

**Funktionsanalyse von  $\gamma$ 2-Adaptin:  
Ein zellulärer Adaptor der Hepatitis B-Virus-  
Morphogenese**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

**Martina Rost**  
geboren am 7.5.1979 in Hanau

Mainz, Oktober 2008

---

---

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Die Morphogenese von Viren	1
1.2	Das Hepatitis B-Virus	2
1.2.1	Das Hepatitis B-Virus – ein Überblick	2
1.2.2	Aufbau und Struktur von HBV	5
1.2.3	Infektionszyklus von HBV	6
1.2.4	Die HBV-Hüllproteine	8
1.2.5	Das HBV-Kapsid	10
1.2.6	Die Umhüllung der HBV-Kapside	11
1.3	Die Rolle zellulärer Faktoren bei der Morphogenese umhüllter Viren	11
1.3.1	Multivesikuläre Endosomen und die Entstehung intraluminarer Vesikel	12
1.3.2	Die Rolle von Nedd4 und Ubiquitin bei der Morphogenese umhüllter Viren	15
1.4	Virus-Wirt-Interaktionen bei der Morphogenese von HBV	16
1.4.1	Die Rolle der Ubiquitin-Ligase Nedd4 bei der HBV-Morphogenese	16
1.4.2	$\gamma$ 2-Adaptin und seine Funktion bei der Morphogenese von HBV	17
1.5	Ziel der Arbeit	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>21</b>
2.1	Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien	21
2.2	Puffer und Lösungen	21
2.3	Medien und Medienzusätze	21
2.4	Reagenzien und Kits	22
2.5	DNA- und Proteinmarker	22
2.6	Enzyme	23
2.7	Oligonukleotide und siRNA	23
2.8	Plasmide	25
2.9	Antikörper und Antiseren	27
2.10	Bakterienstämme	28
2.11	Zelllinien	29
2.12	Software	29
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>30</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden	31
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.1.2	Ortspezifische Mutagenese	31
3.1.3	DNA-Sequenzierung	32
3.2	Zellbiologische Methoden	33
3.2.1	Kultivierung von Zellen	33
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
3.2.3	Transfektion von Plasmid-DNA	34
3.2.4	Transfektion von siRNA	34

<b>3.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>35</b>
3.3.1	Herstellung von Zellextrakten	35
3.3.2	Immunpräzipitation (IP)	36
3.3.3	<i>Pulldown</i> -Assay mittels Ubiquitin-Agarose	40
3.3.4	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	41
3.3.5	<i>Pulldown</i> -Assay für GST-Fusionsproteine	41
3.3.6	Assay zur Analyse der Membranassoziation von Proteinen	42
3.3.7	Aufreinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum	43
3.3.8	Immunfluoreszenzfärbung	44
3.3.9	EGF-Assay	45
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen zur Verknüpfung von <math>\gamma</math>2-Adaptin und Ubiquitin</b>	<b>46</b>
4.1.1	Analyse der Primärsequenz von $\gamma$ 2-Adaptin	46
4.1.2	$\gamma$ 2-Adaptin interagiert über ein UIM mit Ubiquitin	47
4.1.3	UIM-abhängige Ubiquitinierung von $\gamma$ 2-Adaptin	48
4.1.4	$\gamma$ 2-Adaptin interagiert mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 in UIM-abhängiger Reaktion	50
4.1.5	Lokalisation der Nedd4-Interaktionsregion in $\gamma$ 2-Adaptin	51
4.1.6	Nedd4 interagiert unabhängig von seiner katalytischen Aktivität und der HECT-Domäne mit $\gamma$ 2-Adaptin	53
4.1.7	Die Interaktion mit $\gamma$ 2-Adaptin erfolgt über die C2-Domäne von Nedd4	55
4.1.8	Immunfluoreszenzanalyse zur Lokalisation von $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4	56
4.1.9	Die C2-Domäne von Nedd4 ist ubiquitiniert	57
4.1.10	Die Ubiquitinierung der C2-Domäne ist für die Interaktion mit $\gamma$ 2-Adaptin essentiell	59
4.1.11	Nedd4 katalysiert die Ubiquitinierung von $\gamma$ 2-Adaptin	60
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von <math>\gamma</math>2-Adaptin</b>	<b>63</b>
4.2.1	Analyse zur Membranassoziation von $\gamma$ 2-Adaptin	63
4.2.2	Analysen zur Koloalisation von $\gamma$ 2-Adaptin mit zellulären Markern	65
<b>4.3</b>	<b>Analysen zur zellulären Funktion von <math>\gamma</math>2-Adaptin</b>	<b>68</b>
4.3.1	$\gamma$ 2-Adaptin beeinflusst die Morphologie von Multivesikulären Endosomen	68
4.3.2	$\gamma$ 2-Adaptin beeinflusst den Abbau des Wachstumsfaktors EGF	69
4.3.3	Einfluss von $\gamma$ 2-Adaptin auf den Transport von EGF zu den MVBs	71
4.3.4	Die Rolle von Clathrin bei der Funktion von $\gamma$ 2-Adaptin	72
<b>4.4</b>	<b>Analysen zur Bedeutung des UIMs von <math>\gamma</math>2-Adaptin und der MVBs für die Morphogenese von HBV</b>	<b>75</b>
4.4.1	Das UIM von $\gamma$ 2-Adaptin hat keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem L-Protein	75
4.4.2	Das UIM von $\gamma$ 2-Adaptin beeinflusst die Interaktion mit Core	76
4.4.3	HBV-Core koloalisiert mit MVBs	78
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>101</b>



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Morphogenese von Viren

Viren werden häufig als obligate intrazelluläre Parasiten definiert, die ein eigenes Genom besitzen, für ihre Replikation jedoch auf Komponenten der Wirtszelle angewiesen sind (Pe'ery & Mathews, 2007). In den Virionen liegt das Genom als DNA oder RNA vor und kodiert Strukturproteine für die Verpackung, sowie regulatorische Proteine und Enzyme für die Vervielfältigung und die Translation der Erbinformation. Das Genom wird im Viruspartikel durch eine Hülle aus Strukturproteinen geschützt, dem Kapsid bzw. Nukleokapsid. Bei einigen Viren, z.B. Picorna- oder Papillomaviren, stellt das Nukleokapsid die gesamte Virusstruktur dar, weshalb diese auch als nicht-umhüllte oder nackte Viren bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu wird das Nukleokapsid bei umhüllten Viren, z.B. Retro-, Hepadna- oder Herpesviren, von einer zusätzlichen Membranhülle umschlossen, die sich von zellulären Membransystemen ableitet und in die virale Hüllproteine eingelagert sind (Modrow & Falke, 2002; Hof, 2002). Der Vermehrungszyklus von Viren lässt sich generell in verschiedene Phasen der Replikation unterteilen. Dabei kommt es durch die Bindung an Rezeptormoleküle der Plasmamembran zunächst zur Anlagerung der Virionen an die Wirtszelle (Adsorption) und anschließend zur Aufnahme der gebundenen Viruspartikel in das Innere der Zelle (Penetration). Hier wird das virale Genom freigesetzt (*Uncoating*) und es kommt zur Vermehrung der Viruskomponenten. Diese Vermehrung beinhaltet die Replikation des Virusgenoms, die Expression der viralen Proteine sowie schließlich die Morphogenese neuer Viruspartikel, die aus der Zelle freigesetzt werden (Modrow & Falke, 2002). Bei der Morphogenese, d.h. dem Zusammenbau der Viruspartikel, werden zunächst das Genom und gegebenenfalls weitere virale Proteine in die Kapsidhülle verpackt, wobei vorwiegend kurze Nukleinsäuresequenzen als Verpackungssignal dienen (Hof, 2002). Die Reifung der meisten nackten Viren ist mit der Bildung der Nukleokapside abgeschlossen und es kommt zur Freisetzung der Virionen, indem die Lyse der Wirtszelle induziert wird. Im Gegensatz dazu durchlaufen umhüllte Viren einen zusätzlichen Knospungsprozess (*budding*) an zellulären Membranen, bei dem das Nukleokapsid von der Virushülle umschlossen wird. Die Abschnürung ist hierbei vom Zytoplasma weg, in extrazytoplasmatische Bereiche der Zelle gerichtet. Erfolgt dies an der Plasmamembran, so werden die Viren direkt aus der Zelle freigesetzt, während die Virionen an intrazellulären Membranen in das Lumen der jeweiligen Kompartimente abgegeben werden. Von dort müssen sie aus der Zelle sezerniert werden, was durch die Exozytose Virus-gefüllter Vesikel oder auch durch die Fusion des vollständigen Kompartiments mit der Plasmamembran erfolgen kann. Bei der Ausschleusung umhüllter Viren kommt es somit nicht zur Lyse der Wirtszelle, so dass diese intakt bleibt und

eine fortlaufende Virusproduktion möglich ist (Welsch *et al.*, 2007; Harrisson, 2007; Hof, 2002).

Generell enthält das Virusgenom alle notwendigen Informationen, um den vollständigen Ablauf des Replikationszyklus zu gewährleisten. Allerdings ist die Kapazität des Genoms begrenzt, so dass meist nur eine limitierte Anzahl von Proteinen kodiert wird und damit nur einige der tatsächlich benötigten Komponenten zur Verfügung gestellt werden können. Viren sind somit auf verschiedene Faktoren und Mechanismen der Wirtszelle angewiesen und haben daher zahlreiche effektive Strategien entwickelt, um diese für ihre eigene Replikation zu rekrutieren und zu benutzen (Harrisson, 2007; Pe'ery & Mathews, 2007). So nutzen sie beispielsweise Transportmechanismen der Wirtszelle, um die viralen Komponenten an den Ort der Virusmorphogenese zu bringen, indem sie zelluläre Transportsignale imitieren. Speziell bei umhüllten Viren muss hierbei nicht nur das Kapsid gebildet werden, sondern dieses muss zudem in Kontakt mit den viralen Membranproteinen treten und in einem Umhüllungs- und Abschnürungsprozess davon umschlossen werden (Hunter, 2007). Lange Zeit wurde angenommen, dass die eigentliche Knospung der Viruspartikel allein durch die viralen Strukturen vermittelt wird. Allerdings konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass speziell dieser Vorgang von verschiedenen Zellfaktoren abhängig ist, deren physiologische Funktion unter anderem die Bildung interner Vesikel an den Multivesikulären Endosomen (MVBs) ist (Welsch *et al.*, 2007). Aufgrund der besonderen Bedeutung für diese Arbeit wird dieser Prozess in Kapitel 1.3 genauer dargestellt. Ein Großteil der Erkenntnisse zur Entstehung intraluminaler MVB-Vesikel resultiert aus der Erforschung der Morphogenese von Viren. Dies ist somit ein Beispiel dafür, wie viruspezifische Beobachtungen zur Aufklärung allgemeiner zellbiologischer Prozesse beitragen können.

In dieser Arbeit steht die Morphogenese des Hepatitis B-Virus (HBV) im Vordergrund, wobei speziell die hieran beteiligten Faktoren der Wirtszelle von Interesse sind. Es handelt sich hierbei um ein umhülltes Virus, über dessen Sprossung bislang nur sehr wenig bekannt ist. Da HBV jedoch extrem klein und einfach strukturiert ist, muss davon ausgegangen werden, dass es auf zelluläre Faktoren und Mechanismen angewiesen ist. Das generelle Ziel ist ein besseres Verständnis des Replikationszyklus von HBV und damit auch der Virus-Wirt-Interaktionen bei HBV-Infektionen, um langfristig neue Angriffspunkte für eine effektive, antivirale Therapie zu erhalten.

## 1.2 Das Hepatitis B-Virus

## 1.3 Das Hepatitis B-Virus – ein Überblick

Das Hepatitis B-Virus (HBV) ist ein umhülltes Virus, das zur Familie der *Hepadnaviridae* gehört. Diese Bezeichnung weist bereits auf zwei charakteristische Eigenschaften dieser Viren hin, die sich durch eine hohe Leberspezifität („*hepar*“, lat. Leber) auszeichnen und ein

zirkuläres, partiell-doppelsträngiges DNA-Genom besitzen. Man unterscheidet dabei zwei Unterfamilien, nämlich die bei Säugetieren vorkommenden „echten“ Hepadnaviren (*Orthohepadnaviridae*), zu denen auch das humane HBV gehört, sowie die bei Vögeln auftretenden *Avihepadnaviridae*.

HBV kommt vor allem im Blut, aber auch anderen Körperflüssigkeiten infizierter Personen vor und kann bei direktem Kontakt über kleinste Verletzungen von Haut oder Schleimhaut in den Körper gelangen. Neben dem unmittelbaren Umgang mit infektiösem Material gehören vor allem Sexualkontakte, aber auch die perinatale Weitergabe der Erreger von der Mutter zum Kind zu den häufigsten Übertragungswegen. Die Infektion mit HBV nimmt dabei zu 90% einen akuten Verlauf, wobei dieser entweder asymptomatisch erfolgt oder zu einer Leberentzündung (Hepatitis) führt, die meist nach einigen Wochen ausheilt. Nur selten ist ein lebensbedrohlicher Verlauf in Form einer fulminanten Hepatitis zu beobachten. In etwa 5-10% der Fälle kommt es zu einer chronischen HBV-Infektion. Neben einem asymptomatischen Verlauf kann es hierbei zu einer chronischen Leberentzündung kommen, deren Spätfolgen häufig Leberzirrhose oder Leberzellkarzinome sind. Bis zu 25% der chronisch Erkrankten sterben dabei an diesen Folgeschäden.

