durch seine Peptidyl-Prolyl-cis/ trans - Isomerase Aktivität eine Konformationsänderung der Prolin-reichen PräS-Region herbeiführen und somit die Bindung an den eigentlichen Leberzell - Rezeptor einleiten. Des Weiteren wurde CypB zusammen mit BiP in einem

Multiprotein - Komplex bestehend aus molekularen Chaperonen und an der Proteinfaltung beteiligten Enzymen nachgewiesen (Meunier *et al.*, 2007). Man könnte spekulieren, dass CypB vermittelt durch seine Isomerase - Aktivität die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins in Zusammenarbeit mit BiP realisiert. Interessanterweise wurde Cyclophilin B auch für HIV-1 und des Hepatitis C - Virus als essentieller zellulärer Interaktionspartner im Rahmen der Genomreplikation beschrieben (Luban *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 1994; Watashi *et al.*, 2005). Leider konnte in ersten Versuchen die Bindung des L-Hüllproteins an CypB mittels Ko-Immünpräzipitation nicht bestätigt werden. Aufgrund des Potentials, welches CypB für den HBV - Lebenszyklus bietet, sollte die Interaktion mit einer anderen Methode (siehe unten) und einer anderen Markierung von CypB überprüft werden.

Ein weiterer Interaktionspartner ist die Myosin-leichte-Ketten-Kinase, die die ATPase-Aktivität von Myosin aktiviert. Sasaki *et al.* konnten zeigen, dass die Inhibierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase die Knospung von HIV-1 an der Plasmamembran verhindert (Sasaki *et al.*, 1995). Da für HBV ein ähnlicher *Budding* - Mechanismus wie für das HI-Virus postuliert wird (Lambert *et al.*, 2007), könnte die weiterführende Analyse der Myosin-leichte-Ketten-Kinase zu dessen Aufklärung beitragen. Beide Viren knospen zwar an unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, HIV-1 an der Plasmamembran und HBV vermutlich am Multivesikulären Endosom (Rost *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2007). Jedoch rekrutieren sowohl HIV-1 als auch HBV Untereinheiten der ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) - Maschinerie und nutzen diese für den Zusammenbau und die Freisetzung reifer Virionen.

Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten zellulären Interaktionspartner des L-Hüllproteins mit vorherigen Analysen, finden sich zahlreiche Übereinstimmungen. So konnte das Serumprotein Albumin, welches mittels ELISA als Bindungspartner der PräS₂-Region beschrieben wurde (Irshad *et al.*, 1987; Ishihara *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 1990), ebenso mit dem Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System identifiziert werden. Auch der von Bai *et al.* 2005 mit dem konventionellen Hefe - Zwei - Hybrid System isolierte Natrium-gekoppelte Aminosäuretransporter konnte wiederholt identifiziert werden, was die Aussagekraft des hier vorgestellten Systems unterstreicht.

Die in dieser Arbeit identifizierten Apolipoproteine (A-I, A-II, C-I und C-III) zeigen Ähnlichkeit zu dem bereits als Interaktionspartner der S-Region (Mehdi *et al.*, 1994) und der PräS-Region (Harvey *et al.*, 1999) beschriebenen Apolipoprotein H. Es besteht die Möglichkeit, dass die Apolipoproteine nur aufgrund ihrer hohen Abundanz und der damit

verbundenen Überrepräsentation in der cDNA - Bank ermittelt wurden. Allerdings weisen sie auch eine interessante Eigenschaft auf, die sich HBV zunutze machen könnte. Sie rekrutieren Phospholipide aus Membranen, wobei Apo-AI und Apo-AII auf Phosphatidylcholin spezialisiert sind (Forte *et al.*, 1995). Die HBV - Hüllmembran besteht zu 60 % aus Phosphatidylcholin und ca. 30 % aus Cholesterin und grenzt sich damit von der Zusammensetzung der ER-Membran ab (Funk *et al.*, 2007). Dies impliziert, dass Lipide aktiv in die virale Hüllmembran rekrutiert werden, möglicherweise über die hier identifizierten Apolipoproteine.

Neben seinen Vorzügen weist das Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System auch einige Schwächen auf. Es können z.B. nur Interaktionspartner identifiziert werden, deren N- oder C-Terminus in das Zytoplasma orientiert vorliegt. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass die Cub - Domäne des Baits und die NubG - Domäne des Preys zu Split - Ubiquitin reassoziieren und von Ubiquitin - spezifischen Proteasen erkannt werden. Luminal vorliegende Proteine des sekretorischen Weges, wie z.B. das ER-luminale Chaperon BiP, oder Membranproteine mit luminaler Orientierung von N- und C-Terminus können nicht isoliert werden, unabhängig davon, ob sie Bindungen mit dem L-Hüllprotein eingehen könnten. Dies bedeutet, dass eine Vielzahl an Interaktionspartnern auch unter optimalen Versuchsbedingungen aufgrund der Methodik nicht identifiziert werden kann. Des Weiteren sollte berücksichtigt werden, dass bei der Analyse der Klone der NubG-X cDNA - Bank i.d.R. *Rattus norvegicus* als Spezies durch den Datenbankabgleich ermittelt wurde. Es könnte sein, dass potentielle Interaktionspartner in der Ratte eine leicht veränderte Konformation aufweisen und somit nicht mehr mit dem L-Hüllprotein interagieren können. Aufgrund der großen Homologie der Genome von Ratte und Mensch von 90 % (Gibbs *et al.*, 2004) sollte dies allerdings ein relativ selten vorkommender Fall sein. Umgekehrt bedeutet dies, dass die ermittelten Interaktionspartner verwendet werden können, vorausgesetzt es erfolgt eine Bestätigung der Interaktion mit humaner cDNA in einem unabhängigen System. Auch die Fusion mit der NubG - Domäne könnte Proteine in der Ausbildung ihrer nativen Konformation stören, so dass die für eine Interaktion mit dem L-Hüllprotein nötigen Sequenzmotive möglicherweise nicht mehr an der Oberfläche exponiert werden. Neben den eben erwähnten Fällen, bei denen Proteine trotz einer real existierenden Protein - Protein - Interaktion nicht identifiziert werden können, kommen auch sogenannte Falschpositive im Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System vor. Hierunter versteht man Interaktionspartner, die mit unabhängigen Baits in unabhängigen Analysen wiederholt identifiziert werden. Laut Hersteller zählen hierzu ATPasen, Proteolipid - Proteine, Ubiquitin,

ADE2, Histon - Deacetylasen, Komponenten des Translokons, Signal Peptidasen, Cytochrom C und Selenoprotein K. Sie wurden bei der Auswertung der Sequenzierergebnisse verworfen und nicht weiter berücksichtigt. Mehrere unabhängige Faktoren sind die Ursache für falsch-positive Testergebnisse. Mutationen im Promotor - Bereich können das *ADE2*, *HIS3* oder *lacZ* - Reporter gen aktivieren, so dass es zu Wachstum auf Selektionsmedium oder einem positiven kalorimetrischen Nachweis ohne das Vorhandensein einer Protein - Protein - Interaktion kommt (Serebriiskii *et al.*, 2000). Des Weiteren kann es zu unspezifischen Interaktionen der Membranproteine durch unphysiologische Proteinkonzentrationen kommen (Thaminy *et al.*, 2003).

Die in dieser Arbeit vorgestellten neuen Interaktionspartner des L-Hüllproteins sollten bei ihrer weitergehenden Analyse mit einem unabhängigen System bestätigt werden. Hierzu eignet sich z.B. eine Ko-Immunpräzipitation des putativen Interaktionspartners aus zellulärem Lysat. Eine weitere Möglichkeit bieten Pulldown - Assays mit sechsfach Histidin- oder Glutathion S-Transferase-markierten Proteinen, die auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie beruhen. Auch mikroskopische Analysen liefern wichtige Hinweise darauf, ob eine im Hefesystem beobachtete Interaktion physiologischer Natur ist. Eine Kolokalisation nach immun-histochemischer Färbung bedeutet, dass beide Proteine sehr eng benachbart im gleichen zellulären Kompartiment vorliegen. Zeigen beide Proteine auch nach konfokaler Mikroskopie, bei der durch optische Schnitte störende Fluoreszenzstrahlung anderer Ebenen eliminiert wird, noch eine Kolokalisation, ist eine Interaktion als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Auch eine FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) - Analyse, bei der die Veränderung des Emissionsspektrums nach Protein - Protein - Interaktion ermittelt wird, würde eine Interaktion eindeutig bestätigen. Technisch schwieriger, aber aussagekräftiger wäre die Betrachtung zellulärer Schnitte nach Immunogold - Markierung am Transmissionselektronenmikroskop, wobei die Lokalisation der Proteine von Interesse indirekt durch Goldmarkierungen sichtbar gemacht wird.

Zusammenfassend konnte mit dem Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System eine Vielzahl neuer zellulärer Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert werden. Dabei unterstreichen Übereinstimmungen mit vorherigen Analysen deren Aussagekraft. Eine weitergehende Untersuchung der hier vorgestellten, biologisch-relevanten Interaktionspartner bietet großes Potential, das Zusammenspiel des Virus mit der Wirtszelle zukünftig besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion des v-SNAREs Bet1 und der

CoPII (*Coatomer protein complex-II*) - Untereinheit Sec24A mit dem L-Hüllprotein näher charakterisiert und bestätigt. Nachfolgend soll die Bedeutung dieser zwei Proteine für das Hepatitis B - Virus analysiert werden.

6.2 Analyse der Interaktionspartner Bet1 und Sec24A

Eine Besonderheit eukaryotischer Zellen ist ihre Unterteilung in subzelluläre Kompartimente mit unterschiedlichsten Funktionen. Über vesikuläre Transportvorgänge stehen die Kompartimente miteinander in Verbindung und tauschen Substrate, Enzyme oder Signalmoleküle aus. Die Abschnürung von Transportvesikeln und die Auswahl der *Cargo* - Moleküle wird durch Coat - Proteine vermittelt. Ihre zielgerichtete Fusion mit der Akzeptormembran involviert kleine GTPasen der Rab - Familie und Tethering - Proteine für den initialen Kontakt sowie SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) - Proteine für die eigentliche Membranfusion. In dieser Arbeit konnten mit dem v-SNARE Bet1 (*Blocked early in transport 1*) und der CoPII - Untereinheit Sec24A Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert werden, die am vesikulären Transport zwischen ER und Golgi - Apparat beteiligt sind.