Obwohl bereits seit 1975 eine effiziente Impfung gegen HBV möglich ist, gehört die Hepatitis B nach wie vor zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Nach aktuellen Angaben der *World Health Organization* (WHO) zeigen derzeit zwei Milliarden Menschen und damit ein Drittel der Weltbevölkerung Anzeichen einer vorhandenen oder abgeheilten HBV-Infektion, von denen etwa 360 Millionen chronisch infiziert sind. HBV stellt somit ein weltweit ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar, vor allem da eine Therapie bislang nur eingeschränkt möglich ist. Bei akuten HBV-Infektionen können derzeit lediglich die Symptome behandelt werden. Chronische HBV-Infektionen hingegen werden durch Interferon- $\alpha$  behandelt und ähnlich wie HIV-Infektionen durch verschiedene Nukleosid-Analoga therapiert, welche die Genom-Replikation blockieren und damit eine Ausbreitung der Infektion verhindern. Eine Heilung ist bislang nicht möglich.

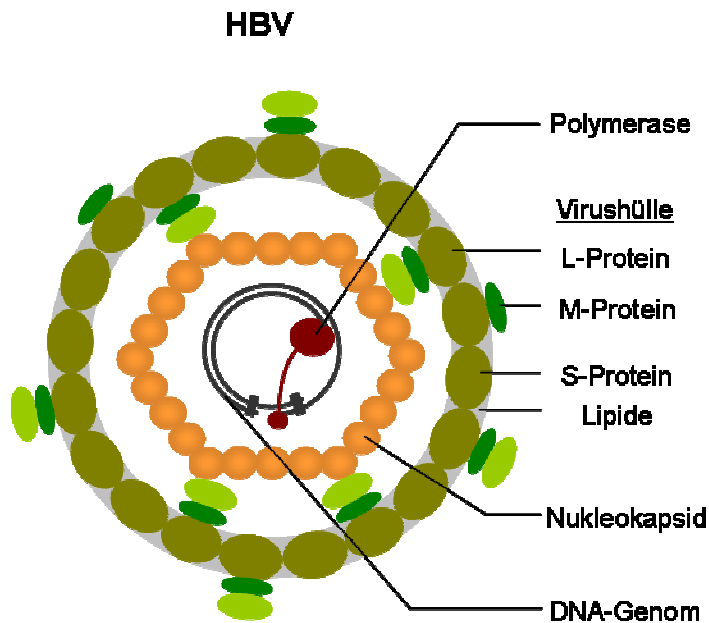
### 1.3.1 Aufbau und Struktur von HBV

HBV-infizierte Zellen produzieren verschiedene Formen von Viruspartikeln, so dass neben den infektiösen Virionen mit einem Durchmesser von 42 nm, auch kleinere, nicht-infektiöse Formen, die so genannten subviralen Partikel (SVP), gebildet werden.

#### **HBV-Partikel**

Die sphärischen Hepatitis B-Virionen bestehen aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid, welches von einer äußeren Virushülle umgeben wird. Innerhalb des Nukleokapsids befindet sich das HBV-Genom, das als zirkuläre, partiell-doppelsträngige DNA vorliegt (Robinson, 1977), sowie die daran gebundene virale Polymerase (Kaplan *et al.*, 1973). Zudem sind zelluläre Faktoren enthalten, bei denen es sich um eine Proteinkinase C (PKC; Schlicht &

Schaller, 1989) sowie das Chaperon Hsp90 handelt (Hu *et al.*, 1997). Das Nukleokapsid selbst hat einen Durchmesser von 34 nm und wird aus dem Core-Protein gebildet (Tiollais *et al.*, 1985), von dem sich 240 Moleküle zusammenlagern und das virale Genom und die assoziierten Komponenten umschließen (Bruss, 2004). Die lipidhaltige Virushülle beinhaltet drei virale Transmembranproteine, die entsprechend ihrer Größe als kleines (*small*) S-, mittleres (*middle*) M- und großes (*large*) L-Hüllprotein bezeichnet werden.

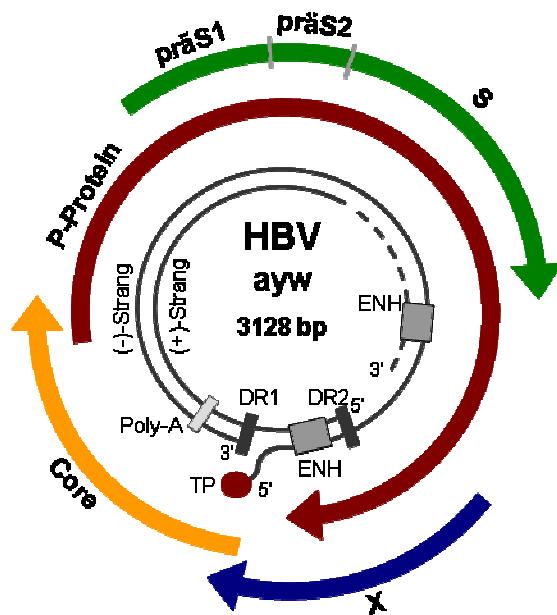


**Abb. 1-1 Schematischer Aufbau von HBV.** Hepatitis B-Viren werden von einer Membranhülle umgeben, welche die drei viralen Hüllproteine S, M und L beinhaltet. Sie umschließt das ikosaedrische Nukleokapsid. Dieses setzt sich aus dem Core-Protein zusammen und beinhaltet das partiell-doppelsträngige DNA-Genom sowie die damit assoziierte virale Polymerase, die auch als P-Protein bezeichnet wird.

### Das HBV-Genom

Das HBV-Genom gehört mit lediglich 3,2 kb zu den kleinsten bekannten Virusgenomen (Galibert *et al.*, 1979) und zeigt einen sehr charakteristischen Aufbau (Abb. 1-2). So liegt die zirkuläre DNA nur teilweise doppelsträngig vor und besteht aus einem vollständigen, kodierenden Minus(-)-Strang sowie dem komplementären, unvollständigen Plus(+)-Strang, der variabel nur aus 1700-2800 Nukleotiden besteht. Da der (-)-Strang dabei nicht kovalent geschlossen ist, wird die Zirkularisierung des Genoms durch Basenpaarungen der komplementären 5'-Enden erreicht (Sattler & Robinson, 1979). Beide 5'-Enden sind zudem durch repetitive Sequenzen von 11 Nukleotiden gekennzeichnet, die auch als *Direct Repeat* (DR) bezeichnet werden und eine Rolle bei der DNA-Replikation spielen (Will *et al.* 1987). Nur der (-)-Strang ist am 5'-Ende kovalent mit der viralen Polymerase verbunden. (Gerlich &

Robinson, 1980). Dieses multifunktionelle P-Protein besteht aus vier Domänen: der N-terminalen Proteindomäne (TP), welche die Primerfunktion bei der späteren (-)-Strangsynthese übernimmt, einer Spacerregion (SP), der reversen Transkriptase (RT), die zudem auch als DNA-abhängige Polymerase fungiert, und der C-terminalen Ribonuklease H (RNaseH) (Beck & Nassal, 2007).



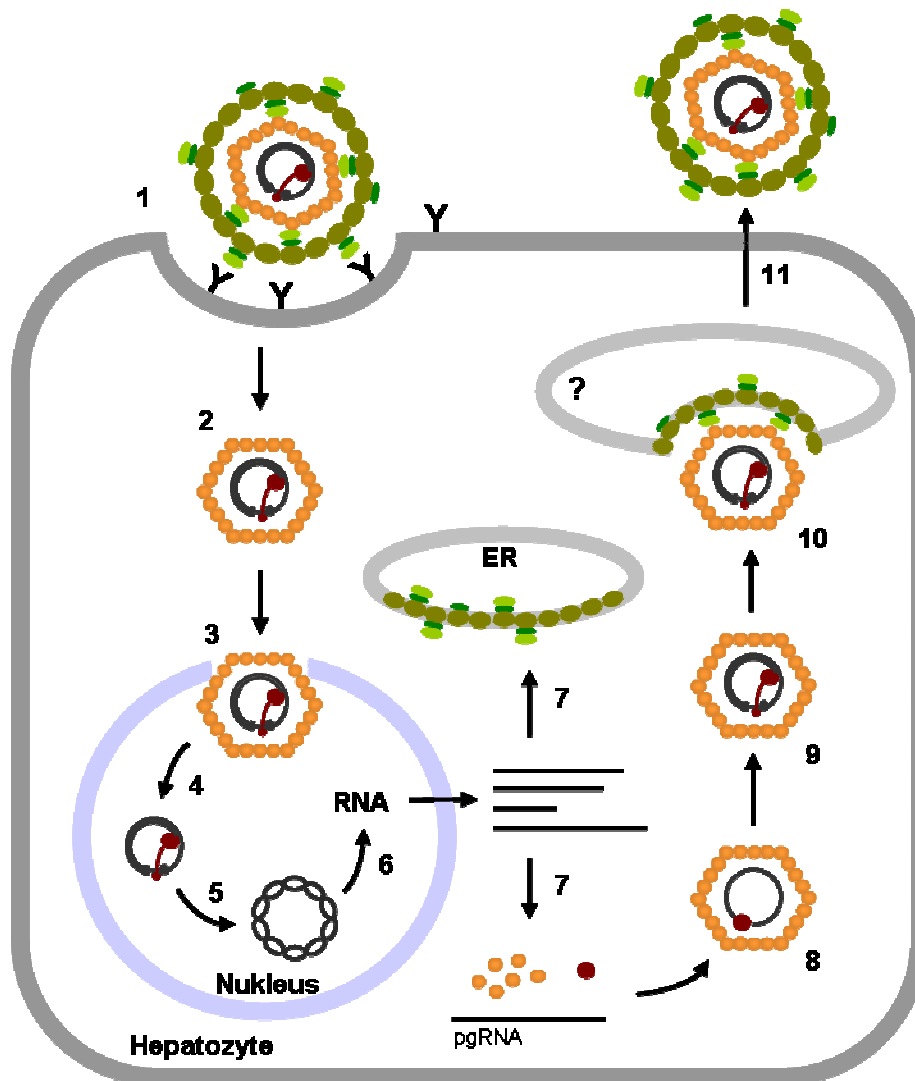
**Abb. 1-2 Die Organisation des HBV-Genoms.** HBV besitzt ein partiell-doppelsträngiges DNA-Genom. Dieses setzt sich aus einem vollständigen (-)-Strang und einem unvollständigen (+)-Strang zusammen. Die terminale Domäne (TP) des P-Proteins ist mit dem 5'-Ende des Minusstrangs assoziiert. Die offenen Leseraster, welche die viralen Proteine kodieren, sind durch farbige Pfeile markiert. Dabei wird ein einziges Poly-A-Signal bei der Generierung der viralen m-RNAs genutzt. Die grauen Kästen stellen die regulatorischen Enhancer-Elemente (ENH) und Sequenzwiederholungen (DR) dar.

Neben der geringen Genomgröße von HBV ist die komplexe Organisation des Genoms auffallend. So sind die viralen Proteine in nur vier offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF) kodiert, welche teilweise überlappend angeordnet sind (Ganem & Varmus, 1987) und hier als ORF/Gen C, Env, P und X bezeichnet werden. Sie kodieren für das Kapsidprotein Core, die drei Hüllproteine S, M und L, das P-Protein und das regulatorische X-Protein. Die Transkription und Translation erfolgt durch Faktoren der Wirtszelle, wie beispielsweise der RNA-Polymerase II (Beck & Nassal, 2007). Das Genom enthält für diese Prozesse ein Polyadenylierungssignal, das von allen viralen RNAs genutzt wird, sowie vier virale Promotoren und zwei Enhancer-Elemente (ENH), welche die transkriptionelle Aktivität regulieren (Schaller & Fischer, 1991).

### 1.3.2 Infektionszyklus von HBV

Der Replikationszyklus von Hepatitis B-Viren (Abb. 1-3) beginnt mit der spezifischen Infektion von Hepatozyten. Dabei sind die frühen Schritte der Virusaufnahme bislang noch weitgehend unverstanden. Generell kommt es bei den meisten Virusinfektionen zunächst zur reversiblen Anlagerung an einen primären Rezeptor auf der Zelloberfläche. In einem zweiten Schritt folgt die Bindung an einen zweiten, spezifischen Rezeptor, durch den die Virusaufnahme vermittelt wird. Umhüllte Viren fusionieren dabei mit der Plasmamembran oder werden endozytiert und gelangen durch die Fusion mit intrazellulären Membranen ins Zytoplasma (Glebe & Urban, 2007). Für das humane HBV konnte der für den Eintritt in die Zelle entscheidende Rezeptor noch nicht identifiziert werden. Aufgrund der Gewebsspezifität von HBV handelt es sich aber vermutlich um ein leberspezifisches Molekül. Belegt ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass die präS1-Domäne des großen HBV-Hüllproteins für den Kontakt zur Leberzelle und damit für die Infektiosität essentiell ist (Le Seyec *et al.*, 1999). Neue Erkenntnisse zur Virusaufnahme sind zu erwarten, da mittlerweile effektive *In vitro*-Infektionssysteme etabliert werden konnten, die lange Zeit fehlten (Glebe & Urban, 2007).