Bet1 wird in sich von der ER-Membran abschnürende CoPII - Vesikel eingebaut und vermittelt im Komplex mit den t-SNAREs Syn5, GS27 und Sec22b die homotype Fusion der CoPII - Vesikel zum ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*). Des Weiteren ist Bet1 in einem Komplex mit Syn5, GS28 und Ykt6 für die Fusion gereifter ERGICs mit dem cis-Golgi - Apparat verantwortlich (Xu *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Joglekar *et al.*, 2003). Hieraus ergibt sich eine subzelluläre Lokalisation von Bet1 im Bereich von ER, ERGIC und cis-Golgi - Apparat sowie eine Anreicherung in vesikulären Strukturen zwischen diesen Kompartimenten. Vermittelt durch seine C-terminale Transmembrandomäne liegt Bet1 verankert in der Membran vor. Dies konnte durch eine Immunfluoreszenzanalyse bestätigt werden. Myc.Bet1 zeigt eine punktförmige Verteilung im gesamten Zytoplasma mit Anreicherung in der perinukleären Region und liegt damit hauptsächlich in vesikulären Strukturen vor. Bet1.FLAG hingegen zeigt eine netzartige Verteilung im Bereich des ERs. Der hier beobachtete Phänotyp entspricht der von Zhang *et al.* (1997) für rBet1 beschriebenen Lokalisation. Auch sie konnten nach viraler Infektion oder Akkumulation von *Cargo* - Proteinen im ER eine Relokalisation des endogenen Bet1 von vesikulären Strukturen mit Anreicherung im ERGIC zum ER beobachten. Die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung

von Bet1.FLAG und Myc.Bet1 könnte in ihren Markierungen begründet sein. Womöglich hält der mit sauren Aminosäuren angereicherte, C-terminale FLAG-Tag Bet1 in der Membran des ERs zurück, wohingegen der N-terminal fusionierte Myc-Tag keinerlei Auswirkung auf den Einbau von Bet1 in die sich vom ER abschnürenden Vesikel hat. Eine Kollokalisierung mit dem L-Hüllprotein kann als erstes Indiz für die Interaktion von humanem Bet1 mit L auch außerhalb des Hefesystems betrachtet werden.

Die Interaktion von Bet1 mit dem L-Hüllprotein wurde weitergehend mittels Ko-Immunpräzipitation bestätigt. Sowohl Bet1.FLAG als auch Myc.Bet1 konnten erfolgreich mit L kopräzipitiert werden. Im Gegensatz dazu scheint das kleine S-Hüllprotein nicht mit Bet1 zu interagieren. Bet1 konnte weder mit S kopräzipitiert werden, noch konnte Wachstum auf Selektionsmedium mit dem Bait SHA im Hefesystem detektiert werden. Durch eine erfolgreiche Kopräzipitation von Bet1 mit dem mittleren Hüllprotein konnte der Bindungsbereich auf die PräS2-Region eingeschränkt werden. Aufgrund der zytosolischen Ausrichtung von Bet1 muss die PräS2-Region für eine Interaktion ebenfalls in das Zytoplasma orientiert vorliegen. *In vivo* zeigt nur das L-Protein eine zytosolische Ausrichtung der PräS-Region. Dies bedeutet, dass die Bet1 - Interaktion *in vivo* L-spezifisch ist und unterstreicht erneut die physiologische Relevanz der dualen Topologie des L-Hüllproteins.

Bet1 interagiert über ein LXXLE - Motiv am N-Terminus seiner SNARE - Domäne mit der Cargo-erkennenden CoPII - Untereinheit Sec24A (Mossessova *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2003; Mancias und Goldberg, 2005). Man könnte daher vermuten, dass die Interaktion von L und Bet1 indirekter Natur ist und durch Sec24A vermittelt wird. Allerdings konnte der Bindungsbereich für Bet1 auf die PräS2-Region eingeschränkt werden, der für Sec24A auf die S-Region. Zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen sprechen dafür, dass sowohl die Bindung von Bet1 also auch die von Sec24A an L direkt erfolgt.

Nun stellt sich die Frage, worin die biologische Relevanz dieser Interaktion für das Hepatitis B - Virus liegt. Am wahrscheinlichsten ist, dass sich das L-Hüllprotein durch seine Interaktion mit dem v-SNARE Bet1 und der CoPII - Untereinheit Sec24A einen effizienten Export aus dem ER sichert. Dies wird dadurch untermauert, dass eine Depletion des endogenen Bet1 die Freisetzung L-haltiger subviraler Partikel drastisch, die der S-haltigen SVP nur minimal reduziert. Ein effizienter Export des L-Hüllproteins aus dem ER ist für die Virusmorphogenese essentiell. Die Umhüllung reifer Nukleokapside erfolgt erst in einem späteren Kompartiment des sekretorischen Weges, vermutlich dem Multivesikulären Endosom, und hängt strikt von dem L-Hüllprotein ab. Da eine stabile Interaktion mit der Cargo - bindenden Untereinheit des CoPII - Coats ebenfalls in einem effizienten Export aus

dem ER resultieren sollte, stellt sich die Frage, warum L zusätzlich an den v-SNARE Bet1 bindet. Dies könnte darin begründet liegen, dass SNAREs nicht gleichmäßig verteilt, sondern konzentriert in Cholesterin-haltigen Mikrodomänen in der Membran vorliegen (Lang *et al.*, 2001). Lang *et al.* konnten zeigen, dass die Depletion von Cholesterin zur Auflösung der SNARE - Cluster führt, was in ihrem System die Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran inhibierte. Man könnte sich also vorstellen, dass Bet1 ebenfalls in einer Cholesterin - reichen Umgebung in der ER-Membran vorliegt. Da Bet1 direkt mit der CoPII - Maschinerie interagiert und möglicherweise sogar die Abschnürung der Vesikel induziert (Mossessova *et al.*, 2003), liegt die Vermutung nahe, dass die vesikuläre Membran ebenfalls angereichert mit Cholesterin ist. Das L-Hüllprotein würde durch seine Interaktion mit Bet1 ebenfalls in der Cholesterin-reichen Membranumgebung ankonzentriert werden, was vor dem Hintergrund, dass die virale Hüllmembran mit 30 % reich an Cholesterin ist (Funk *et al.*, 2007), sehr interessant erscheint. Bislang liegen allerdings keine Untersuchungen darüber vor, ob das L-Hüllprotein die Membranumgebung durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit Cholesterin, wie es z.B. für das Hüllprotein gp41 von HIV-1 gezeigt wurde (Vincent *et al.*, 2002), bei seinem weiteren Transport zum Multivesikulären Endosom aufrecht erhalten kann.

Das in dieser Arbeit als Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifizierte Sec24A ist die *Cargo*-bindende Untereinheit des CoPII - Coat Komplexes. In Säugerzellen kommen vier Sec24 Isoformen (A - D) vor, welche sich in ihrer Affinität für unterschiedliche ER-Export Motive unterscheiden, funktionell aber redundant sind (Pagano *et al.*, 1999; Tang *et al.* 1999; Nufer *et al.*, 2002; Wendeler *et al.*, 2007). Membranständige *Cargo* - Proteine interagieren direkt mit Sec24, lösliche indirekt über einen membranständigen Rezeptor in der ER-Membran. Sec24 liegt in einem heterodimeren Komplex mit Sec23 löslich im Zytoplasma vor. Bei der Ausbildung von CoPII - Vesikeln wird dieser durch die membranständige GTPase Sar1 an die ER-Membran rekrutiert. Entsprechend seiner biologischen Funktion konnte FLAG.Sec24A nach immun-histochemischer Färbung im Bereich des Zytoplasmas sowie in vesikulären Strukturen mit Anreicherung in der perinukleären Region detektiert werden. Eine partielle Kolokalisation mit dem ER-Marker Calnexin spricht für eine effiziente Rekrutierung von FLAG.Sec24A an die ER-Membran. Interessanterweise konnte auch eine partielle Kolokalisation mit dem L-Hüllprotein in der perinukleären Region beobachtet werden. Dies impliziert, dass Sec24A nicht nur im Hefesystem, sondern auch im humanen Zellkultursystem mit L interagiert. Die Interaktion von humanem Sec24A mit dem L-Hüllprotein des Hepatitis B - Virus wurde weitergehend mittels Ko-Immunpräzipitation

bestätigt. Der Bindungsbereich für Sec24A konnte durch vergleichende Analyse der drei HBV - Hüllproteine auf die S-Region eingeschränkt werden. Dies wird durch einen positiven Interaktionstest des Preys Sec24A mit dem Bait SHA im Hefesystem untermauert.

Da die Erkennung von *Cargo* - Proteinen durch Sec24 über ER-Exportmotive vermittelt wird, wurde die Sequenz der Hüllproteine auf potentielle Sequenzmotive untersucht. Für den CoPII-vermittelten Transport existiert kein universelles ER-Exportmotiv. Neben Signalen bestehend aus zwei sauren (E/D-X-E/D) oder basischen (R/K-X-R/K) Aminosäureresten kann die Interaktion mit Sec24 auch durch di-hydrophobe bzw. di-aromatische Sequenzmotive erfolgen (Barlowe, 2003; Bonifacino und Glick, 2004). Für einen effizienten Export aus dem ER ist oftmals die Kombination von verschiedenen Sequenzmotiven nötig. Dies kann durch mehrere ER-Exportmotive innerhalb einer Polypeptidkette oder durch Oligomerisierung zu Multiproteinkomplexen erfolgen (Nufer *et al.*, 2003). Voraussetzung für eine Erkennung durch die CoPII - Maschinerie ist eine zytosolische Orientierung der ER-Exportmotive. Die S-Region, auf die der Bindungsbereich für Sec24A eingeschränkt werden konnte, weist zwei in das Zytoplasma ragende Bereiche auf. Zwischen Transmembrandomäne I und II liegen die potentiellen ER-Exportmotive IL (AS 25, 26), FL (AS 41-42) und RR (AS 78-79), zwischen Transmembrandomäne III und IV das Motiv VI (AS 194, 195). Da die drei Hüllproteine den Bereich der S-Region gemeinsam aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass eins oder mehrere der eben genannten Sequenzmotive für die Bindung der Hüllproteine an Sec24A verantwortlich ist. Das L-Hüllprotein könnte aufgrund der partiellen zytosolischen Ausrichtung seiner PräS-Region zusätzlich Sequenzmotive außerhalb der S-Region nutzen.