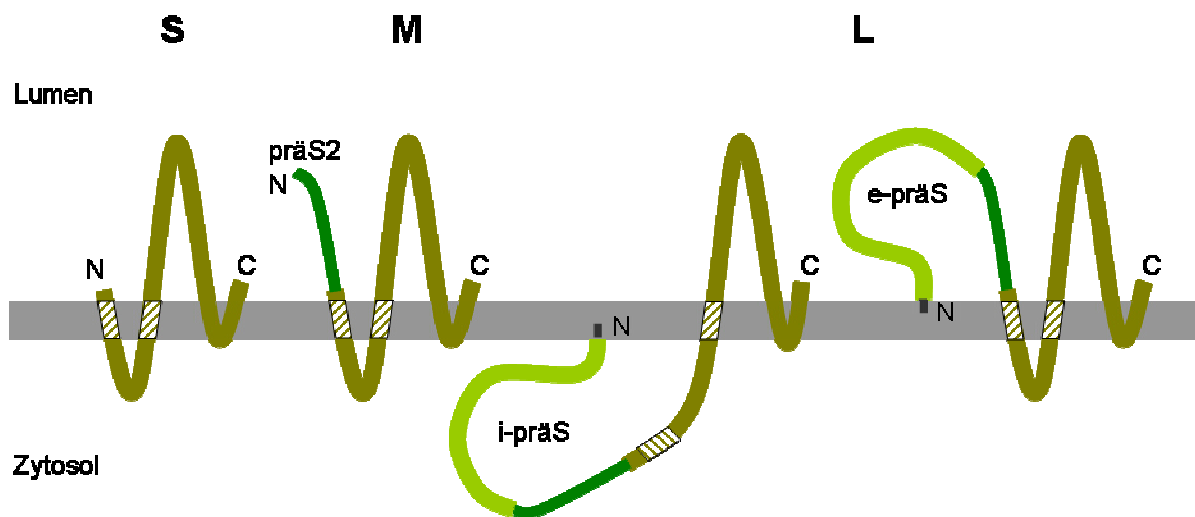
Nach der Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle wird es zum Zellkern transportiert. Das Kapsid assoziiert hier vermutlich über ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) innerhalb des Core-Proteins mit der Kernpore und wird unter der Beteiligung von Importin  $\alpha$  und  $\beta$  in das Kernlumen transportiert. Dort zerfällt das Kapsid und das HBV-Genom wird freigesetzt (Rabe *et al.*, 2003; Kann *et al.*, 2007). Die partiell-doppelsträngige DNA wird durch Wirtsfaktoren vervollständigt, so dass ein kovalent-geschlossenes, ringförmiges DNA-Molekül (*covalently closed circular DNA*, cccDNA) entsteht (Koeck & Schlicht, 1993). Dieses dient als Matrize für die Transkription der viralen mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Die Translation der Virusproteine erfolgt anschließend im Zytoplasma bzw. an der ER-Membran. Eine Besonderheit von HBV ist, dass neben den mRNAs auch eine sogenannte prägenomische RNA (pgRNA) synthetisiert wird. Diese dient der Replikation der viralen DNA. Die pgRNA wird im Zytoplasma gemeinsam mit der viralen Polymerase von Core-Proteinen umschlossen, wodurch „unreife“ Kapside entstehen. Ihre Reifung zu fertigen Nukleokapsiden erfolgt durch reverse Transkription der pgRNA zur partiell-doppelsträngigen DNA durch die virale Polymerase (Beck & Nassal, 2007). Nukleokapside können anschließend erneut an die Kernporen binden und das virale Genom in den Zellkern transportieren, oder sie dienen der Bildung neuer Virionen. Hierbei werden die reifen Nukleokapside an intrazellulären Membranen von den viralen Hüllproteinen verpackt und die HBV-Partikel anschließend aus der Zelle freigesetzt (Bruss, 2004).



**Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HBV.** Die Aufnahme von HBV in Leberzellen erfolgt durch eine rezeptor-vermittelte Endozytose (1). In der Wirtszelle gelangt das Nukleokapsid daraufhin in das Zytoplasma (2) und wandert zum Zellkern, wo es mit der Kernpore interagiert und in den Zellkern transportiert wird (3). Hier wird das virale Genom freigesetzt (4) und vervollständigt, wodurch das geschlossene doppelsträngige DNA-Genom (cccDNA) entsteht (5). Dieses dient als Matrize für die Transkription der viralen mRNAs und der prägenomischen RNA, die den Zellkern verlassen (6). Die anschließende Translation der Virusproteine erfolgt im Zytoplasma bzw. an den Membranen des ER im Fall der Hüllproteine (7). Das Prägenom und die Polymerase werden von Core umschlossen, wodurch „unreife“ Kapside entstehen (8). Innerhalb der Kapside wird durch reverse Transkription die partiell-doppelsträngige Virus-DNA synthetisiert (9). Die „reifen“ Nukleokapside können entweder erneut in den Zellkern transportiert werden oder sie werden von der Virushülle umschlossen (10) und aus der Zelle ausgeschleust (11).

### 1.3.3 Die HBV-Hüllproteine

HBV besitzt drei Hüllproteine, die von einem einzigen ORF kodiert werden. Davon ausgehend werden durch zwei verschiedene Promotoren und unterschiedliche Startpunkte für die Translation die drei Membranproteine synthetisiert. Diese werden nach ihrer Größe als S-, M- und L-Protein bezeichnet. Alle Hüllproteine sind dabei koterminale, d.h. sie tragen den gleichen C-Terminus, der aus der 226 AS umfassenden S-Domäne gebildet wird. Diese entspricht gleichzeitig dem kleinen S-Protein. Das M-Protein trägt N-terminal eine Verlängerung von 55 AS, die als präS2-Domäne bezeichnet wird. Nur im L-Protein schließt sich der präS2-Domäne je nach Subtyp noch eine zusätzliche N-terminale Extension von 108 bzw. 119 AS an, die sogenannte präS1-Domäne. Beide Domänen zusammen werden auch als präS-Region bezeichnet (Heermann *et al.*, 1984).



**Abb. 1-4 Die Transmembran-Topologie der HBV-Hüllproteine.** Die Einlagerung des S-Proteins in die ER-Membran wird durch eine N-terminale und eine interne Signalsequenz vermittelt, welche schraffiert dargestellt sind. Der C-terminale Teil des S-Proteins ist hydrophob und wird dadurch ebenfalls in die Membran eingebettet. Der zentrale Proteinbereich bildet dadurch eine luminal Schleife. Das M-Protein zeigt die gleiche Topologie wie das S-Protein, wobei die präS2-Domäne im ER-Lumen lokalisiert ist. Das L-Protein weist eine duale Topologie auf. In der i-präS-Form befindet sich dabei die präS-Domäne, bestehend aus präS1 und präS2, im Zytosol. Die e-präS-Form entsteht durch eine posttranslationale Translokation, bei der die präS-Domäne auf die luminal Seite der Membran überführt wird. Durch eine Myristylierung am N-Terminus der präS1-Domäne wird diese vermutlich in der ER-Membran verankert.

Die Synthese der Hüllproteine erfolgt wie bei allen Membranproteinen am ER. Die Translokation und Insertion des S-Proteins in die Membran wird durch zwei hydrophobe Signalsequenzen vermittelt. Das N-terminale Signal I (AS 8-22) inseriert dabei in die ER-Membran, wodurch der darauf folgende Peptidbereich zytosolisch orientiert ist. Das zweite,



interne Signal II (AS80-98) wird ebenfalls als Transmembrandomäne in der Membran verankert und führt dabei zur Translokation des C-terminalen Proteinteils in das Lumen des ER. Da auch die letzten 57 AS des C-Terminus einen hydrophoben Charakter zeigen, werden diese ebenfalls in die ER-Membran eingebettet, so dass der Bereich zwischen AS 99 und 169 eine Schleife im ER-Lumen bildet. Diese Domäne befindet sich im fertigen HBV-Partikel auf der Virusoberfläche (Eble *et al.*, 1987). Die S-Domäne besitzt eine N-Glykosylierungsstelle an der AS Asparagin (Asn) 146, wodurch alle Hüllproteine hier teilweise modifiziert werden (Peterson *et al.*, 1982). Das M-Protein zeigt die gleiche Orientierung wie das S-Protein, wobei die präS2-Domäne durch die Funktion der ersten Signalsequenz im ER-Lumen lokalisiert ist (Eble *et al.*, 1990). Diese wird durch eine N-Glykosylierung an Asn-4 modifiziert.

Eine besondere Membrantopologie findet sich bei dem L-Protein, dessen präS1- und präS2-Domänen sowohl auf der zytosolischen als auch auf der luminalen Seite der ER-Membran lokalisiert sein können. Man spricht dabei von der dualen Topologie des L-Proteins (Bruss *et al.*, 1994; Prange & Streeck, 1995). Bei der Synthese des L-Proteins wird die Signalsequenz I in der S-Domäne nicht in die ER-Membran inseriert, so dass erst das Signal II zur Verankerung des Proteins in der Membran führt. Dadurch verbleiben die N-terminalen Domänen präS1 und präS2 im Zytosol, während der C-Terminus, wie bei den Proteinen S und M, eine Schleife im ER-Lumen bildet. Diese Konformation wird auch als i-präS Form bezeichnet. Bei etwa 50% der L-Moleküle ändert sich die Topologie des synthetisierten Proteins posttranslational, indem die präS-Domäne auf die luminalen Seite der ER-Membran überführt wird, wobei man von der e-präS Form spricht. Diese Konformation wird erreicht, indem das Signal I, ebenso wie bei den S- und M-Proteinen, in die Membran inseriert. Wie genau der Prozess der posttranslationalen Translokation abläuft, ist allerdings unklar. Gezeigt werden konnte bisher, dass die zellulären Chaperone Hsc70 und Bip eine wichtige Rolle bei der Translokation spielen (Lambert & Prange, 2003) und dass dieser Vorgang unabhängig von den anderen Hüllproteinen abläuft (Lambert & Prange, 2001). Bei beiden Formen ist das L-Protein durch eine Myristylierung an der AS Glycin 2 modifiziert, welche möglicherweise zu einer Verankerung des N-Terminus in der Membran führt und für den Infektionsprozess von Bedeutung ist (Persing *et al.*, 1987; Bruss *et al.*, 1996).

Beide Konformationen des L-Proteins besitzen spezifische Funktionen. So befindet sich die e-präS-Domäne von L auf der Oberfläche der Viruspartikel und ist dort an der Bindung des zellulären Rezeptors bei der Infektion beteiligt (Urban & Gripon, 2002; Gripon *et al.*, 2005). Die i-präS Form dagegen spielt eine entscheidende Rolle bei der Morphogenese von HBV in der Zelle. Hierbei ist die präS-Domäne an der Interaktion der Virushülle mit dem Nukleokapsid und schließlich an dessen Umhüllung beteiligt. Insbesondere zwei kurze Sequenzbereiche innerhalb der präS1-Domäne (AS 92-108) und der präS2-Region (AS 1-5) sind dabei für die Kapsidumhüllung wichtig (Bruss, 1997; Le Seyec *et al.*, 1998). Auch konnte gezeigt werden, dass die präS1-Domäne mit dem zellulären Adaptorprotein  $\gamma$ 2-Adaptin interagiert, welches vermutlich an der Virusbildung beteiligt ist (Hartmann-Stuhler & Prange,

2001). Aufgrund der besonderen Bedeutung für die vorliegende Arbeit wird dieses Adaptorprotein in Kapitel 1.4.2 genauer vorgestellt.

Neben dem L-Protein ist auch das S-Protein für die Virusmorphogenese essentiell. Dabei stellt es die Hauptkomponente der HBV-Hülle dar und beeinflusst direkt den Prozess der Virusumhüllung (Loffler-Mary *et al.*, 2000). Das M-Protein wird für die Morphogenese der HBV-Partikel nicht benötigt (Fernholz *et al.*, 1991). Seine Funktion im Lebenszyklus von HBV ist bislang unklar.

### 1.3.4 Das HBV-Kapsid

Das ikosaedrische Nukleokapsid entsteht im Zytoplasma der infizierten Zelle und beinhaltet das HBV-Genom sowie das damit assoziierte P-Protein und verschiedene zelluläre Proteine. Das Kapsid wird aus dem Core-Protein gebildet, welches je nach Genotyp aus 183 oder 185 AS besteht. Die Core-Proteine lagern sich, verbunden durch Disulfidbrücken, zunächst zu Homodimeren zusammen. Diese werden anschließend durch relativ schwache Interaktionen der Core-Dimere zum Kapsid zusammengefügt. Die N-terminale Domäne des Core-Proteins bildet dabei die *assembly*-Domäne, welche ausreicht, um Kapside zu formen. Die letzten 34 AS am C-Terminus spielen hingegen keine Rolle bei der Kapsidbildung, sondern dienen der Verpackung des HBV-Genoms (Bruss, 2007). In HBV-infizierten Zellen kommen zwei verschiedene Formen vor, die sich in Zusammensetzung und Größe unterscheiden (Crowther *et al.* 1994). Die kleineren Partikel bestehen aus 90 Core-Dimeren und besitzen einen Durchmesser von 30 nm. Größere Kapside mit einem Durchmesser von 34 nm setzen sich aus 120 Core-Dimeren zusammen. Nur diese Form konnte bislang in infektiösen Virionen nachgewiesen werden (Roseman *et al.*, 2005).

Während der Reifung der Nukleokapside wird die verpackte, prägenomische RNA durch das P-Protein in die partiell-doppelsträngige DNA umgewandelt. In freigesetzten Virionen konnten bislang nur Nukleokapside gefunden werden, in denen dieser Prozess vollständig abgeschlossen ist (Mason *et al.*, 1982). Man geht daher davon aus, dass die DNA-Synthese eine strukturelle Veränderung der Kapside bewirkt, wodurch deren Umhüllung ermöglicht wird (Summers & Mason, 1982). Dadurch wird sichergestellt, dass nur Replikationskompetente Virionen die Zelle verlassen. Der genaue Charakter dieses Reifungssignals ist bisher nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf Veränderungen der Kapsidoberfläche in reifen Kapsiden (Roseman *et al.*, 2005). Zudem konnte ein Zusammenhang mit dem Phosphorylierungsstatus der C-terminalen Core-Domäne nachgewiesen werden (Perlman *et al.*, 2005). Diesbezüglich konnte im HBV-System der Ente (DHBV, *duck Hepatitis B-Virus*) gezeigt werden, dass reife Nukleokapside, welche nicht mehr phosphoryliert sind, mit zellulären Membranen assoziiert sind. Unreife Kapside dagegen sind phosphoryliert und können nicht an Membranen binden (Mabit & Schaller, 2000). Dieser Aspekt könnte zur Sortierung der Kapside für die Umhüllung beitragen.

### 1.3.5 Die Umhüllung der HBV-Kapside

Die HBV-Nukleokapside entstehen und reifen im Zytoplasma infizierter Zellen, während die Hüllproteine an den Membranen des ER synthetisiert werden. Damit vollständige, infektiöse Virionen entstehen, müssen die Viruskomponenten zusammengefügt werden, d.h. die Nukleokapside müssen in die Virushülle verpackt werden. Ob diese Umhüllung an den Membranen des ER oder an Membranen anderer Kompartimente erfolgt, ist dabei noch nicht geklärt. Auch der Verpackungsprozess ist noch weitgehend unbekannt. Bislang konnte gezeigt werden, dass die Umhüllung der Nukleokapside ausschließlich in Anwesenheit der HBV-Hüllproteine erfolgt (Bruss & Ganem, 1991). Während die Kapside anderer umhüllter Viren auch von zellulären Membranen umschlossen werden können (Welsch *et al.*, 2007), ist dies bei HBV vermutlich nicht möglich. Lediglich das M-Protein ist für die Umhüllung entbehrlich (Fernholz *et al.*, 1991). Eine entscheidende Rolle spielt das L-Protein, dessen präS-Domäne in der i-präS-Form im Zytoplasma lokalisiert ist. Hier konnten zwei kurze Sequenzbereiche innerhalb der präS1-Domäne (AS 92-113) und der präS2-Region (AS 1-5) identifiziert werden, welche die Kapsidumhüllung entscheidend beeinflussen (Bruss, 1997) (Le Seyec *et al.*, 1998). Dabei wird angenommen, dass es zu einer Interaktion der präS1-Domäne mit dem Kapsidprotein kommen könnte (Poisson *et al.*, 1997; Le Pogam & Shih, 2002). Mögliche Binderegionen für das L-Protein innerhalb des Core-Proteins wurden durch die Analyse von Core-Mutanten identifiziert, welche noch Nukleokapside bilden, jedoch nicht mehr umhüllt werden (Koschel *et al.*, 2000; Ponsel & Bruss, 2003). Die anschließende Verpackung der Kapside durch die Virushülle könnte durch Eigenschaften der Hüllproteine selbst induziert werden. Dabei könnte das S-Protein eine entscheidende Rolle spielen, da dieses alleine in der Lage ist eine Vesikelabschnürung an ER-Membranen zu bewirken, welche als subvirale Partikel sezerniert werden (Bruss, 2004).

Im einfachsten Fall käme es folglich zu einer direkten Interaktion der Nukleokapside mit den viralen Hüllproteinen, woraufhin diese den Umhüllungsprozess vermitteln. Tatsächlich scheinen die genauen Abläufe bei der Morphogenese von HBV allerdings deutlich komplexer zu sein. Ebenso wie bei anderen umhüllten Viren sind vermutlich auch hier zelluläre Faktoren an der Verpackung und Ausschleusung der Viruspartikel beteiligt. Ein Überblick über Komponenten und Prozesse der Wirtszelle, die für die Morphogenese umhüllter Viren von Bedeutung sind, ist daher in den folgenden Kapiteln dargestellt.

## 1.4 Die Rolle zellulärer Faktoren bei der Morphogenese umhüllter Viren

Frühe Modelle zur Umhüllung von Viren gingen davon aus, dass dieser Prozess primär durch die spezifische Interaktion der Hüllproteine mit den Kapsidproteinen angetrieben wird, woraufhin das Kapsid von der Membran umschlossen wird und die anschließende

Abschnürung zufällig erfolgt (Welsch *et al.*, 2007). Dabei sollten ausschließlich virale Komponenten an der Sprossung beteiligt sein. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass verschiedene zelluläre Faktoren und Mechanismen für die Virusumhüllung notwendig sind. Ausschlaggebend war hierbei die Identifizierung kurzer Peptidmotive in den Strukturproteinen unterschiedlicher Viren, deren Mutation die späten Schritte der Virusumhüllung blockieren (Bieniasz, 2006). Diese Motive, welche aufgrund ihrer Wirkung auch als Late/L-Domänen bezeichnet werden, sind somit für die Abschnürung der Viren essentiell. Mittlerweile konnten verschiedene Typen von L-Domänen charakterisiert werden und für alle konnte gezeigt werden, dass sie mit zellulären Proteinen interagieren (Chen & Lamb, 2008). Zwei Motive mit den Konsensus-Sequenzen PS/TAP und YPxL binden dabei an Komponenten des *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT), welche die Vesikelbildung an Multivesikulären Endosomen vermitteln und in Kapitel 1.7.2 genauer beschrieben werden. Ein drittes Motiv vom Typ PPxY interagiert mit Ubiquitin-Ligasen der Nedd4-Familie (siehe Kapitel 1.3.2).

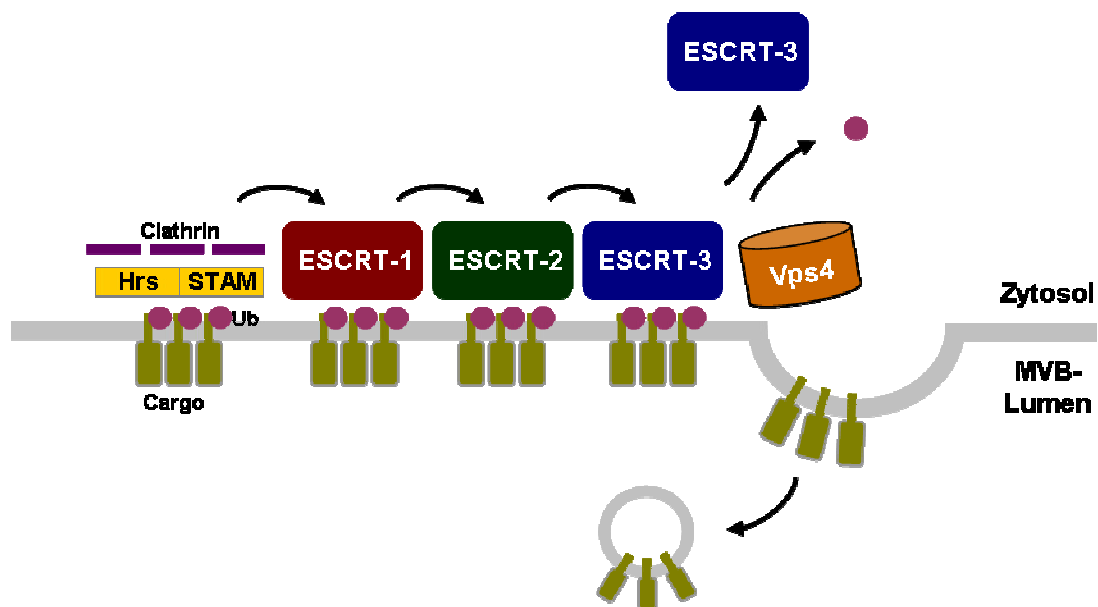
Alle identifizierten zellulären Interaktionspartner der Late-Domänen sind somit an der Bildung von Vesikeln beteiligt, welche ähnlich wie die Viruspartikel in das Lumen zellulärer Kompartimente abgeschnürt werden. Auch spielen sie durch die Verbindung zum Ubiquitin-System der Zelle eine wichtige Rolle bei Sortierungsprozessen. Diese Systeme werden in den folgenden Kapiteln genauer vorgestellt.

#### 1.4.1 Multivesikuläre Endosomen und die Entstehung intraluminaler Vesikel

MVBs sind endosomale Strukturen, die durch die Abschnürung von Vesikeln in das Lumen des Kompartiments gekennzeichnet sind. Die Vorgänge bei der Entstehung von MVBs wurden in zahlreichen Arbeiten dargestellt, wie z.B. von Babst (2005), Piper & Katzmann (2007) und Hurley (2008). Primär werden in den MVBs endozytierte Membranrezeptoren und andere Proteine, die für den lysosomalen Abbau bestimmt sind, in die entstehenden Vesikel sortiert. Ihre Degradation erfolgt anschließend durch die Fusion der MVBs mit den Lysosomen. MVBs können jedoch auch mit der Plasmamembran verschmelzen, wodurch die intraluminalen Vesikel (ILV) als Exosomen freigesetzt werden (van Niel *et al.*, 2006).

Die Kennzeichnung der Proteine als Fracht (*cargo*) für ihre Abschnürung in den ILVs erfolgt meist durch Ubiquitin, wobei im Allgemeinen eine Monoubiquitinierung als Signal dient. Die Vesikelbildung selbst ist von einem Netzwerk verschiedener Proteine abhängig, deren Hauptkomponenten in drei heterologen Proteinkomplexen organisiert sind, die als *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) I-III bezeichnet werden. Diese werden transient aus dem Zytoplasma zu den endosomalen Membranen rekrutiert, wo sie die Sortierung der Membranproteine sowie die Abschnürung der Vesikel vermitteln. Die primäre Cargo-Erkennung erfolgt durch die zwei Proteine Hrs und STAM, die einen Komplex bilden

und an die ubiquitinierte Membranproteine über Ubiquitin-Interaktions-Motive (UIM) binden. Man spricht hier auch vom ESCRT-0-Komplex. Hrs rekrutiert dabei zusätzlich über ein spezifisches Bindemotiv Clathrin, welches dazu beiträgt, die Frachtmoleküle lokal zu konzentrieren. Die Verbindung zum ESCRT-I-Komplex wird über ein Hrs-spezifisches PS/TAP-Motiv hergestellt. Der lösliche ESCRT-I-Komplex gelangt dadurch an die endosomale Membran und dient dort der Rekrutierung des ESCRT-II-Komplexes. Beide Proteinkomplexe beinhalten ebenfalls Komponenten, die ein UIM besitzen, wodurch der Kontakt zu den ubiquitinierten *Cargo*-Molekülen hergestellt wird. Häufig wird dabei die Funktion dieser Ubiquitin-Rezeptoren ebenfalls durch Modifikationen mit Ubiquitin reguliert (Hoeller *et al.*, 2006). Vermittelt durch den ESCRT-II-Komplex lagern sich im nächsten Schritt die Elemente des ESCRT-III-Komplexes an der Membran zusammen. Dieser rekrutiert unter anderem deubiquitinierende Enzyme, welche das Ubiquitin-Signal von den Membranproteinen abspalten, sowie die AAA-Typ ATPase Vps4. Vps4 induziert schließlich die Ablösung der ESCRT-Komplexe und bewirkt die eigentliche Abschnürung der ILVs.



**Abb. 1-5 Modell zur Sortierung von Transmembranproteinen in intraluminale Vesikel der MVBs.** Der Prozess der Vesikelentstehung an endosomalen Membranen wird durch verschiedene Protein-Komplexe vermittelt, die als *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT), bezeichnet werden. Die ubiquitinierten Frachtmoleküle werden dabei zunächst von einem Komplex Ubiquitin-bindender Moleküle (ESCRT-0), bestehend aus Hrs und STAM, erkannt. Diese rekrutieren Clathrin, wodurch eine Hülle gebildet wird, die der lokalen Konzentrierung der Membranproteine dient. Anschließend werden die Membranproteine an die Komplexe ESCRT-I und -II übertragen. Im letzten Schritt wird durch den ESCRT-III-Komplex der Kontakt zu deubiquitinierenden Enzymen und zur AAA-Typ ATPase Vps4 hergestellt. Diese führt zur Ablösung des ESCRT-III-Komplexes und zur Invagination und Abschnürung der Vesikel in das Lumen der MVBs.