Um die Bedeutung dieser Interaktion für das Hepatitis B - Virus zu analysieren, wurde die Freisetzung subviraler Partikel (SVP) nach Depletion der verschiedenen Sec24 Isoformen untersucht. Für L-haltige SVP konnte eine deutliche Reduktion der Freisetzung nach alleiniger Depletion der Isoform Sec24A (34 %) oder in Kombination mit Sec24B (50 %) beobachtet werden, wohingegen S-haltige SVP nur einen geringen Effekt zeigten. Dies ist erstaunlich, da sowohl L als auch S mit Sec24A interagieren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die von Wendeler *et al.* (2007) beschriebene Spezifität der Sec24A Isoform für ER-Exportmotive des Typs LL sein. Dieses Sequenzmotiv kommt ausschließlich in der PräS-Region vor und kann damit nur vom L-Protein genutzt werden. Die Isoformen C und D scheinen nur einen untergeordneten Einfluss auf die Freisetzung sowohl L- als auch S-haltiger subviraler Partikel zu haben. Dies entspricht der von Wendeler *et al.* (2007) beobachteten Dominanz der Sec24A Isoform bei der Erkennung di-hydrophober und di-aromatischer Sequenzmotive. Durch kombinierte Depletion der vier Sec24 Isoformen wurde der komplette

CoPII-vermittelte Transport zum Erliegen gebracht. Unter diesen Umständen wurde die Freisetzung sowohl L- als auch S-haltiger subviraler Partikel drastisch auf ca. 30 % reduziert. Dies zeigt, dass die Freisetzung subviraler Partikel, unabhängig davon, ob sie alleinig aus dem kleinen Hüllprotein bestehen oder zusätzlich das mittlere und große Hüllprotein integriert haben, CoPII-vermittelt stattfindet. Die viralen Hüllproteine nehmen dabei Kontakt zur *Cargo*-bindenden Untereinheit Sec24 auf und werden aktiv in CoPII - Vesikel eingebaut. Der effiziente Export der Hüllproteine aus dem ER ist Voraussetzung der Virusmorphogenese und somit für den HBV - Lebenszyklus essentiell. Weiterführende Versuche mit dominant-negativen Sar1-Mutanten (Sar1T39N und Sar1H79G), welche den CoPII-vermittelten vesikulären Transport inhibieren (Kuge *et al.*, 1994; Aridor *et al.*, 1998), sollten die Abhängigkeit der Freisetzung subviraler Partikel von der CoPII - Maschinerie bestätigen. Interessanterweise konnte kürzlich für das Membran-assoziierte Matrixprotein VP40 des Ebola - Virus ebenfalls ein CoPII-abhängiger Transport zum Ort der Virusmorphogenese aufgedeckt werden (Yamayoshi *et al.*, 2008). Eine Depletion der VP40-bindenden CoPII - Untereinheit Sec24C oder der Einsatz dominant-negativer Sar1-Mutanten konnte die Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln effizient reduzieren. Eine vergleichende Analyse konnte zeigen, dass auch das Matrixprotein des Marburg - Virus auf den CoPII-vermittelten vesikulären Transportweg für seine Morphogenese am Multivesikulären Endosom angewiesen ist. Die Spezifität der CoPII - Abhängigkeit wird dadurch untermauert, dass die Inhibierung des CoPII-vermittelten Transportweges nicht generell zu einem inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung umhüllter Viren, wie HIV-1 oder Lassa - Virus, führt (Yamayoshi *et al.*, 2008). Hier ergeben sich aufschlussreiche Parallelen zum Lebenszyklus des Hepatitis B - Virus.

6.3 Einfluss des ER-luminalen Chaperons BiP und der Translokon-assoziierten Proteine Sec62 und Sec63 auf die duale Topologie des L-Hüllproteins

Die Topologie der meisten eukaryotischen Membranproteine wird bei der kotranslationalen Translokation an der ER-Membran festgelegt. Bislang sind nur sehr wenige polytope Membranproteine mit mehr als einer Orientierung bekannt (von Heijne, 2006). In eukaryotischen Zellen bildet Ductin eine duale Topologie aus, d.h. es kann in zwei entgegengesetzten Orientierungen in die Membran inserieren (Dunlop *et al.*, 1995). Ein

Beispiel für Proteine mit multipler Topologie, welche aus einer ineffizienten Insertion einzelner Transmembrandomänen resultiert, ist der Multidrug-Transporter namens P-Glykoprotein (Sadlish und Skach, 2004). Eine Besonderheit sind Proteine mit dynamischer Topologie. Sie können nach kotranslationaler Integration in die ER-Membran die Orientierung ihrer Transmembrandomänen verändern. Bislang sind nur zwei Proteine dieser Art bekannt, das zelluläre Aquaporin-1 sowie das große Hüllprotein von HBV. Aquaporin-1 hat initial vier seiner sechs Transmembrandomänen in die ER-Membran integriert und reorientiert in einem posttranslationalen Reifungsprozess drei seiner Transmembrandomänen (Lu *et al.*, 2000; von Heijne, 2006). Auch das L-Hüllprotein des Hepatitis B - Virus bildet eine ungewöhnliche duale Topologie in der ER-Membran und im reifen Virion aus. Diese resultiert aus einer partiellen posttranslationalen Translokation seiner PräS-Region in das ER-Lumen (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Prange und Streeck, 1995). Aufgrund seiner dualen Topologie kann das L-Hüllprotein vielfältigste Funktionen ausüben und übernimmt hierdurch eine Schlüsselfunktion im viralen Lebenszyklus. So vermittelt die auf der Virusoberfläche exponierte PräS-Region die Bindung an den Leberzell - Rezeptor während der frühen Phase der Infektion (Neurath *et al.*, 1986). Die in das Zytosol orientierte PräS-Region hingegen besitzt transaktivierende Eigenschaften (Hildt *et al.*, 1996), reguliert die intrazelluläre cccDNA - Konzentration (Summers *et al.*, 1990) und ermöglicht die Umhüllung der viralen Nukleokapside während der Virusmorphogenese (Bruss und Ganem, 1991; Bruss und Vieluf, 1995).

Trotz intensiver Forschung konnte der Mechanismus der partiellen posttranslationalen Translokation der PräS-Region noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Lambert und Prange (2001) konnten zeigen, dass die Posttranslokation nicht wie ursprünglich angenommen mit der Virusmorphogenese assoziiert ist (Guo und Pugh, 1997; Grgacic *et al.*, 2000). Vielmehr scheint sie durch die Translokationsmaschinerie der Wirtszelle vermittelt zu werden. Eine essentielle Funktion zellulärer Proteine bei der posttranslationalen Translokation der PräS-Region konnte bereits für das zytosolische Hitzeschockprotein Hsc70 und sein Ko-Chaperon Hsp40 gezeigt werden. Diese binden spezifisch an die PräS-Region. Hierdurch verhindern sie deren kotranslationale Translokation und halten sie in einem Translokations-kompetenten Zustand für die posttranslationale Translokation (Löffler-Mary *et al.*, 1997; Lambert und Prange, 2003).

Auch das ER-luminale Chaperon BiP bindet spezifisch an die PräS-Region (Lambert und Prange, 2003; Cho *et al.*, 2003). Allerdings war die Bedeutung dieser Interaktion für das Hepatitis B - Virus bislang unbekannt. Hier setzten die in dieser Arbeit durchgeführten

Versuche an. Durch die Manipulation der Substrat-bindenden Kapazität von BiP sollte dessen Bedeutung bei der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins ermittelt werden. BiP ist für die Ausübung seiner vielfältigen Funktionen, wie z.B. die Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere während der Proteintranslokation (Hamman *et al.*, 1998; Haigh und Johnson, 2002), die Faltung und Oligomerisierung von Proteinen (Meunier *et al.*, 2002) sowie die Qualitätskontrolle im ER (Nishikawa *et al.*, 2005) auf die Hilfe seiner Ko-Chaperone angewiesen. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Ansatz gewählt, bei dem die *in vivo*-Aktivität von BiP durch die ektopische Expression seiner Ko-Chaperone ERdj4 und BAP moduliert wurde. ERdj4, ein Mitglied der Hsp40 - Proteinfamilie, stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP, was in der Ausbildung eines stabilen BiP - Substrat - Komplexes resultiert (Shen *et al.*, 2002). Der Nukleotid - Austauschfaktor BAP hingegen bewirkt die Ablösung von ADP und Neubindung von ATP an BiP (Chung *et al.*, 2002), was zur Freisetzung des Substrates führt. Die Funktionalität dieses Ansatzes wurde mittels Ko-Immunpräzipitation bestätigt. Hierfür wurde endogenes BiP präzipitiert und der Einfluss der Ko-Chaperone auf die Menge an kopräzipitiertem L-Hüllprotein untersucht. Das die Substratbindung stabilisierende ERdj4 hatte keinerlei Auswirkungen auf die L-BiP - Interaktion, während der negative Regulator BAP die Bindung von L an BiP auf ein Minimum reduzierte. Dies verdeutlicht, dass die Substrat-bindende Kapazität von BiP *in vivo* durch die ektopische Expression seiner Ko-Chaperone manipuliert werden kann. Gleichzeitig bestätigt die effiziente Kopräzipitation des L-Hüllproteins mit endogenem BiP die stabile Interaktion dieser zwei Proteine.

Um zu gewährleisten, dass die Substrat-bindende Aktivität von BiP in jeder L-exprimierenden Zelle manipuliert wird, wurden bicistronische Vektoren hergestellt. Diese ermöglichen eine effiziente Expression der Ko-Chaperone gemeinsam mit dem L-Hüllprotein. Für BiP wurde die gleiche Strategie gewählt, um zu überprüfen, ob bereits dessen ektopische Expression einen Einfluss auf die Posttranslokation haben könnte. Eine Immunfluoreszenzanalyse bestätigte die korrekte intrazelluläre Lokalisation der (Ko)-Chaperone im Bereich der perinukleären Region. Sie konnten mit dem L-Hüllprotein kolokalisiert werden, was als erstes Indiz für ihre Beteiligung an der Ausbildung der dualen Topologie gewertet werden kann.