Dieses Modell, auch als „*conveyor belt model*“ bezeichnet, geht von einer sequenziellen Rekrutierung der einzelnen ESCRT-Komplexe zur endosomalen Membran aus, welche aufeinander folgend wirken. Mittlerweile wird jedoch deutlich, dass diese strikte Abfolge nicht dem tatsächlichen Bild entspricht. Vielmehr scheint die gleichzeitige Wirkung mehrerer Komponenten zur *Cargo*-Sortierung und Vesikelabschnürung zu führen (Nickerson *et al.*, 2007). Dabei wurden auch direkte Verbindungen zwischen den unterschiedlichen ESCRT-Komplexen identifiziert. So interagiert beispielsweise das Adaptor-ähnliche Protein Alix sowohl mit ESCRT-I als auch mit ESCRT-III und kann somit beide Komplexe direkt verknüpfen (Strack *et al.*, 2003).

### **Die Funktion der ESCRT-Komponenten bei der Umhüllung von Viren**

Nach dem aktuellen Wissensstand nutzen alle umhüllten Viren, die eine Late-Domäne besitzen, Untereinheiten der MVB-Maschinerie zur Umhüllung der Viruspartikel.

Bei Viren mit Late-Domänen vom Typ PT/SAP und YPxL spielen dabei vor allem zwei Faktoren der ESCRT-Maschinerie eine entscheidende Rolle: Tsg101, eine Komponente des ESCRT-I-Komplexes, und Alix, welches mit den Komplexen ESCRT-I und ESCRT-III interagieren kann. Tsg101 bindet dabei an das PT/SAP- Motiv und Alix reagiert mit dem YPxL-Motiv der viralen Proteine (Pornillos *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007), wodurch die Viruskomponenten mit den ESCRT-Komplexen verknüpft werden. Das PPxY-Motiv vermittelt einen anderen Zugang zur ESCRT-Maschinerie, welcher in Kapitel 1.3.2 beschrieben wird. Dieser erfolgt unabhängig vom ESCRT-I-Komplex, wobei die eigentliche Virusumhüllung auch hier durch die AAA-Typ ATPase Vps4 katalysiert wird.

Für zahlreiche umhüllte Viren konnte so gezeigt werden, dass sie Komponenten der MVB-Kaskade für ihre Morphogenese nutzen. Dabei ist die Virusabschnürung vor allem von den späten Schritten, welche durch ESCRT-III und Vps4 vermittelt werden, abhängig. Die Umhüllung der Viren muss nicht zwangsläufig an endosomalen Membranen erfolgen; vielmehr werden häufig die benötigten ESCRT-Komponenten zum Ort der Virusmorphogenese rekrutiert. Viruspartikel können somit auch direkt an der Plasmamembran (z.B. HIV) oder anderen zellulären Membranen (z.B. Foamy-Viren) entstehen (Welsch *et al.*, 2007).

Obwohl für zahlreiche Viren nachgewiesen wurde, dass für ihre Umhüllung Schritte der MVB-Kaskade benötigt werden, lässt sich hierbei kein einheitlicher Mechanismus ableiten. So nutzen verschiedene Viren unterschiedliche Faktoren der MVB-Kaskade und verschaffen sich auf unterschiedlichen Wegen Zugang zu den Prozessen. Zudem gibt es Beispiele von Viren, für deren Umhüllung die ESCRT-Komponenten alleine nicht ausreichen oder deren Morphogenese unabhängig davon abläuft (Chen & Lamb, 2008).

## 1.4.2 Die Rolle von Nedd4 und Ubiquitin bei der Morphogenese umhüllter Viren

Für die Late-Domäne vom Typ PPxY konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass sie mit zellulären Ubiquitin-Ligasen der Nedd4-Familie interagiert, unter denen Nedd4 am besten charakterisiert ist (Kikonyogo *et al.*, 2001; Bouamr *et al.*, 2003; Martin-Serrano *et al.*, 2005). Diese bestehen aus drei charakteristischen Domänen: C2, WW und HECT. Die N-terminale C2-Domäne vermittelt dabei die Assoziation an Membranen, während die C-terminale HECT-Domäne den katalytisch-aktiven Bereich der Ligasen darstellt. Dazwischen befinden sich mehrere Kopien der WW-Domäne, welche an prolinreiche Motive vom Typ PPxY bindet und so einen Großteil der Protein-Interaktionen vermittelt (Ingham *et al.*, 2004). Durch die HECT-Domäne werden die Substratproteine der Ubiquitin-Ligasen modifiziert, indem ein oder mehrere Ubiquitin-Moleküle darauf übertragen und kovalent gebunden werden. Die Ubiquitinierung kann dabei die Konformation, Funktion und Lokalisation der Substratproteine verändern. So werden zahlreiche Abläufe der Zelle, wie beispielsweise der Transport und die Sortierung von Proteinen, die Endozytose, der proteasomale Abbau sowie die Transkription und die DNA-Reparatur, durch Ubiquitin-Modifikationen der beteiligten Faktoren beeinflusst. Ubiquitin-Ligasen sind folglich an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Die Funktion von Nedd4 selbst wird dabei ebenfalls durch verschiedene Faktoren gesteuert. Neben posttranslationalen Modifikationen, z.B. Phosphorylierungen, spielen dabei vor allem Adaptorproteine oder akzessorische Proteine eine entscheidende Rolle (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2006).

Bei der Sortierung von Membranproteinen in die intraluminalen Vesikel der MVBs ist die Monoubiquitinierung der Frachtmoleküle, sowie einiger Komponenten der ESCRT-Komplexe durch Ubiquitin-Ligasen essentiell (Piper & Katzmann, 2007). Auch für die Virusumhüllung konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin-Modifikationen eine ähnliche Bedeutung haben (Martin-Serrano, 2007). Vermutlich binden hierbei ubiquitinierte Virusproteine an Ubiquitin-interagierende Komponenten der ESCRT-Komplexe und erhalten dadurch Zugang zur MVB-Kaskade, unabhängig von einem direkten Interaktionsmotiv für die ESCRT-Proteine. Die Ubiquitinierung der Proteine erfolgt durch die Ubiquitin-Ligase, welche über die Interaktion mit der PPxY-Late-Domäne rekrutiert wird. Für Viren mit einem solchen PPxY-Motiv konnte gezeigt werden, dass der ESCRT-I-Komplex für die Umhüllung nicht benötigt wird, sondern dass diese primär von den späten Komponenten ESCRT-III und Vps4 abhängt. Durch die Ubiquitin-Ligase und/oder die Ubiquitin-Modifikation wird hier vermutlich ein direkter Zugang zu den späten Schritten der MVB-Kaskade ermöglicht (Welsch *et al.*, 2007).

Bislang konnte nachgewiesen werden, dass die katalytische HECT-Domäne und damit vermutlich auch die Ubiquitinierung von Substratproteinen, für die PPxY-abhängige Virusumhüllung notwendig sind (Bieniasz, 2006). Einige Beispiele zeigen, dass virale Strukturproteine, z.B. retrovirale Gag-Proteine, in Abhängigkeit vom PPxY-Motiv ubiquitiniert

werden (Ott *et al.*, 2000; Martin-Serrano *et al.*, 2004; Blot *et al.*, 2004). Allerdings konnte nicht für alle Viren mit einem PPxY-Motiv eine Ubiquitin-Modifikation der viralen Proteine nachgewiesen werden, so dass hier das eigentliche Substrat der Ubiquitin-Ligase noch unklar ist. Verschiedene Untersuchungen zur Funktion von Ubiquitin-Ligasen zeigten, dass diese nicht nur die direkten *Cargo*-Moleküle, sondern auch assoziierte Proteine, beispielsweise die ESCRT-Komponente Hrs, ubiquitinieren (Hicke, 2001; Katz *et al.*, 2002). Folglich könnte neben oder anstatt der Ubiquitinierung von Virusfaktoren auch die Modifikation zusätzlicher Adaptorproteine eine Rolle bei der Virusumhüllung spielen (Bieniasz, 2006).

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass HECT-Ubiquitin-Ligasen neben der Ubiquitinierung von Substratproteinen noch andere Funktionen haben, die für die Virusmorphogenese relevant sind. So wird vermutet, dass die Ligasen unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität eine Interaktion mit Komponenten der ESCRT-Maschinerie, speziell mit dem ESCRT-III-Komplex vermitteln. Da trotz zahlreicher Hinweise ein direkter Kontakt nicht nachgewiesen werden konnte, wird angenommen, dass hierbei möglicherweise ein zusätzlicher Adaptor beteiligt ist (Martin-Serrano *et al.*, 2005; Martin-Serrano, 2007).

## 1.5 Virus-Wirt-Interaktionen bei der Morphogenese von HBV

Für HBV sind die genauen Vorgänge, welche zur Umhüllung der Nukleokapside führen, noch weitgehend unbekannt. Aufgrund der Erkenntnisse zur Entstehung anderer Viren ist jedoch davon auszugehen, dass zelluläre Komponenten und Prozesse auch an der Abschnürung und Freisetzung von HBV beteiligt sind. Einige Interaktionen der viralen Hüllproteine und des Kapsidproteins mit zellulären Proteinen konnten bereits identifiziert werden und scheinen für die Morphogenese von HBV essentiell zu sein. Diese werden daher im Folgenden vorgestellt.

### 1.5.1 Die Rolle der Ubiquitin-Ligase Nedd4 bei der HBV-Morphogenese

Umhüllte Viren besitzen häufig Late-Domänen, die für die späten Schritte der Virusumhüllung benötigt werden (Bieniasz, 2006). Eine solche Late-Domäne konnte im Rahmen einer Doktorarbeit auch im Kapsidprotein von HBV identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein Motiv mit der Sequenz PPAY, das offenbar die Umhüllung der HBV-Nukleokapside beeinflusst. (Dissertation Mann, 2007; Rost *et al.*, 2006).

Typischerweise wird durch die PPxY-Late-Domäne eine Interaktion mit Nedd4-Ubiquitin-Ligasen vermittelt (siehe Kapitel 1.3.2). Bei der genaueren Analyse des Motivs konnte eine Bindung von Nedd4 an das HBV-Core-Protein tatsächlich nachgewiesen werden, die von der



PPAY-Domäne abhängig ist (Dissertation Mann, 2007; Rost *et al.*, 2006). Häufig resultiert aus der Interaktion mit Nedd4 die Ubiquitin-Modifikation der gebundenen Proteine, allerdings konnte eine solche Ubiquitinierung für das Core-Protein bislang nicht nachgewiesen werden. Welches Substrat in diesem Zusammenhang durch Nedd4 ubiquitiniert wird, ist somit nicht bekannt. Dass diese Interaktion und die Funktion von Nedd4 für die Morphogenese von HBV relevant sind, konnte durch weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden. Hierbei führte die ektopische Überexpression von katalytisch inaktivem Nedd4 zu einer Reduktion der Virusproduktion (Rost *et al.*, 2006). Somit scheinen Nedd4 und folglich auch Ubiquitin bei der Umhüllung und Ausschleusung von HBV von Bedeutung zu sein.

### 1.5.2 $\gamma$ 2-Adaptin und seine Funktion bei der Morphogenese von HBV

Bei der Umhüllung der HBV-Nukleokapside spielt das L-Protein eine entscheidende Rolle. Um zelluläre Proteine zu identifizieren, welche diese Funktion des Hüllproteins möglicherweise vermitteln, wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nach Interaktionspartnern des L-Proteins gesucht. Dabei konnte eine Interaktion mit  $\gamma$ 2-Adaptin, einem möglichen Mitglied der Clathrin-Adaptor-Familie, identifiziert werden (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001).

Die bislang bekannten Adaptine sind in heterotetrameren Komplexen organisiert, die sich aus zwei großen, einem mittleren und einem kleinen Adaptin-Molekül zusammensetzen. Unterschiedliche Komponenten bilden dabei die Komplexe AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4, die an der Entstehung intrazellulärer Transportvesikel beteiligt sind. Sie vermitteln hier unter anderem die Sortierung der Frachtmoleküle und bilden einen Teil der Vesikelhülle. Dabei ist der AP-2-Komplex bei der Clathrin-vermittelten Endozytose an der Plasmamembran funktionell. Die anderen Adaptin-Komplexe sind vorwiegend an der Vesikelknospung am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und teilweise auch an endosomalen Membranen beteiligt. AP-1 und AP-2 rekrutieren zudem Clathrin, während AP-4 und vermutlich auch AP-3 unabhängig von Clathrin wirken. (Boehm & Bonifacino, 2001).