Es wurde vereinzelt beobachtet, dass die ektopische Expression des L-Proteins durch eine Aktivierung des BiP - Promotors zu ER - Stress führen kann (Xu *et al.*, 1997; Chua *et al.*, 2005). Deshalb wurden die in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen überprüft. Die endogene BiP - Konzentration wurde weder durch die ektopische Expression des L-Proteins noch durch die der Ko-Chaperone beeinflusst. Dies bedeutet, dass kein ER - Stress induziert wird und unterstreicht, dass die hier vorgestellten Ergebnisse physiologischer Natur sind.

Die Orientierung der PräS-Region wurde mit Hilfe von Proteaseschutz - Versuchen analysiert. Eine auf der zytosolischen Seite der ER-Membran vorliegende PräS-Region wird nach Zugabe von Trypsin degradiert. Die in das ER-Lumen translozierte PräS-Region ist vor proteolytischer Spaltung geschützt. Interessanterweise resultierte die ektopische Expression sowohl von BAP als auch von ERdj4 in einer Reduktion der posttranslationalen PräS-Translokation auf 25 %. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich darin begründet, dass der ATPase - Zyklus von BiP durch die ektopische Expression seiner Ko-Chaperone zum Stillstand gebracht wurde. Nach Expression von ERdj4 sollte BiP in einem stabilen Komplex mit seinem Substrat vorliegen, kann dieses aber nicht freigeben. Die Expression von BAP fördert die Dissoziation des BiP - Substrat - Komplexes. Aufgrund der geringen intrinsischen ATPase-Aktivität von BiP sollte allerdings keine erneute, stabile Substratbindung erfolgen. Da die Funktion von BiP auf einem wiederholten Binden und Freilassen des Substrates beruht, erklärt sich, warum sowohl das die Substratbindung stabilisierende als auch destabilisierende Ko-Chaperon zu einer verminderten Posttranslokation führt. Dies zeigt eindeutig, dass das ER-luminale Chaperon BiP mit Hilfe seiner Ko-Chaperone an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins beteiligt ist. Ob BiP eine reine Ankerfunktion ausübt und damit das Vorwärtsgleiten der PräS-Region durch Brownsche Molekularbewegung unterstützt oder die PräS-Region aktiv in das ER-Lumen hereinzieht, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

In beiden Fällen ist BiP auf seinen ATPase - Zyklus angewiesen und benötigt Energie in Form von ATP. Deshalb wurde weitergehend untersucht, ob die Depletion zellulären ATPs ebenfalls einen Einfluss auf die posttranslationale Translokation der PräS-Region hat. In der Tat lag die PräS-Region nach Depletion der zellulären ATP-Konzentration auf 40 % fast vollständig in das Zytoplasma orientiert vor. Die ATP-Abhängigkeit der PräS-Posttranslokation bestätigt, dass das ER-luminale Chaperon BiP zusammen mit dem zytosolisch vorliegenden Chaperon Hsc70 entscheidend an der posttranslationalen Translokation der PräS-Region beteiligt ist.

Der Mechanismus der posttranslationalen Translokation in das ER wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und charakterisiert. Neben dem BiP - Homolog Kar2p ist der heptamere Sec - Komplex bestehend aus dem trimeren Sec61 - Komplex und dem Sec62p-Sec63p - Subkomplex essentiell und ausreichend für die Posttranslokation (Panzner *et al.*, 1995). Deshalb wurden zwei seiner Untereinheiten, Sec62 und Sec63, bei der Analyse der dualen Topologie des L-Hüllproteins hinzugezogen.

Humanes Sec62 (TLOC1) und Sec63 (ERdj2) sind polytope Membranproteine des ERs und liegen eng assoziiert mit dem Sec61 - Translokator vor (Skowronek *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000). In der Hefe bildet Sec62p zusammen mit Sec71p und Sec72p einen Komplex, der als spezifische Bindestelle für Proteine mit posttranslationaler Translokation dient (Lyman und Schekman, 1997). Sec63 rekrutiert mit seiner konservierten J-Domäne BiP zur luminalen Seite des Translokators und stimuliert daraufhin dessen ATPase-Aktivität (Feldheim *et al.*, 1992; Brodsky *et al.*, 1995; Tyedmers *et al.*, 2000). Eine Beteiligung von Sec62 und Sec63 an der posttranslationalen Translokation der PräS-Region erscheint aufgrund ihrer biologischen Funktion denkbar.

Die natürliche Lokalisation von Myc-markiertem Sec62 und Sec63 konnte durch Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden. Beide Proteine zeigten eine netzartige Verteilung im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums. Es konnte eine fast vollständige Kolo-kalisation mit dem L-Hüllprotein beobachtet werden, was die Voraussetzung für eine Beteiligung von Sec62 und Sec63 an der posttranslationalen PräS-Translokation ist. Die ektopische Expression von Myc.Sec62 und Myc.Sec63 hatte nur geringe Auswirkungen auf die posttranslationale PräS-Translokation. Eine kombinierte Depletion des endogenen Sec62 und Sec63 hingegen resultierte in einer rein luminalen Orientierung der PräS-Region. Das L-Hüllprotein könnte bei Ausbildung dieser einheitlich luminalen Membrantopologie seiner Funktion beim Zusammenbau der Viren nicht mehr nachkommen, da es nicht mehr mit dem Nukleokapsid interagieren könnte. Der Einfluss der Depletion von Sec62 und Sec63 auf die Virusmorphogenese könnte weiterführend untersucht werden, indem man die Menge an neu gebildeter HBV-DNA in den zellulär vorliegenden Nukleokapsiden sowie in den extrazellulär vorliegenden Virionen ermittelt. Da die Bildung der Nukleokapside und die virale Replikation nicht durch Sec62 oder Sec63 beeinflusst werden sollten, würde man keinen Unterschied im zellulären Gehalt an neu gebildeter HBV-DNA erwarten. Im Gegensatz dazu sollte deren extrazelluläre Konzentration aufgrund der verminderten Neubildung reifer Virionen reduziert sein.

Auch nach Depletion von Sec62 und Sec63 scheint die Translokation der PräS-Region weiterhin posttranslational zu erfolgen, wie aus den zwei nicht modifizierten N-Glykosylierungsstellen der PräS-Region ersichtlich ist. Dieses Glykosylierungsmuster wird in der Regel als Marker der posttranslationalen Translokation der PräS-Region angesehen (Löffler-Mary *et al.*, 1997; Lambert und Prange, 2001). Eine kotranslationale Translokation der PräS-Region würde in zwei zusätzlichen N-Glykosylierungsformen des L-Hüllproteins resultieren, die allerdings auch vereinzelt bei der posttranslationalen Translokation beobachtet

werden konnten (Lambert und Prange, 2003; 2007). Die Ursache hierfür könnte darin begründet sein, dass in Säugerzellen, im Gegensatz zur Hefe, ein zweites Chaperon der Hsp40 - Proteinfamilie in der ER-Membran vorhanden ist. ERj1 (ERdj1) liegt eng assoziiert mit dem Sec61 - Translokator vor und bietet eine funktionelle Alternative zu Sec63, da es ebenfalls über seine ER-luminale J-Domäne mit BiP interagieren kann (Dudek *et al.*, 2002, 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass humanes ERj1 einen Hefestamm mit mutiertem Sec63p komplementieren kann (Kroczyńska *et al.*, 2004). Möglicherweise übernimmt ERj1 die Funktion des depletierten Sec63 bei der posttranslationalen Translokation der PräS-Region. Da es nicht mit Sec62 assoziiert ist, könnte ein wichtiger regulatorischer Faktor fehlen, was in der vollständigen Translokation der PräS-Region resultiert. Es ist weiterhin vorstellbar, dass ERj1 die Aktivität von BiP deutlich stärker stimuliert als Sec63, was ebenfalls eine vermehrt luminale Ausrichtung der PräS-Region bedeuten würde. Auch wenn über die Funktion von Sec62 und Sec63 bei der posttranslationalen Translokation der PräS-Region nur spekuliert werden kann, scheinen sie doch einen entscheidenden Beitrag zur Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins zu leisten, wie die rein luminale Orientierung der PräS-Region nach Depletion von Sec62 und Sec63 verdeutlicht.

Weitergehend wurde untersucht, ob sich die Beteiligung von Sec62 und Sec63 bei der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins auch in der Freisetzung subviraler Partikel äußert. In der Tat konnte insbesondere für L-haltige Partikel ein Effekt beobachtet werden und nur in geringem Umfang auch für S-haltige Partikel. Sowohl die Überexpression von Myc.Sec63, als auch die Depletion des endogenen Sec63 führte zu einer Reduktion der Freisetzung L-haltiger SVP auf ca. 60 %. Sec62 hingegen verstärkte in der Regel nur den für Sec63 beobachteten Effekt, zeigte aber bei alleiniger ektoptischer Expression oder Depletion nur geringe Auswirkungen. Da auch S-haltige SVP nach kombinierter Depletion von Sec62 und Sec63 vermindert freigesetzt wurden, scheint die Reduktion der Freisetzung L-haltiger SVP nicht alleine auf einer gestörten posttranslationalen PräS-Translokation zu beruhen. Eine unphysiologische Proteinkonzentration insbesondere von Sec63 scheint einen leicht inhibitorischen Effekt auf die Sec61-vermittelte Translokation zu haben. Dieses ist daraus ersichtlich, dass die ektoptische Expression von Myc.Sec63 alleine oder in Kombination mit Myc.Sec62 die Signalstärke des S- und L-Hüllproteins sowie des sekretorischen Proteins Hämopexin im Western-Blot reduzierte, wohingegen das an freien Ribosomen des Zytoplasmas synthetisierte Aktin eine gleichbleibende Proteinkonzentration aufwies. Möglicherweise ist dies auch der Grund dafür, dass sich die Überexpression von Sec63 so deutlich auf die Freisetzung subviraler Partikel und nur geringfügig auf die Ausbildung der

dualen Topologie des L-Hüllproteins ausgewirkt hat. Da die Depletion des endogenen Sec62 und Sec63 die Proteinbiosynthese der Hüllproteine nicht beeinträchtigt hat, ist davon auszugehen, dass der beobachtete Effekt auf die Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins und auf die Freisetzung subviraler Partikel biologisch relevant ist.

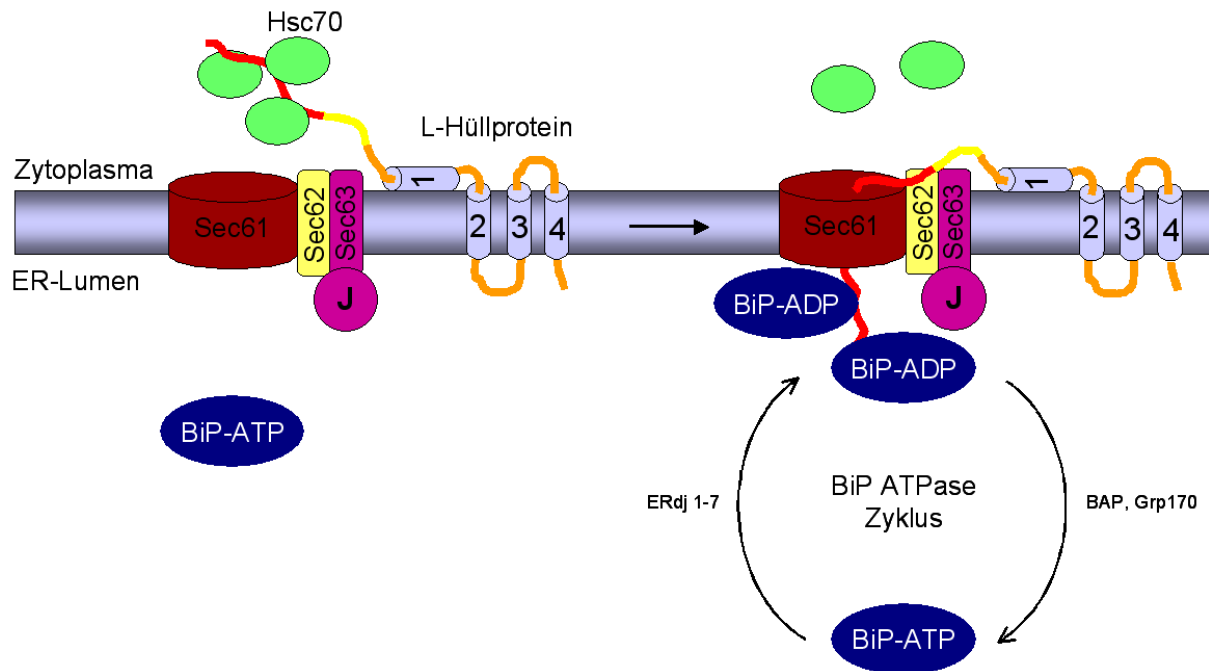


Abbildung 6-1: Modell der posttranslationalen Translokation der PräS-Region. Die PräS-Region wird nach ihrer Synthese durch das zytosolische Chaperon Hsc70 gebunden. Hierdurch wird die kotranslationale PräS-Translokation verhindert und die PräS-Region in einem Translokations-kompetenten Zustand gehalten. Das eng mit dem Translokon assoziierte Sec62 könnte die PräS-Region von Hsc70 übernehmen. Anschließend könnte diese durch Brownsche Molekularbewegung in das Translokon gelangen. Das durch die J - Domäne von Sec63 zur luminalen Seite des Translokons rekrutierte und aktivierte Chaperon BiP würde die PräS-Region in Empfang nehmen und ihr Zurückgleiten verhindern. In Form einer molekularen Ratsche würde BiP die PräS-Translokation vermitteln, bis eine stabile duale Topologie des L-Hüllproteins ausgebildet ist.

Integriert man die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in das bestehende Modell der posttranslationalen Translokation der PräS-Region, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 6-1). Sobald die PräS-Region aus dem Ribosom heraus schaut, wird sie durch das zytosolische Chaperon Hsc70 gebunden, was eine kotranslationale Translokation in das ER-Lumen verhindert. Die S-Region wird vermittelt durch ihre Signalsequenzen ausgehend vom Translokon in die Membran des ERs integriert. Die PräS-Region verbleibt auf der zytosolischen Seite der Membran und wird durch Hsc70 in einem Translokations-kompetenten Zustand gehalten. In Analogie zur Hefe könnte dann das eng mit dem Translokon assoziierte Sec62 als Rezeptor für Proteine der Posttranslokation dienen und die PräS-Region übernehmen. Bislang ist allerdings nicht geklärt, ob Sec62 diese Funktion auch ausserhalb der Hefe ausübt. Durch die räumliche Nähe zum Translokon könnte die PräS-

Region, angetrieben durch Brownsche Molekularbewegung, in das ER-Lumen hereinragen. Das durch die J-Domäne von Sec63 zur luminalen Seite des Translokons rekrutierte und aktivierte Chaperon BiP würde die PräS-Region in Empfang nehmen und ihr Zurückgleiten verhindern. BiP könnte dann, analog zur Posttranslokation der Hefe, als molekulare Ratsche die posttranslationale Translokation der PräS-Region vermitteln, bis eine stabile duale Topologie des L-Hüllproteins ausgebildet ist.

7 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das große L-Hüllprotein (L) des Hepatitis B - Virus. L bildet eine ungewöhnliche duale Topologie in der ER-Membran aus, welche auch im reifen Viruspartikel erhalten bleibt. In einem partiellen, posttranslationalen Reifungsprozess wird die sogenannte PräS-Region von der zytosolischen Seite der Membran aus in das ER-Lumen transloziert. Aufgrund seiner dualen Topologie und der damit verbundenen Multifunktionalität übernimmt L eine Schlüsselfunktion im viralen Lebenszyklus. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag deshalb darin, neue zelluläre Interaktionspartner des L-Hüllproteins zu identifizieren. Ihre Analyse sollte helfen, das Zusammenspiel des Virus mit der Wirtszelle besser zu verstehen. Hierfür wurde das Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid System eingesetzt, welches die Interaktionsanalyse von Membranproteinen und Membran-assoziierten Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung ermöglicht. Zwei der neu identifizierten, zellulären Interaktionspartner des L-Hüllproteins, der v-SNARE Bet1 und Sec24A, die *Cargo*-bindende Untereinheit des CoPII-vermittelten vesikulären Transports, wurden weitergehend im humanen Zellkultursystem untersucht. Sowohl für Bet1 als auch für Sec24A konnte die Interaktion mit dem L-Hüllprotein bestätigt und der Bindungsbereich eingegrenzt werden. Die Depletion des endogenen Bet1 reduzierte die Freisetzung L-haltiger, nicht aber S-haltiger subviraler Partikel (SVP) deutlich. Im Gegensatz zu Bet1 interagierte Sec24A auch mit dem mittleren M- und kleinen S-Hüllprotein des Hepatitis B - Virus. Die Inhibition des CoPII-vermittelten vesikulären Transportweges durch kombinierte Depletion der vier Sec24 Isoformen blockierte die Freisetzung sowohl L- als auch S-haltiger SVP. Dies bedeutet, dass die HBV - Hüllproteine das ER CoPII-vermittelt verlassen, wobei sie aktiv Kontakt zur *Cargo*-bindenden Untereinheit Sec24 aufnehmen. Der effiziente Export der Hüllproteine aus dem ER ist für die Virusmorphogenese und somit für den HBV - Lebenszyklus essentiell.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit basierte auf der Interaktion des L-Hüllproteins mit dem ER-luminalen Chaperon BiP, deren funktionelle Bedeutung für das Hepatitis B - Virus bislang unbekannt war. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob BiP, ähnlich wie das zytosolische Chaperon Hsc70, an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins beteiligt ist. Hierfür wurde BiP durch die ektopische Expression seiner Ko-Chaperone BAP und ERdj4 in seiner Substrat-bindenden Kapazität manipuliert. ERdj4, ein Mitglied der Hsp40 - Proteinfamilie, stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP, was die Substratbindung

stabilisiert. Der Nukleotid - Austauschfaktor BAP hingegen vermittelt die Auflösung des BiP - Substrat - Komplexes. Die Auswirkung der veränderten *in vivo*-Aktivität von BiP auf die posttranslationale PräS-Translokation wurde mit Proteaseschutz - Versuchen untersucht. Die ektopische Expression des positiven als auch des negativen Regulators von BiP resultierte in einer drastischen Reduktion der posttranslationalen Translokation der PräS-Region. Ein vergleichbarer Effekt wurde nach Manipulation des BiP ATPase - Zyklus durch Depletion der zellulären ATP - Konzentration beobachtet. Dies spricht dafür, dass das ER-luminale Chaperon BiP, zusammen mit dem zytosolischen Hsc70, eine zentrale Rolle in der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins spielt.

Zwei weitere Proteine, Sec62 und Sec63, die sich für die posttranslationale Translokation in der Hefe als essentiell erwiesen haben, wurden in die Analyse der dualen Topologie des L-Hüllproteins einbezogen. Interessanterweise konnte eine rein luminale Ausrichtung der PräS-Region nach kombinierter Depletion des endogenen Sec62 und Sec63 beobachtet werden. Dies deutet an, dass sowohl Sec62 als auch Sec63 an der Ausbildung der dualen Topologie des L-Hüllproteins beteiligt sind. In Analogie zur Posttranslokation der Hefe könnte Sec62 als Translokation-assoziiertes Rezeptor für Substrate der Posttranslokation, und damit der PräS-Region, dienen. Sec63 könnte mit seiner J-Domäne das ER-luminale Chaperon BiP zum Translokation rekrutieren und daraufhin dessen Substrat-bindende Aktivität stimulieren. BiP würde dann, einer molekularen Ratsche gleich, die PräS-Region durch wiederholtes Binden und Freisetzen aktiv in das ER-Lumen hereinziehen, bis eine stabile duale Topologie des L-Hüllproteins ausgebildet ist. Die Bedeutung von Sec62 und Sec63 für den HBV - Lebenszyklus wird dadurch untermauert, dass sowohl die ektopische Expression als auch die Depletion des endogenen Sec63 die Freisetzung L-haltiger subviraler Partikel deutlich reduziert.