$\gamma$ 2-Adaptin wurde von zwei Arbeitsgruppen als eine neue Isoform von  $\gamma$ 1-Adaptin, einer großen Komponente des AP-1-Adaptor-Komplexes, identifiziert und in zwei veröffentlichten Arbeiten von Lewin *et al.* (1998) und Takatsu *et al.* (1998) genauer charakterisiert. Bei  $\gamma$ 2-Adaptin handelt es sich um ein 90 kDa-Protein, welches ebenso wie  $\gamma$ 1-Adaptin aus drei Domänen besteht, einer N-terminalen Kopf-, einer Scharnier- und einer C-terminalen Ohrregion. Dabei konnte eine Sequenzhomologie von etwa 64% ermittelt werden. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu  $\gamma$ 1-Adaptin, konnte  $\gamma$ 2-Adaptin bislang allerdings nicht als Bestandteil eines AP-Komplexes nachgewiesen werden. Die Untersuchung zur intrazellulären Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. So zeigt  $\gamma$ 2-Adaptin eine kernnahe, vesikuläre Verteilung, wobei es nach Lewin *et al.* (1998) zu einer

partiellen Kolokalisation mit Markerproteinen des ER und des Golgi-Apparates kommt, während Takatsu *et al.* (1998) dies nicht bestätigen. Übereinstimmend zeigen beide Arbeiten jedoch, dass  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-Adaptin nicht kolokalisieren. Einen weiteren Unterschied zeigte die Analyse zur Membranassoziation beider Proteine durch die Behandlung mit Brefeldin A (BFA).  $\gamma$ 1-Adaptin wird unter dem Einfluss des GTP-bindenden Proteins Arf (*ADP ribosylation factor*) an die Membranen des TGN rekrutiert. Wird Arf durch BFA blockiert, so verbleibt  $\gamma$ 1-Adaptin in löslicher Form im Zytoplasma. Auch für  $\gamma$ 2-Adaptin konnte eine Bindung an Membranen nachgewiesen werden, die jedoch durch BFA nicht beeinflusst wird. Die Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin scheint somit durch einen anderen, noch unbekanntem Mechanismus zu erfolgen. Einen weiteren Hinweis auf verschiedene Funktionen von  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-Adaptin liefert die Beobachtung, dass der *knockout* von  $\gamma$ 1-Adaptin in Mäusen letal ist (Zizioli *et al.*, 1999).  $\gamma$ 2-Adaptin ist folglich nicht in der Lage,  $\gamma$ 1-Adaptin funktionell zu ersetzen. Obwohl  $\gamma$ 2-Adaptin als eine Isoform von  $\gamma$ 1-Adaptin beschrieben wurde, weisen die bisherigen Untersuchungen auf deutliche Unterschiede zwischen beiden Adaptinen hin. Die genaue Funktion und Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin in der Zelle bleibt dabei allerdings weitgehend unbekannt.

Im Zusammenhang mit HBV wurde  $\gamma$ 2-Adaptin in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen als Interaktionspartner des L-Hüllproteins identifiziert (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001). Durch verschiedene Untersuchungen konnte diese Interaktion bestätigt und genauer charakterisiert werden. Dabei wurde in Immunfluoreszenzstudien neben der Kolokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin und dem L-Protein auch beobachtet, dass das L-Protein die Verteilung von  $\gamma$ 2-Adaptin signifikant ändert, da es durch das L-Protein rekrutiert wird. Biochemische Analysen haben gezeigt, dass  $\gamma$ 2-Adaptin über die Ohrregion an die L-spezifische präS1-Domäne des Hüllproteins bindet. Die Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin erfolgt hierbei ausschließlich an die i-präS-Form des L-Proteins, d.h. mit der zytosolisch orientierten präS1-Domäne. Aufgrund der zusätzlichen Vesikelhülle während der Endozytose von Viren sollte ein Kontakt von  $\gamma$ 2-Adaptin zur präS1-Domäne des L-Proteins bei frühen Schritten der HBV-Infektion nicht möglich. Daher wird vermutet, dass  $\gamma$ 2-Adaptin an den späten Schritten der Virusmorphogenese beteiligt ist. Dass  $\gamma$ 2-Adaptin tatsächlich einen Einfluss auf die Entstehung der HB-Virionen hat, konnte im Rahmen einer Doktorarbeit gezeigt werden. Hierbei wurde  $\gamma$ 2-Adaptin in HBV-replizierenden Leberzellen depletiert, wodurch die Virusfreisetzung deutlich reduziert wurde (Dissertation Thome, 2007; Rost *et al.*, 2006). Bislang konnte allerdings noch nicht geklärt werden, wie  $\gamma$ 2-Adaptin die Virusbildung beeinflusst und welche Prozesse durch die Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin mit dem L-Protein vermittelt werden.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Umhüllte Viren entstehen durch einen Knospungsprozess an Membranen der Wirtszelle, bei dem die Kapside von einer Membranhülle umschlossen werden. Die Umhüllung und Freisetzung der Viruspartikel wird hierbei durch zahlreiche zelluläre Faktoren und Prozesse beeinflusst, welche bislang nur teilweise aufgeklärt werden konnten.

Auch bei der Morphogenese von HBV kommt es an intrazellulären Membranen zur Umhüllung der Nukleokapside durch die viralen Hüllproteine, wobei hier die genauen Vorgänge noch weitgehend unbekannt sind. Von besonderem Interesse ist dabei, welche Komponenten und Mechanismen der Wirtszelle an der Entstehung und Ausschleusung der Virionen beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Virus-Wirt-Interaktionen bei der Morphogenese von HBV genauer zu charakterisieren und diese funktionell in den Kontext zellulärer Prozesse einzuordnen.

Die Grundlage für diese Untersuchungen lieferte eine vorangegangene Arbeit, in der spezifische Interaktionspartner des L-Proteins durch einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen ermittelt wurden. Dabei konnte das mutmaßliche Adaptorprotein  $\gamma 2$ -Adaptin identifiziert werden, welches an die präS1-Domäne des L-Hüllproteins bindet (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001). In weiteren Analysen konnte daraufhin nachgewiesen werden, dass durch die Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin die Freisetzung von HBV stark beeinträchtigt wird (Rost *et al.*, 2006). Folglich scheint  $\gamma 2$ -Adaptin für die Umhüllung und/oder Ausschleusung der Virionen relevant zu sein. Wie genau  $\gamma 2$ -Adaptin dabei wirkt, ist allerdings nicht bekannt, da seine Funktion in der Zelle bislang noch nicht geklärt werden konnte.  $\gamma 2$ -Adaptin zeigt jedoch eine starke Ähnlichkeit zu zellulären Adaptorproteinen, so dass eine ähnliche Aktivität denkbar wäre. Aus den bisherigen Erkenntnissen resultiert daher die Arbeitshypothese, dass  $\gamma 2$ -Adaptin eine Rolle bei den späten Schritten der HBV-Morphogenese spielt, wo es möglicherweise an der Verknüpfung der viralen Komponenten am Ort der Virusumhüllung beteiligt ist. Zudem könnte  $\gamma 2$ -Adaptin den Kontakt zu zellulären Mechanismen herstellen, durch die es zur Knospung der HBV-Partikel kommt.

Um Hinweise zu erhalten, welche Prozesse dabei durch  $\gamma 2$ -Adaptin vermittelt werden, sollte die zelluläre Funktion und Lokalisation von  $\gamma 2$ -Adaptin untersucht werden. Dieses sollte erlauben, Rückschlüsse auf die Vorgänge bei der Virusumhüllung ziehen zu können. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand somit die funktionelle Charakterisierung von  $\gamma 2$ -Adaptin. Dazu sollten zunächst strukturelle Eigenschaften des Proteins analysiert werden, um möglicherweise charakteristische Motive und Domänen zu identifizieren, die spezifische Eigenschaften oder Interaktionen vermitteln könnten. Von besonderem Interesse war dabei eine kurze Sequenz von  $\gamma 2$ -Adaptin, welche Ähnlichkeit zu den UIM-Motiven anderer Ubiquitin-Rezeptoren aufweist. Eine mögliche Verbindung von  $\gamma 2$ -Adaptin und Ubiquitin sollte daher genauer untersucht werden. Einen Hinweis darauf, dass Ubiquitin auch bei der HBV-

Morphogenese von Bedeutung sein könnte, liefert die nachgewiesene Interaktion der Ubiquitin-Ligase Nedd4 mit dem Core-Protein von HBV. Ob hierbei möglicherweise ein direkter Zusammenhang zwischen Ubiquitin, Nedd4 und  $\gamma$ 2-Adaptin besteht, sollte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Alle Plastikwaren stammten von den Firmen Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhäuser) und Sarstedt (Heidelberg).

### 2.2 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder Ausubel *et al.* (1994) angesetzt.

### 2.3 Medien und Medienzusätze

#### 2.3.1 Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) pH 7

0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) Pepton
1% (w/v) NaCl

Für feste Nährböden wurde den Medien zusätzlich 1,5% (w/v) Bacto-Agar zugegeben. Zur Sterilisation wurden die Nährmedien autoklaviert. Für Selektionsmedien erfolgte die Zugabe von Ampicillin bei einer maximalen Temperatur von 50°C mit einer Endkonzentration von 100 mg/l.

#### 2.3.2 Zellkultur

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

→ Dulbecco's High Glucose 4,5 g/l mit L-Glutamine GIBCO® Opti-MEM® 10% (v/v) FCS (Fötale Kälberserum) 5 µg/ml Cyprobay® (Ciprofloxacin) 50 µg/ml Streptomycin 50 U/ml Penicillin	PAA Laboratories Gibco/Invitrogen Gibco/Invitrogen Bayer Gibco/Invitrogen Gibco/Invitrogen
---	---

## 2.4 Reagenzien und Kits

Perfectprep Plasmid Maxi	Eppendorf
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads	Amersham/GE Healthcare
Jetsorb Gel Extraction Kit	Genomed
Lipofectamine™ Transfection Reagent	Invitrogen
PLUS™ Reagent	Invitrogen
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	Invitrogen
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer
Fluoprep	bioMérieux
Dynabeads® M-280 Tosylactivated	Invitrogen
Dynabeads® M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG	Invitrogen
Dynabeads® M-280 Sheep Anti-Mouse IgG	Invitrogen
Protein A-Agarose	Sigma-Aldrich
Ubiquitin-Agarose	Sigma-Aldrich
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham/GE Healthcare
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham/GE Healthcare
HiTrap™ NHS-activated HP Columns	GE Healthcare
Pierce BCA Protein Assay Kit	Pierce
Protease Inhibitor Mix M	Serva
Hoechst 33342 (Bisbenzimidide)	Sigma-Aldrich

## 2.5 DNA- und Proteinmarker

### DNA-Längenstandard

Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker 3, ready-to-use	Fermentas
PeqGOLD 1kb DNA-Leiter	PeqLab

### Protein-Molekulargewichtsmarker

Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
High Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis	Amersham

## 2.6 Enzyme

Restriktionsendonukleasen stammten von der Firma New England Biolabs (NEB) und wurden in den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangabe eingesetzt.

Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB
DNA Polymerase I (Klenow)	NEB
T4 DNA Ligase	Fermentas
PfuUltra™ HF DNA Polymerase	Stratagene
Pwo DNA Polymerase	PeqLab
Trypsin	Cambrex

## 2.7 Oligonukleotide und siRNA

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Invitrogen bezogen und auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/μl eingestellt. Veränderungen in der Nukleotidsequenz sind rot markiert und zusätzlich eingebrachte Schnittstellen sind unterstrichen.

### 2.7.1 PCR- und Sequenzierprimer

Name	Sequenz 5'→3'
UIMSeqF	GTCTGATCACAGTGCTGTGC
Clath-BoxF	CACTCTTCCGGATCCACGACCAC
Clath-BoxR	GGAAGGTCAAGCAGGAATTCCAGG
p3xFLAG 895-915	CAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
p3xFLAG-10_rv_seq	GCACTGGAGTGGCAACTTCC

### 2.7.2 Mutageneseprimer

Name	Sequenz 5'→3'
dClathrinf	CCCACAGAGCCCCAGGCCTCACAGGGGGCTTCTGGGGATGTCCAG
dClathrinr	CTGGACATCCCCAGAAGCCCCCTGTGAGGCCTGGGGCTCTGTGGG
UIM1f	GCCGGAGAGCCCTGGAAGGAGCCTAGGCTCTGGTAAATAGCTCC
UIM1r	GGAGCTATTTACCAGACCTAGGCTTCTTCCAGGGCTCTCCGGC
UIM2f	GAGAGCCCTGGAACTAAGCCTGGGTCTGGTAAATGGATCCAATGTG
UIM2r	CACATTGGATCCATTTACCAGACCCAGGCTTAGTTCCAGGGCTCTC
UIM3f	CTCAGCCGGAGAGCCCTGGAATTCAATGTGCGAGCCATGATGCAAGAG
UIM3r	CTCTTGCATCATGGCTCGCACATTGAATTCAGGGCTCTCCGGCTGAG

CG123Af	GAGTATTTGGTGTCTTTTCG <b>C</b> AGTGTGGAT <b>CC</b> GCACCTCCTCCAGC
CG123Ar	GCTGGAGGAGTGCG <b>G</b> ATCCACACTGCGAAAGACACCAAATACTC
CF122Af	GAGTATTTGGTGTCT <b>GCCGGC</b> GTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGC
CF122Ar	GCTGGAGGAGTGCGAATCCACAC <b>GCCG</b> GCAGACACCAAATACTC
CdFGVWf	GTTATAGAGTATTTGGT <b>ATCG</b> ATTTCGCACTCCTCCAGCTTATAGA CC
CdFGVWr	GGTCTATAAGCTGGAGGAGTGCGAAT <b>CGAT</b> ACCAAATACTCTATAAC
C2_K33/34R-fw	GAGTTATAG <b>GCCGGC</b> CATAGGCCTTGCCAG <b>G</b> GAGGGATATATTGGGAGC
C2_K33/34R-rv	GCTCCCAATATATCC <b>CTCCT</b> TGGCAAGGCCTAT <b>GCCGGC</b> TATAACTC
C2_K62-71R-fw	GTGTGCAAACAAG <b>A</b> ACCATTAG <b>AAGA</b> AAG <b>CTT</b> GAATCCAAG <b>G</b> TGGAATG AAG
C2_K62-71R-rv	CTTCATTCCAC <b>CTTGGATTCAAGCTI</b> CTTCTAATGGTT <b>CTT</b> GTTTGCACAC
C2_K127R-fw	GACCATATACATTTAGGGATTTTGT <b>GCTC</b> CATGGATCCC
C2_K127R-rv	GGGATCCATGG <b>AGCAC</b> AAAATCCCTAAATGTATATGGTC
C2_K-PL-R-fw	CGTCCGGTTTGTCTGGAG <b>GCG</b> ATCGGAAATGGCAACTTGC
C2_K-PL-R-rv	GCAAGTTGCCATTT <b>CCGATCGC</b> CTCCAGCAAACCGGACG