8 Literaturverzeichnis

- Auerbach, D., Galeuchet-Schenk, B., Hottiger, M.O. und Stagljar, I. (2002). Genetic approaches to the identification of interactions between membrane proteins in yeast. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 22, 473-483
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1994). *Current Protocols In Molecular Biology*; John Wiley & Sons
- Awe, K., Lambert, C. und Prange, R. (2008). Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett.*, 582, 3179-3184
- Bai, G.Q., Cheng, J., Zhang, S.L., Huang, Y.P., Wang, L., Liu, Y. und Lin, S.M. (2005). Screening of hepatocyte proteins binding to complete S protein of hepatitis B virus by yeast-two hybrid system. *World J. Gastroenterol.*, 11, 3899-3904
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell. Biol.*, 13, 295-300.
- Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1988). The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J.*, 7, 4185-4192
- Beck, J. und Nassal, M. (2007) Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.*, 13, 48-64
- Berting, A., Hahnen, J., Kroger, M. und Gerlich, W.H. (1995). Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology*, 38, 8-15
- Bi, X., Corpina, R.A. und Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24-Sar1 prebudding complex of the CoPII vesicle coat. *Nature*, 419, 271-277
- Bitko, V., Oldenburg, A., Garmon, N.E. und Barik, S. (2003). Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiology*, 3: 9
- Blobel, G. und Sabatini, D.D. (1971). Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells. *Biomembranes*, 2, 193-195
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.*, 67, 835-851
- Bonifacino, J.S. und Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116, 153-66
- Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. und Tiollais, P. (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 286, 533-535
- Brodsky, J.L., Goeckeler, J. und Schekman, R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *PNAS*, 92, 9643-9646
- Bruss, V. und Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *PNAS*, 88, 1059-1063
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R. und Gerlich, W.H. (1994). Posttranslational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J.*, 13, 2273-2279
- Bruss, V. und Vieluf, K. (1995). Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J. Virol.*, 69, 6652-6657
- 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, 9350-9357
- Bruss, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 13, 65-73

- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R. und Schiller, J.T. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J. Virol.*, 78, 751-757
- Buck, T.M., Wright, C.M. und Brodsky, J.L. (2007). The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18, 751-761
- Caplan, A.J., Cyr, D.M. und Douglas, M.G. (1993). Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* DnaJ: a diverse protein family that functions with Hsp70 stress proteins. *Mol. Biol. Cell*, 4, 555-563
- Cheetham, M.E. und Caplan, A.J. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaption of chaperone function. *Cell Stress Chaperones*, 3, 28-36
- Cho, D.Y., Yang, G.H., Ryu, C.J. und Hong, H.J. (2003). Molecular chaperone Grp78/ BiP interacts with the large surface protein of hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.*, 77, 2784-2788
- Chua, P.K., Wang, R.Y., Lin, M.H., Masuda, T., Suk, F.M. und Shih, C. (2005). Reduced secretion of virions and hepatitis B virus (HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Virol.*, 79, 13483-13496
- Chung, K.T., Shen, Y. und Hendershot, L.M. (2002). BAP, a mammalian BiP associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J. Biol. Chem.*, 277, 47557-47563
- Connolly, T. und Gilmore, R. (1986). Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. *J. Cell. Biol.*, 103, 2253-2261
- Corsi, A.K. und Schekman, R. (1997). The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.*, 137, 1483-1493
- Crowley, K.S., Reinhart, G.D. und Johnson, A.E. (1993). The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell*, 73, 1101-1115
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Botcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V. und Pumpens, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, 77, 943-950
- Dane, D.S., Cameron, C.H. und Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1, 695-698
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A. und Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multi-subunit complex. *Nature*, 349, 806-808
- Dierks, T., Volkmer, J., Schlenstedt, G., Jung, C., Sandholzer, U., Zachmann, K., Schlotterhose, P., Neifer, K., Schmidt, B. und Zimmermann, R. (1996). A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, 15, 6931-6942
- Dötsch, A. (2007). Identifizierung zellulärer Proteine als Interaktionspartner des großen Hüllproteins des Hepatitis B-Virus. Masterarbeit im Fach Biomedizin, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Dudek, J., Volkmer, J., Bies, C., Guth, S., Müller, A., Lerner, M. *et al.* (2002). A novel type of cochaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. *EMBO J.*, 21, 2958-2967
- Dudek, J., Greiner, M., Müller, A., Hendershot, L.M., Kopsch, K., Nastainczyk, W. und Zimmermann, R. (2005). ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 1008-1014

- Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner, M., Jalal, C., Müller, L. und Zimmermann, R. (2009). Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1-14
- Dunlop, J., Jones, P.C. und Finbow, M.E. (1995). Membrane insertion and assembly of ductin: a polytopic channel with dual orientations. *EMBO J.*, 14, 3609-3616
- Eble, B.E., MacRae, D.R., Lingappa, V.R. und Ganem, D. (1987). Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 3591-3601
- Eble, B.E., Lingappa, V.R. und 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, 1414-1419
- Fan, C.Y., Lee, S. und Cyr, D.M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*, 8, 309-316
- Feldheim, D., Rothblatt, J. und Schekman, R. (1992). Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 3288-3296
- Fernholz, D., Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. und Will, H. (1993). Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology*, 194, 137-148
- Ferro-Novick, S. und Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature*, 370, 191-193
- Fields, S. und Song, O.K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340, 245-246
- Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C., und McKay, D.B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346, 623-628
- Flynn, G.C., Chappell, T.G. und Rothman, J.E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*, 245, 385-390
- Forte, T.M., Bielicki, J.K., Goth-Goldstein, R., Selmek, J. und McCall, M.R. (1995). Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J. Lipid Res.*, 36, 148-157
- Franke, E.K., Yuan, H.E. und Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, 372, 359-362
- Fujiyama, A. und Tamanoi, F. (1986). Processing and fatty acid acylation of Ras1 and Ras2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, 83, 1266-1270
- Funk, A., Mhamdi, M., Hohenberg, H., Will, H. und Sirma, H. (2006). pH-independent entry and sequential endosomal sorting are major determinants of hepadnaviral infection in primary hepatocytes. *Hepatology*, 44, 685-693
- Funk, A., Mhamdi, M., Will, H. und Sirma, H. (2007). Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J. Gastroenterol.*, 13, 91-103
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. und Charnay, P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*, 281, 646-650
- Ganem, D. und Varmus, H.E. (1987). The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 651-693
- Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K.C., Burch, P.E., *et al.* (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428, 493-521
- Glebe, D. und Urban, S. (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J. Gastroenterol.*, 13, 22-38

- Grgacic, E.V., Kuhn, C. und 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, 2455-2458
- Gripon, P., Diot, C., Theze, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C. und Guguen-Guillouzo, C. (1988). Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Virol.*, 62, 4136-4143
- Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. und Guguen-Guillouzo, C. (1995). Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology*, 213, 292-299
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. und Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *PNAS*, 99, 15655-15660
- Gülow, K., Bienert, D. und Haas, I.G. (2002). BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency. *J. Cell Sci.*, 115, 2443-2452
- Guo, J.T. und 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, 1107-1114
- Gürkan, C., Stagg, S.M., Lapointe, P. und Balch, W.E. (2006). The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 727-38
- Haas, I.G. und Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, 306, 387-389
- Ha, J.H. und McKay, D.B. (1994). ATPase kinetics of recombinant bovine 70 kDa heat shock cognate protein and its amino-terminal ATPase domain. *Biochemistry*, 33, 14625-14635
- Haigh, N.G. und Johnson, A.E. (2002). A new role for BiP: closing the aqueous pore during protein integration into the ER membrane. *J. Cell. Biol.*, 156, 261-270
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M. und Johnson, A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, 92, 747-758
- Hanouille, X., Melchior, A., Sibille, N., Parent, B., Denys, A., Wieruszeski, J.M., Horvath, D., Allain, F., Lippens, G. und Landrieu, I. (2007). Structural and functional characterization of the interaction between cyclophilin B and a heparin-derived oligosaccharid. *J.B.C.*, 282, 34148-34158
- Hartmann-Stühler, C. (2001). Untersuchungen über Wechselwirkungen zwischen Proteinen der Leber und dem großen Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus. Dissertation, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Hartmann-Stühler, C. und Prange, R. (2001). Hepatitis B virus large envelope protein interacts with γ 2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J. Virol.*, 75, 5343-5351
- Harvey, T.J., Macnaughton, T.B., Park, D.S. und Gowans, E.J. (1999). A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen. *J. Gen. Virol.*, 80, 607-615
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. und Gerlich, W.H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J. Virol.*, 52, 396-402
- Hendershot, L.M. (2004). The ER chaperone BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 71, 289-297
- Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E. und Blatch, G.L. (2005). Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci.*, 14, 1697-1709
- Hildt, E., Saher, G., Bruss, V. und Hofschneider, P.H. (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology*, 225, 235-239

- Hong, W. (2005). SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta*, 1744, 493-517
- Hu, J., Flores, D., Toft, D., Wang, X. und Nguyen, D. (2004). Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function. *J. Virol.*, 78, 13122-13131
- Hu, K.Q., Yu, Z.Q., Li, F.H. und Hao, L.J. (1990). A study of the binding ability of pre-S1 and S2 proteins of hepatitis B virus to human serum albumin. *Hepatology*, 37, 338-341
- Huovila, A.P., Eder, A.M. und Fuller, S.D. (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J. Cell Biol.*, 118, 1305-1320
- Irshad, M., Gandhi, B.M., Chawla, T.C., Acharya, S.K., Joshi, Y.K. und Tandon, B.N. (1987). Studies on HBsAg binding with polymerised human serum albumin by ELISA. *J. Virol. Methods*, 16, 75-85
- Ishihara, K., Waters, J.A., Pignatelli, M. und Thomas, H.C. (1987). Characterisation of the polymerised and monomeric human serum albumin binding sites on hepatitis B surface antigen. *J. Med. Virol.*, 21, 89-95
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Xoshida, M., Hattori, M., und Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *PNAS*, 98, 4569-4574
- Jahn, R. und Scheller, R.H. (2006). SNAREs – engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 631-643
- Joglekar, A.P., Xu, D., Rigotti, D.J., Fairman, R. und Hay, J.C. (2003). The SNARE motif contributes to rbet1 intracellular targeting and dynamics independently of SNARE interactions. *J.B.C.*, 278, 14121-14133
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *PNAS*, 91, 10340-10344
- Kadiu, I., Ricardo-Dukelow, M., Ciborowski, P. und Gendelman, H.E. (2007). Cytoskeletal protein transformation in HIV-1-infected macrophage giant cells. *J. Immunol.*, 178, 6404-6415
- Kau, J.H. und Ting, L.P. (1998). Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J. Virol.*, 72, 3796-3803
- Kelleher, D.J. und Gilmore, R. (2006). An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*, 16, 47-62
- Kenney, J.M., von Bonsdorff, C.H., Nassal, M. und Fuller, S.D. (1995). Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure*, 3, 1009-1019
- Kleizen, B. und Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 343-349
- Klingmüller, U. und Schaller, H. (1993). Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J. Virol.*, 67, 7414-7422
- Köck, J., Borst, E.M. und 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, 5827-5831
- Köck, J., Nassal, M., MacNelly, S., Baumert, T.F., Blum, H.E. und von Weizsacker, F. (2001). Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J. Virol.*, 75, 5084-5089
- Koshy, R., Koch, S., von Loringhoven, A.F., Kahmann, R., Murray, K. und Hofschneider, P.H. (1983). Integration of hepatitis B virus DNA: evidence for integration in the single-stranded gap. *Cell*, 34, 215-223
- Kroczyńska, B., Evangelista, C.M., Samant, S.S., Elguindi, E.C. und Blond, S.Y. (2004). The SANT2 domain of murine tumor cell DnaJ-like protein 1 human homologue interacts

- with α 1-antichymotrypsin and kinetically interferes with its serpin inhibitory activity. *J. Biol. Chem.*, 279, 11432-11443
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B. und Rapoport, T.A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.*, 14, 217-223
- Lambert, C. und Prange, R. (2001). Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J. Biol. Chem.*, 276, 22265-22272
- Lambert, C. und Prange, R. (2003). Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *PNAS*, 100, 5199-5204
- Lambert, C. und Prange, R. (2004). Development and characterization of a 293 cell line with regulatable expression of the hepatitis B virus large envelope protein. *J. Viral Methods*, 121, 181-190
- Lambert, C., Döring, T. und Prange, R. (2007). Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and γ 2-Adaptin. *J. Virol.*, 81, 9050-9060
- Lambert, C. und Prange, R. (2007). Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein. *Virology Journal*, 4, 45-53
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. und Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.*, 20, 2202-2213
- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L. und Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 20, 87-123
- Leistner, C.M., Gruen-Bernhard, S. und Glebe, D. (2008). Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cellular Microbiology*, 10, 122-133
- Li, D., Wang, X.Z., Ding, J. und Yu, J.P. (2005). NACA as a potential cellular target of hepatitis B virus preS1 protein. *Dig. Dis. Sci.*, 50, 1156-1160
- Liberek, K., Skowrya, D., Zylicz, M., Johnson, C. und Georgopoulos, C. (1991). The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J. Biol. Chem.*, 266, 14491-14496
- Liebermeister, W., Rapoport, T.A. und Heinrich, R. (2001). Ratcheting in posttranslational protein translocation: a mathematical model. *J. Mol. Biol.*, 305, 643-656
- Löffler-Mary, H., Werr, M. und 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, 144-152
- Löffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C. und Prange, R. (2000). Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology*, 270, 358-67
- Lu, X., Mehta, A., Dwek, R., Butters, T. und Block, T. (1995). Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. *Virology*, 213, 660-665
- Lu, Y., Turnbull, I.R., Bragin, A., Carveth, K., Verkman, A.S. und Skach, W.R. (2000). Reorientation of aquaporin-1 topology during maturation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 11, 2973-2985
- Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V. und Goff, S.P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell*, 73, 1067-1078
- Lyman, S.K. und Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, 88, 85-96

- Macrae, D.R., Bruss, V. und Ganem, D. (1991). Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology*, 181, 359-363
- Mancias, J. D. und Goldberg, J. (2005). Exiting the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 6, 278-85
- Mangold, C.M. und Streeck, R.E. (1993). Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J. Virol.*, 67, 4588-4597
- Mangold, C.M., Unckell, F., Werr, M. und Streeck, R.E. (1997). Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles. *Arch. Virol.*, 142, 2257-2267
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, 97, 553-564
- McAlear, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J. und Hilleman, M.R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, 307, 178-180
- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J. und Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.*, 249, 126-137
- Mehdi, H., Kaplan, M.J., Anlar, F.Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K. und Peeples, M.E. (1994). Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J. Virol.*, 68, 2415-2424
- Mehta, A., Lu, X., Block, T.M., Blumberg, B.S. und Dwek, R.A. (1997). Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single N-linked glycosylation site can regulate HBV secretion. *PNAS*, 94, 1822-1827
- Meldolesi, J. und Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 10-14
- Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T. und Hendershot, L.M. (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol. Biol. Cell*, 13, 4456-4469
- Meyer, H.A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.U. und Hartmann, E. (2000). Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J.B.C.*, 275, 14550-14557
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L. und Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*, 114, 497-509
- Mossessova, E., Bickford, L.C. und Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, 114, 483-495
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 263-273
- Munro, S. und Pelham, H.R.B. (1986). An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 46, 291-300
- Neurath, A.R., Kent, S.B., Strick, N. und Parker, K. (1986). Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, 46, 429-436
- Neurath, A.R., Strick, N. und 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, 461-469
- Newbold, J.E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S. und Locarnini, S. (1995). The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists *in situ* as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.*, 69, 3350-3357

- Ng, D.T., Brown, J.D. und Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell. Biol.*, 134, 269-278
- Nishikawa, S., Brodsky, J.L. und Nakatsukasa, K. (2005). Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J. Biochem.*, 137, 551-555
- Nowak, M.A., Bonhoeffer, S., Hill, A.M., Boehme, R., Thomas, H.C. und McDade, H. (1996). Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *PNAS*, 93, 4398-4402
- Nufer, O., Guldbrandsen, S., Degen, M., Kappeler, F., Paccaud, J.P., Tani, K. und Hauri, H.P. (2002). Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *Journal of Cell Science*, 115, 619-628
- Nufer, O., Kappeler, F., Guldbrandsen, S. und Hauri, H.P. (2003). ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains. *J. Cell. Sci.*, 116, 4429-4440
- Ochiya, T., Tsurimoto, T., Ueda, K., Okubo, K., Shiozawa, M. und Matsubara, K. (1989). An *in vitro* system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes. *PNAS*, 86, 1875-1879
- Osborne, A.R., Rapoport, T.A. und van den Berg, B. (2005). Protein translocation by the Sec61/ SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 529-550
- Ostapchuk, P., Hearing, P. und Ganem, D. (1994). A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J.*, 13, 1048-1057
- Pagano, A., Letourneur, F., Garcia-Estefania, D., Carpentier, J.L., Orci, L. und Paccaud, J.P. (1999). Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 274, 7833-7840
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189, 347-358
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T.A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, 81, 561-570
- Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C. und Roingeard, P. (2007). Hepatitis B subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J. Virol.*, 81, 3842-3851
- Persing, D.H., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1987). The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J. Virol.*, 61, 1672-1677
- Petit, M.A., Capel, F., Dubanchet, S. und Mabit, H. (1992). PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology*, 187, 211-222
- Plath, K. und Rapoport, T.A. (2000). Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.*, 151, 167-178
- Prange, R. und Streeck, R.E. (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.*, 14, 247-256
- Qian, Y.Q., Patel, D., Hartl, F.U. und McColl, D.J. (1996). Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J domain. *J. Mol. Biol.*, 260, 224-235
- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A. und Kann, M. (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *PNAS*, 100, 9849-9854
- Rall, L.B., Standing, D.N., Laub, O. und Rutter, W.J. (1983). Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.*, 3, 1766-1773
- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature Reviews*, 450, 663-669
- Robinson, W.S. (1977). The genome of hepatitis B virus. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 357-377

- Robzyk, K. und Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Research*, 20, 3790
- Ron, D. und Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 519-529
- Rost, M., Mann, S., Lambert, C., Döring, T., Thomé, N. und Prange, R. (2006). γ 2-Adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J.B.C.*, 281, 29297-29308
- Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372, 55-63
- Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J. und Gilmore, R. (2009). Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell*, 136, 272-283
- Sadlish, H. und Skach, W.R. (2004). Biogenesis of CFTR and other polytopic membrane proteins: new roles for the ribosome-translocon complex. *J. Membr. Biol.*, 202, 115-126
- Sasaki, H., Nakamura, M., Ohno, T., Matsuda, Y., Yuda, Y. und Nonomura, Y. (1995). Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *PNAS*, 92, 2026-2030
- Schaller, H. und Fischer, M. (1991). Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 168, 21-39
- Schmitt, S., Glebe, D., Tolle, T.K., Lochnit, G., Linder, D., Geyer, R. und Gerlich, W.H. (2004). Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.*, 85, 2045-2053
- Schorr, M., Then, A., Tahirovic, S., Hug, N. und Mayinger, P. (2001). The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr. Biol.*, 11, 1421-1426
- Schulze, A., Gripon, P. und Urban, S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, 46, 1759-1768
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M., und Golemis, E.A. (2000). Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques*, 28, 328-336
- Shen, Y., Meunier, L. und Hendershot, L.M. (2002). Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP *in vitro* and is induced by ER stress. *J.B.C.*, 277, 15947-15956
- Simon, S.M. und Blobel, G. (1991). A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 65, 371-380
- Skowronek, M.H., Rotter, M. und Haas, I.G. (1999). Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol. Chem.*, 380, 1133-1138
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., und Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362, 318-324
- Stagg, S.M., Gürkan, C., Fowler, D.M., LaPointe, P., Foss, T.R., Potter, C.S., Carragher, B. und Balch, W.E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, 439, 234-238
- Stagg, S.M., LaPointe, P. und Balch, W.E. (2007). Structural design of cage and coat scaffolds that direct membrane traffic. *Current Opinion in Structural Biology*, 17, 221-228
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und Te Heesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *PNAS*, 95, 5187-5192
- Stagljar, I. und Fields, S. (2002). Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27, 559-562