### 2.7.3 siRNA

Alle siRNA-Duplices wurden von den Firmen Quiagen oder Sigma bezogen. Sie wurden mit RNase-freiem DEPC-behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 20 pmol/ $\mu$ l eingestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>
Kontroll-siRNA	UAGCGACUAAACACAUCAA (dT)(dT) UUGAUGUGUUUAGUCGCUA (dT)(dT)
$\gamma$ 2-Adaptin	AAACCCUGCUUUGCUGUUAU (dT)(dT) AUU AACAGCAAAGCAGGGUUU (dT)(dT)
Clathrin HC1	AACCU GCGGUCUGGAGUCAAC (dT)(dT) GUUGACUCCAGACCGCAGGUU (dT)(dT)
Tsg101	CCAGUCUUCUCUCGUCCUA (dT)(dT) UAGGACGAGAGAAGACUGG (dT)(dT)
Nedd4	Nedd4 (ID 4734); siRNA#2/Sigma; Start 2289



## 2.8 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pHBV	1.1mer HBV-Genom unter der Kontrolle des Metallothionein Ila-Promotors (hMTIIa).	Radziwill <i>et al.</i> (1990)
pHBV.C <sup>-</sup>	Durch gerichtete Mutagenese von pHBV, wurde ein zusätzliches Stop-Codon an AS-Position 38 eingefügt, wodurch die Expression von Core unterbunden wird.	Rost <i>et al.</i> (2006)
pCore	In den Expressionsvektor pNI2 kloniertes Core-Gen unter der Kontrolle des hMTIIa-Promotors.	Rost <i>et al.</i> (2006)
pcDNA3	Expressionsvektor für eukaryote Zellen; trägt den Cytomegalovirus(CMV)-Promotor.	Invitrogen
pcDNA3.1	Vektor entspricht pcDNA3 mit zusätzlichen Modifikationen im Polylinker.	Invitrogen
$\gamma$ 1.HA	Humanes $\gamma$ 1-Adaptin aus cDNA von HepG2-Zellen im Vektor pcDNA3 mit N-terminalem HA-Tag (pcDNA3-HA- $\gamma$ 1).	K.Nakayama (University of Kyoto, Japan); Takatsu <i>et al.</i> (1998)
$\gamma$ 2	Humanes $\gamma$ 2-Adaptin aus cDNA von HepG2-Zellen im Vektor pcDNA3 (pcDNA3- $\gamma$ 2).	K.Nakayama (University of Kyoto, Japan); Takatsu <i>et al.</i> (1998)
$\gamma$ 2.HA	Humanes $\gamma$ 2-Adaptin aus cDNA von HepG2-Zellen im Vektor pcDNA3 mit N-terminalem HA-Tag (pcDNA3-HA- $\gamma$ 2).	K.Nakayama (University of Kyoto, Japan); Takatsu <i>et al.</i> (1998)
$\gamma$ 2 $\Delta$ 528.HA	Deletionsmutante von $\gamma$ 2.HA, bei der die C-terminale Ohr-Domäne ab Position 528 durch Restriktion mit <i>XhoI</i> - <i>ApaI</i> entfernt wurde.	Hartmann-Stuhler & Prange (2001)
$\gamma$ 2 $\Delta$ 193.HA	Deletionsmutante von $\gamma$ 2.HA, bestehend aus AS 1-193. Der C-terminale Bereich wurde durch Restriktion entfernt.	Rost <i>et al.</i> (2006)
$\gamma$ 2UIM1.HA	Punktmutante von $\gamma$ 2.HA mit Veränderungen im UIM-Motiv durch Mutagenese mit den Primern UIM1f und UIM1r (AS 69 L→G, AS 72 A→G).	Rost <i>et al.</i> (2006)
$\gamma$ 2UIM2.HA	Punktmutante von $\gamma$ 2.HA mit Veränderungen im UIM-Motiv durch Mutagenese mit den Primern UIM2f und UIM2r (AS 72 A→G, AS 76 S→G).	Rost <i>et al.</i> (2006)
$\gamma$ 2 $\Delta$ UIM.HA	Deletion des UIM-Motivs aus $\gamma$ 2.HA durch gerichtete Mutagenese mit den Primern UIM3f und UIM3r.	Rost <i>et al.</i> (2006)

$\gamma 2\Delta$ Clathrin.HA	Deletion des Clathrin-Bindungs-Motivs aus $\gamma 2$ .HA durch gerichtete Mutagenese mit den Primern dClathrinF und dClathrinR.	
pGEX.3X	Bakterieller Expressionsvektor für GST-Fusionsproteine	Amersham/GE Healthcare
C-Box-GST	Konstrukt zur Expression des Clathrin-Bindungs-Motivs von $\gamma 2$ als GST-Fusionsprotein. Der Bereich von AS 577-652 wurde mit den Primern Clath-BoxF/R aus $\gamma 2$ -HA amplifiziert und über die eingefügten Schnittstellen <i>EcoRI/BamHI</i> in pGEX-3X kloniert.	
$\Delta$ C-Box-GST	Klonierung erfolgte identisch zu C-Box-GST, wobei $\gamma 2\Delta$ Clathrin.HA als Template DNA diente, so dass das Clathrin-Bindungs-Motiv deletiert ist.	
Ub.HA	Das Konstrukt unter Kontrolle des CMV-Promotors codiert ein multimeres Protein aus 8 Ubiquitin-Einheiten mit je einem N-terminalen HA-Tag. Monomeres HA-Ubiquitin entsteht durch posttranslationale Prozessierung.	M.Treier (EMBL, Heidelberg)/D.Sitterlin (University of Versailles); Treier <i>et al.</i> (1994)
p3xFlag	p3xFlag-CMV-10; Expressionsvektor für N-terminal 3xFlag-markierte Proteine in eukaryoten Zellen unter Kontrolle des CMV-Promotors	Sigma
Nedd4	Humanes Nedd4.1-Gen im Vektor p3xFlag-CMV-10; subkloniert aus Nedd4-pGADNOT (F.Bouamr; Howard Hughes Medical Institute, New York)	
Nedd4.dn	Dominant-negative Punktmutante von Nedd4 im Vektor p3xFlag-CMV-10. Inaktivierung der katalytischen HECT-Domäne durch einen AS-Austausch an Position 894 von Cystein nach Serin (Nedd4.C894S).	
Nedd4 $\Delta$ Hect	Deletionsmutante von Flag-markiertem Nedd4 in p3xFlag-CMV-10, bei der die HECT-Domäne ab AS 534 vollständig fehlt.	
C2	C-terminale C2-Domäne von humanem Nedd4.1 (AS 1-161) im Vektor p3xFlag-CMV-10.	E.Gottwein (Universität Heidelberg)
WW	WW-Domänen von humanem Nedd4.1 (AS 210-544) im Vektor p3xFlag-CMV-10.	E.Gottwein (Universität Heidelberg)
C2 $\Delta$ K	Austausch aller Lysinreste der C2-Domäne gegen Arginine durch mehrfache, gezielte Mutagenese des C2-Konstrukts mit den Primern C2_K33/34R-fw und C2_K33/34R-rv, C2_K62-71R-fw und C2_K62-71R-rv, C2_K127R-fw und C2_K127R-rv, C2_K-PL-R-fw und C2_K-PL-R-rv.	

**Tab. 2-1 Verwendete Vektoren und Expressionskonstrukte**

## 2.9 Antikörper und Antiseren

### 2.9.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Epitop/Target	Spezies	Bezugsquelle/ Referenz
$\alpha$ -HA	CYPYDVPDYASL	Maus; monoklonal Ratte; monoklonal	Covance Roche
$\alpha$ -Flag	DYKDDDDK	Maus; monoklonal Kaninchen; polyklonal	Sigma
$\alpha$ 830	Humanes $\gamma$ 2-Adaptin; AS 803-822	Kaninchen; polyklonal	Eurogentech
$\alpha$ -Nedd4.1	Humanes Nedd4.1	Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz
$\alpha$ -Ubiquitin	Humanes Ubiquitin	Kaninchen; polyklonal Maus; monoklonal	Dako Biomol
$\alpha$ -ClathrinHC	Schwere Kette von humanem Clathrin; AS 1321-1620	Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz
	Schwere Kette von Clathrin(Ratte); AS 4-171	Maus; monoklonal	BD
$\alpha$ -Tsg101	Humanes Tsg101; AS 121-390	Maus; monoklonal	Santa Cruz
$\alpha$ -K45	Natives HBV-Core-Protein bzw. vollständige HBV-Kapside	Kaninchen; polyklonal	Rost <i>et al.</i> (2006)
$\alpha$ -K46	Denaturiertes Core-Protein	Kaninchen; polyklonal	Rost <i>et al.</i> (2006)
$\alpha$ -K37	HBsAG-Partikel	Kaninchen; polyklonal	
$\alpha$ -K38	HBV-S-Protein	Kaninchen; polyklonal	
$\alpha$ -K47	PräS1-Region des L-Proteins; GST (Immunisierung mittels PräS1/GST-Fusionsprotein)		
$\alpha$ -LBPA(6C4)	<i>Lysobisphosphatic acid</i> (LBPA); Immunisierung erfolgte mit endosomalen Membranen	Maus; monoklonal	J.Gruenberg (University of Geneva); Kobayashi <i>et al.</i> (1998)
$\alpha$ -EEA1	Humanes EEA1; AS 3-281	Maus; monoklonal	BD
$\alpha$ -golgin97		Maus; monoklonal	Molecular Probes
$\alpha$ - $\gamma$ 1Adaptin		Maus; monoklonal	Sigma

$\alpha$ -Calnexin	Humanes Calnexin; AS 116-301	Maus; monoklonal	BD
$\alpha$ -KDEL	SEKDEL	Maus; monoklonal	Stressgen

Tab. 2-2 Primäre Antikörper

## 2.9.2 Sekundäre Antikörper

sekundäre Antikörper	Konjugat	Spezies	Bezugsquelle
$\alpha$ -Kaninchen	Peroxidase	Ziege; polyklonal	Dianova
	Alexa Fluor® 488	Ziege; polyklonal	Molecular Probes
	Alexa Fluor® 546	Ziege; polyklonal	Molecular Probes
	Alexa Fluor® 594	Esel; polyklonal	Molecular Probes
$\alpha$ -Maus	Peroxidase	Ziege; polyklonal	Dianova
	Alexa Fluor® 488	Ziege; polyklonal Esel; polyklonal	Molecular Probes
	Alexa Fluor® 546	Ziege; polyklonal	Molecular Probes
$\alpha$ -Ratte	Alexa Fluor® 546	Ziege; polyklonal	Molecular Probes

Tab. 2-3 Sekundäre Antikörper

## 2.10 Bakterienstämme

***E. coli* DH5 $\alpha$**  *SupE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR1, recA1, endA1*  
(Hanahan, 1983) *gyrA96 thi-1 rel A1*

**NEB 5-alpha Competent** *fhuA2 $\Delta$ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80  $\Delta$ (lacZ)M15*  
***E. coli* - High Efficiency** *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*  
(New England Biolabs)

***E. coli* TG1**  *$\Delta$ (lac-pro), supE, thi, hsd $\Delta$ 5/F'traD36, proA+B+, lacI<sub>q</sub>,*  
(Gibson, 1984) *lacZ $\Delta$ M15*

## 2.11 Zelllinien

<b>HuH7</b>	ATCC//ECACC 01042712; humane Hepatoma-Zelllinie
<b>Hela</b>	ATCC CCL-13; humane Cervixkarzinom-Zelllinie
<b>COS7</b>	ATCC CRL-1651; Nierentumor-Zelllinie aus <i>Cercopithecus aethiops</i> ;
<b>HEK 293-TT</b>	ATCC CRL-1573; humane embryonale Nieren-Zelllinie

## 2.12 Software

AxioVision	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena); <a href="http://www.zeiss.com/AxioVision">http://www.zeiss.com/AxioVision</a>
ClustalW [1.83]	European Bioinformatics Institute (EBI), GB; <a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>
GENTle	Magnus Manske, University of Cologne, licensed under GPL; <a href="http://gentle.magnusmanske.de">http://gentle.magnusmanske.de</a>
NCBI/BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA; <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</a>

## 3      METHODEN

Die in der folgenden Liste aufgeführten Methoden wurden in Anlehnung an Protokolle aus *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) und *Current protocols in molecular biology* Vol.1-3 (Ausubel *et al.*, 1994) durchgeführt. Für enzymatische Reaktionen wurden die verwendeten Enzyme entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben eingesetzt:

- Anzucht und Lagerung von Bakterien
- Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode
- Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E.coli*-Zellen
- Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen
- Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration
- Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der Enden linearer DNA-Fragmente mit *calf intestinal phosphatase*
- Auffüllen überhängender DNA-Enden mittels Klenow-Polymerase
- Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese
- Ligation von DNA-Fragmenten
- Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA)
- Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE
- Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran – Western-Blot (Shekhtman & Cowburn)
- Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)
- Dialyse von Proteinlösungen

Für die folgenden Methoden wurden molekularbiologische Kits verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben:

- Plasmidisolation aus Bakterienzellen  
PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab)  
Perfectprep Plasmid Maxi (Eppendorf)
- DNA-Extraktion aus Agarosegelen  
Jetsoorb Gel Extraction Kit (Genomed)

## 3.1 Molekularbiologische Methoden

### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) nach dem von K.Mullis (Saiki *et al.*, 1988) entwickelten Prinzip wird vorwiegend für die gezielte Vervielfältigung genau definierter Abschnitte eines DNA-Strangs eingesetzt.