- Steel, G.J., Fullerton, D.M., Tyson, J.R. und Stirling, C.J. (2004). Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science*, 303, 98-101
- Stefanovic, S. und Hegde, R.S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*, 128, 1147-1159
- Stirk, H.J., Thornton, J.M. und Howard, C.R. (1992). A topological model for hepatitis surface antigen. *Intervirology*, 33, 148-158
- Summers, J., Smith, P.M. und Horwich, A.L. (1990). Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J. Virol.*, 64, 2819-2824
- Sureau, C., Romet-Lemonne, J.L., Mullins, J.I. und Essex, M. (1986). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell*, 47, 37-47
- Swameye, I. und 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, 9434-9441
- Szyperski, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C. und Wuthrich, K. (1994). NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 1-108) containing the highly conserved J domain. *PNAS*, 91, 11343-11347
- Tang, B.L., Kausalya, J., Low, D.Y., Lock, M.L. und Hong, W. (1999). A family of mammalian proteins homologous to yeast Sec24p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258, 679-684
- Thaminy, S., Auerbach, D., Arnoldo, A. und Stagljar, I. (2003). Identification of novel ErbB3-interacting factors using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *Genome Research*, 13, 1744-1753
- Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Stockert, R.J., Poralla, T. und 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, 3021-3029
- Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M.H., Haas, I.G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J. und Zimmermann, R. (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *PNAS*, 97, 7214-7219
- Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J. und Zimmermann, R. (2003). Polypeptide chain binding proteins mediate completion of cotranslational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.*, 4, 505-510
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshorn, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., *et al.* (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403, 623-627
- Urban, S., Breiner, K.M., Fehler, F., Klingmüller, U. und 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, 8089-8097
- van den Berg, B., Clemons, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. und Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427, 36-44
- Vincent, N., Genin, C. und Malvoisin, E. (2002). Identification of a conserved domain of the HIV-1 transmembrane protein gp41 which interacts with cholesteryl groups. *Biochim. Biophys. Acta*, 1567, 157-164
- von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 909-918
- Walter, P. und Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein, SRP, mediates the selective binding to microsomal

- membranes of *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell. Biol.*, 91, 551-556
- Watanabe, T., Sorensen, E.M., Naito, A., Schott, M., Kim, S. und Ahlquist, P. (2007). Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *PNAS*, 104, 10205-10210
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyanari, Y. und Shimotohno, K. (2005). Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell*, 19, 111-122
- Watson, P. und Stephens, D.J. (2005). ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1744, 304-315
- Weissman, J.T., Plutner, H. und Balch, W.E. (2001). The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export. *Traffic*, 2, 465-475
- Weitzmann, A., Volkmer, J und Zimmermann, R. (2006). The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of S11 function in man and mouse. *FEBS Lett.*, 580, 5237-5240
- Wendeler, M.W., Paccaud, J.P. und Hauri, H.P. (2007). Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.*, 8, 258-264
- Werr, M. und Prange, R. (1998). Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles. *J. Virol.*, 72, 778-782
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Buscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. und Schaller, H. (1987). Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.*, 61, 904-911
- Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.*, 14, 461-469
- Wittke, S., Lewke, N., Müller, S. und Johnsson, N. (1999). Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol. Biol. Cell*, 10, 2519-2530
- Wunderlich, G. und Bruss, V. (1996). Characterization of early hepatitis B virus surface protein oligomers. *Arch. Virol.*, 147, 1191-1205
- Xu, D., Joglekar, A.P., Williams, A.L. und Hay, J.C. (2000). Subunit structure of a mammalian ER/ Golgi SNARE complex. *J. Biol. Chem.*, 275, 39631-39639
- Xu, Z., Jensen, G. und Yen, T.S. (1997). Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.*, 71, 7387-7392
- Yamayoshi, S., Noda, T., Ebihara, H., Goto, H., Morikawa, Y., Lukashevich, I.S., Neumann, G., Feldmann, H. und Kowaoka, Y. (2008). Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host & Microbe*, 3, 168-177
- Zahn, A. und Allain, J.P. (2005). Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. *J. Gen. Virol.*, 86, 677-685
- Zhang, K. und Kaufman, R.J. (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 279, 25935-25938
- Zhang, T., Wong, S.H., Tang, B.L., Xu, Y., Peter, F., Subramaniam, N. und Hong, W. (1997). The mammalian protein (rbet1) homologous to yeast Bet1p is primarily associated with the pre-Golgi intermediate compartment and is involved in vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J.C.B.*, 139, 1157-1168
- Zhang, T. und Hong, W. (2001). Ykt6 forms a SNARE complex with syntaxin 5, GS28, and Bet1 and participates in a late stage in endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J.B.C.*, 276, 27480-27487

- Zhou, S. und Standring, D.N. (1992). Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *PNAS*, 89, 10046-10050
- Zimmermann, R., Müller, L. und Wullich, B. (2006). Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *TRENDS in Molecular Medicine*, 12, 567-573

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung von Hepatitis B - Virionen und subviralen Partikeln.	2
Abbildung 1-2: Aufbau des kleinen S-, mittleren M- und großen L-Hüllproteins von HBV (Subtyp ayw).	4
Abbildung 1-3: Topologie der HBV - Hüllproteine.	6
Abbildung 1-4: Genomorganisation des Hepatitis B - Virus.	7
Abbildung 1-5: Infektionszyklus und Replikation des Hepatitis B - Virus.	9
Abbildung 1-6: Modell der kotranslationalen Translokation in Eukaryoten.	12
Abbildung 1-7: Modell der posttranslationalen Translokation in Eukaryoten.	13
Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des BiP ATPase - Zyklus.	15
Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems.	17
Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Durchführung des Split - Ubiquitin Hefe - Zwei - Hybrid Systems.	44
Abbildung 5-2: Nachweis der Bait - Expression.	46
Abbildung 5-3: Kontroll - Assay zur Bestätigung der Expression sowie der Orientierung der Cub - Domäne.	49
Abbildung 5-4: Schematische Darstellung des vesikulären Transportes zwischen ER und Golgi - Apparat.	54
Abbildung 5-5: Modell des SNARE - Proteins Bet1.	55
Abbildung 5-6: Bet1 zeigt einen positiven beta-Galaktosidase - Test.	55
Abbildung 5-7: Bestätigung der Interaktion von Bet1 und L in <i>S. cerevisiae</i>	56
Abbildung 5-8: Nachweis der Expression und Orientierung in der Membran von Bet1.	58
Abbildung 5-9: Immunfluoreszenzanalyse zur Expression und zellulären Lokalisation von Bet1.FLAG und Myc.Bet1.	59
Abbildung 5-10: Nachweis der Interaktion von Bet1 und L mittels Ko-Immunpräzipitation.	61
Abbildung 5-11: Charakterisierung des Bet1 - Bindungsbereiches innerhalb des L-Hüllproteins.	62
Abbildung 5-12: Freisetzung subviraler Partikel nach Depletion von Bet1.	63
Abbildung 5-13: Depletion von Bet1 und ihre Auswirkung auf die Expression von S und L.	64
Abbildung 5-14: Assembly des CoPII - Coat Komplexes.	65
Abbildung 5-15: Sec24A weist einen positiven beta-Galaktosidase - Test auf.	66
Abbildung 5-16: Bestätigung der Interaktion von Sec24A mit S und L in <i>S. cerevisiae</i>	67
Abbildung 5-17: Nachweis der Expression von FLAG.Sec24A.	68
Abbildung 5-18: Immun-histochemischer Nachweis der Expression und intrazellulären Lokalisation von FLAG.Sec24A.	69
Abbildung 5-19: Nachweis der Interaktion von Sec24A und L mittels Ko-Immunpräzipitation.	70
Abbildung 5-20: FLAG.Sec24A wird mit den drei HBV - Hüllproteinen kopräzipitiert.	71
Abbildung 5-21: Einfluss der Depletion von Sec24 auf die Freisetzung subviraler Partikel.	74
Abbildung 5-22: Kontrolle der Expression und subzellulären Lokalisation der bicistronischen Expressionskonstrukte.	78
Abbildung 5-23: Die ektopische Expression von L oder BiP beeinflusst die endogene BiP - Konzentration nicht.	79

Abbildung 5-24: Die ektopische Expression von BAP destabilisiert die Bindung von L und BiP.	80
Abbildung 5-25: Die ektopische Expression von BAP oder ERdj4 inhibiert die posttranslationale Translokation der PräS-Region.	82
Abbildung 5-26: Depletion von ATP verhindert die posttranslationale Translokation der PräS-Region.	84
Abbildung 5-27: Nachweis der Expression von Myc.Sec62 und Myc.Sec63.	86
Abbildung 5-28: Einfluss von Sec62 und Sec63 auf die duale Topologie des L-Hüllproteins.	87
Abbildung 5-29: Die ektopische Expression von Myc.Sec63 reduziert die Freisetzung L-haltiger SVP.	88
Abbildung 5-30: Auswirkung der ektopischen Expression von Myc.Sec62/ Sec63 auf die Expression von S und L.	89
Abbildung 5-31: Die Depletion von Sec63 führt zu einer Reduktion der Freisetzung von L-Partikeln.	90
Abbildung 5-32: Einfluss der Depletion von Sec62 und Sec63 auf die Expression des L-Hüllproteins.	91
Abbildung 6-1: Modell der posttranslationalen Translokation der PräS-Region.	109

Publikationen

Awe, K., Lambert, C., and Prange, R. (2008). Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett.* 582, 3179-3184

Kongressbeiträge

Awe, K., Lambert, C. und Prange, R. (2009)

Poster "Posttranslational translocation of the hepatitis B virus large envelope protein is affected by Sec62 and Sec63" Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2009, Leipzig

Dötsch, A., Awe, K., Lambert, C. und Prange, R. (2008)

Poster „Interactions of HBV with the host cell cytoskeleton“

Workshop "Cell Biology of Viral Infection" der Gesellschaft für Virologie, Deidesheim

Awe, K., Lambert, C. und Prange, R. (2008)

Poster „The ER chaperone BiP is functionally involved in posttranslational preS translocation of the HBV large envelope protein“

Jahrestagung der Gesellschaft für Zellbiologie 2008, Marburg

Jaschinski, K., Lambert, C. und Prange, R. (2007)

Vortrag „The ER chaperone BiP is functionally involved in the formation of the dual topology of the HBV large envelope protein“

Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Rom

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Karin Awe, gemäß Paragraph 11 Absatz 3d der Promotionsordnung vom 28.09.2004, dass ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben habe.

Mainz, den _____

Karin Awe

Danksagung