Für eine Standard-PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

x µl DNA (100 ng)  
 1 µl Primer 1 (20 pmol/µl)  
 1 µl Primer 2 (20 pmol/µl)  
 1 µl dNTP-Mix (10 mM)  
 0,5 µl *Taq*-Polymerase (1U)  
 5 µl 10 x PCR-Puffer  
 ad 50 µl mit dH<sub>2</sub>O

PCR-Programm:

1 Denaturierung	95°C	5 min	
2 Denaturierung	95°C	30 sek	} 30-35x
3 Annealing	primerspezifisch	30 sek	
4 Elongation	72°C	1 min/1000 bp	
5 Elongation	72°C	5 min	
6	4°C		

Die Annealingtemperatur richtet sich dabei jeweils nach der Länge und Basenzusammensetzung der verwendeten Primer. Die Elongationszeit wird entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments festgelegt. Die Schritte 2-4 werden in 30-35 Zyklen wiederholt. Bei der Verwendung spezieller Polymerasen mit *proofreading*-Funktion wurden die Protokolle entsprechend den Herstellerangaben abgewandelt.

### 3.1.2 Ortspezifische Mutagenese

Durch die ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) können gezielt Mutationen in Plasmid-DNA eingebracht werden. Davon ausgehend lassen sich somit Punktmutationen und Aminosäureaustausche, sowie Insertionen und Deletionen in den zu untersuchenden Proteinen platzieren. Die Methode basiert dabei auf der Verwendung zweier exakt komplementärer Primer von 25-45 Basen Länge, die in einem möglichst zentralen Bereich die gewünschten Veränderungen tragen. Die Primer binden jeweils an den

komplementären Strang denaturierter Plasmid-DNA und werden durch die eingesetzte DNA-Polymerase entsprechend der Matrize verlängert. Durch diesen Vorgang wird das gesamte Plasmid amplifiziert.

Die Mutagenese-PCR wurden mit den Komponenten des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt, wobei der Reaktionsansatz wie folgt angesetzt wurde:

5 µl 10 x PCR-Puffer  
 x µl DNA (10 ng)  
 1 µl Primer 1 (125 ng)  
 1 µl Primer 2 (125 ng)  
 1 µl dNTP-Mix (100 mM)  
 3 µl QuikSolution™ Reagent  
 1 µl *PfuUltra* HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)  
 ad 50 µl mit ddH<sub>2</sub>O

PCR-Programm:

1	95°C	1 min	
2	95°C	50 sek	} 18x
3	60°C	50 sek	
4	68°C	1 min/1000 bp	
5	68°C	7 min	
6	4°C		

Da nur die neu synthetisierte DNA die gewünschte Mutation trägt, muss die eingesetzte Template-DNA entfernt werden. Hierzu wird der Ansatz mit der Endonuklease *DpnI* restringiert, welche spezifisch methylierte DNA schneidet, wie sie bei der Verwendung *dam*-positiver *E.coli*-Stämmen auftritt. Für die anschließende Transformation in chemisch kompetente *E.coli* DH5α wurden 2 µl der Mutagenese-Reaktion eingesetzt.

### 3.1.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierreaktionen wurden bei den Firmen StarSeq/Genterprise (Mainz) oder SeqLab (Göttingen) in Auftrag gegeben. Dabei wurden die unter 2.7 angegebenen Sequenzierprimer verwendet.



## 3.2 Zellbiologische Methoden

Um Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen an Zellkultur-Werkbänken durchgeführt. Dabei wurden ausschließlich sterile Lösungen und Verbrauchsmaterialien benutzt.

### 3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die hier verwendeten HuH7-Zellen wurden in DMEM Zellkulturmedium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum im Brutschrank bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Um bakterielle Kontaminationen zu verhindern, wurde dem Medium zudem 1% (v/v) einer Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt oder 5 µg/ml Ciprofloxacin, ein Antibiotikum, welches zusätzlich gegen Mycoplasmen wirkt.

Um adhärenenten Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten, muss eine ausreichende Substratfläche zur Verfügung stehen. Sobald sich eine konfluente Zellschicht gebildet hatte, wurden die Zellen daher verdünnt. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen 1 min mit einer Lösung aus PBS, 2,5 mM EDTA und 0,25% Trypsin überschichtet. Nach dem Entfernen der Trypsinlösung und einer Inkubation von 5 min wurden die Zellen in frischem DMEM resuspendiert. Für die weitere Kultivierung wurde 1/5 der Zellen mit frischem DMEM in eine Gewebekulturflasche überführt. Die Verdünnung erfolgte je nach Zellwachstum alle 3-4 Tage, wobei die restlichen abgelösten und resuspendierten Zellen für weitere Anwendungen zur Verfügung standen.

### 3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um einen Qualitätsverlust der Zelllinien durch häufiges Passagieren zu verhindern, wurden regelmäßig frische Zellen in Kultur genommen und hiervon gleichzeitig wieder neue Aliquots eingefroren, um den Bestand zu sichern.

Die langfristige Lagerung eukaryotischer Zellen erfolgte in frischem DMEM mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden frische konfluente Zellen einer Ø14 cm-Zellkulturschale wie unter 3.2.1 beschrieben abgelöst und resuspendiert. Die durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm pelletierten Zellen wurden in 3 ml DMEM/10% DMSO aufgenommen und à 1ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die anschließende Kühlung der Zellen erfolgte schrittweise, zunächst für jeweils mindestens 24 h bei -20°C und -70°C, bevor sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, danach in frischem Kulturmedium resuspendiert und vollständig in eine Gewebekulturflasche überführt. Nach 24 h bei 37°C/ 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium ausgetauscht und nach weiteren zwei Tagen sollte sich ein konfluenter Zellrasen gebildet haben.

### 3.2.3 Transfektion von Plasmid-DNA

Unter transienter Transfektion versteht man das zeitweilige Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryote Zellen, vorwiegend zum Zweck einer gezielten Proteinexpression. Das hier eingesetzte Verfahren beruht dabei auf dem Prinzip der Lipofektion (Hawley-Nelson & Ciccarone, 2001), speziell auf der Bildung von Komplexen aus negativ geladener Plasmid-DNA und polykationischen Lipiden, welche von der Zielzelle aufgenommen werden.

Die Transfektionen wurden mit den Reagenzien Lipofectamine™ und PLUS™ der Firma Invitrogen nach einem für HuH7-Zellen optimierten Protokoll durchgeführt, für das die genauen Mengenangaben der verschiedenen Ansätze in Tabelle 2-1 zusammengestellt sind. HuH7-Zellen wurden dabei zunächst wie unter 2.2.1 angegeben abgelöst und resuspendiert und in frischen Kulturschalen so ausgesät, dass sie bei der Transfektion am folgenden Tag zu 70% konfluent waren. Für die eigentliche Transfektionsreaktion wurde das Kulturmedium durch serumfreies Medium (Opti-MEM) ersetzt. Damit sich die DNA-Lipid-Komplexe bilden konnten wurden zunächst zwei Ansätze hergestellt, wobei zum einen die Plasmid-DNA mit dem PLUS-Reagenz in Opti-MEM vermischt wurde und zum anderen das Lipofectamine-Reagenz ebenfalls in Opti-MEM verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden beide Ansätze vereinigt, vorsichtig durch Invertieren gemischt und weitere 15 min inkubiert. Die Ansätze mit den DNA-Lipid-Komplexen wurden anschließend zu den Zellen gegeben. Die Aufnahme erfolgt während einer Inkubation von 3-4 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub>, woraufhin das Medium durch DMEM ersetzt wurde. Die Analyse der Proteinexpression konnte je nach Plasmid und Versuchsansatz nach 24-72 h erfolgen.

Kulturschale	DNA + Opti-MEM	Lipofectamine + Opti-MEM	Opti-MEM/ Kulturschale
24-well	2 µg + 25 µl	1 µl + 25 µl	0,2 ml
6-well	4 µg + 100 µl	4 µl + 100 µl	0,8 ml
Ø6cm	8 µg + 250 µl	12 µl + 250 µl	2 ml
Ø10cm	10 µg + 750 µl	30 µl + 750 µl	5 ml

**Tab. 3-1 Mengenangaben zur Transfektion von HuH7-Zellen mit Lipofectamine™/PLUS™**

### 3.2.4 Transfektion von siRNA

Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus eukaryotischer Zellen, bei dem die Expression einzelner Gene posttranskriptional gehemmt wird. Entscheidend hierfür sind doppelsträngige RNA-Moleküle, die zu kürzeren *small interfering RNAs* (siRNAs) von 21-23 Nukleotiden prozessiert werden. Diese leiten durch hochspezifische Basenpaarung des

antisense RNA-Strangs mit der komplementären mRNA deren Abbau ein, wodurch die Proteinexpression blockiert wird.

Der Mechanismus wird mittlerweile als gentechnisches Verfahren genutzt, um die Expression von Genen gezielt zu hemmen. In dem hier verwendeten System wurden dafür synthetische siRNAs benutzt, die zu einem Sequenzbereich des zu untersuchenden Gens komplementär sind und über Transfektion in die Zellen eingebracht wurden.

Die siRNA-Transfektion wurde über Lipofektion mit dem Reagenz Lipofectamine™ RNAiMAX der Firma Invitrogen durchgeführt. Dabei wurde das vom Hersteller angegebene Protokoll der *forward*-Transfektion gewählt und für HuH7-Zellen optimiert. Hierbei wurden die Zellen am Vortag der Transfektion in 6-well-Platten mit DMEM ausgesät, so dass sie bei der Transfektion 30-50% konfluent waren, wobei sich die gewählte Zelldichte nach dem jeweiligen Versuchsansatz richtete. Für die eigentliche Transfektionsreaktion wurde das Medium gegen 2 ml DMEM ohne Antibiotikum ausgetauscht. Die Bildung der siRNA-Lipid-Komplexe erfolgte, indem 4,5 µl der siRNA-Duplices (20 pmol/µl) und 5 µl Lipofectamine™ RNAiMAX zunächst in zwei separaten Ansätzen mit je 500 µl Opti-MEM verdünnt wurden. Beide Ansätze wurden dann direkt vereinigt, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die siRNA-Lipofectamine™ RNAiMAX-Komplexe zu den Zellen gegeben und diese bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48-72 h inkubiert.

Eine zusätzliche Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte nach 24 oder 48 h entsprechend den Angaben unter 3.2.4, wobei nur die Hälfte der angegebenen DNA eingesetzt wurde.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Für die meisten Untersuchungen der exprimierten oder endogenen Proteine müssen zunächst Zellextrakte hergestellt werden. Hierfür gibt es zahlreiche chemische und mechanische Vorgehensweisen, wobei sich die Aufschlussmethode immer nach der weiteren Verwendung der Proteinextrakte richtet.

##### 3.3.1.1 Zellaufschluss durch Detergenzien

Für die Aufarbeitung der Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und gegebenenfalls für weitere Untersuchungen gesichert. Die Kulturschalen wurden auf Eis platziert und die Zellen einmal mit kaltem TBS-Puffer gewaschen. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese mit Lysepuffer überschichtet und 20 min inkubiert. Die durch Detergenzeinwirkung lysierten Zellen wurden abgeschabt und das Proteinextrakt durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 g und 4°C von den größeren, unlöslichen Zellbestandteilen getrennt.

Die Menge und Art des verwendeten Lysepuffers richtete sich dabei nach der Größe der Kulturschale und der anschließenden Verwendung der Zellysate. Soweit nicht anders

angegeben wurde die Standardlyse mit TBS pH7,5 und 0,5% Triton X-100 sowie einfach konzentriertem Proteaseinhibitor-Mix durchgeführt. Spezielle Lysebedingungen sind im Folgenden angegeben bzw. werden bei den einzelnen Anwendungen aufgeführt.

### 3.3.1.2 *Boiling-SDS-Lyse*

Eine besondere Variante der Zellyse wurde für die Untersuchung von Proteinen hinsichtlich einer möglichen Modifikation mit Ubiquitin eingesetzt. Hierbei wurden die Zellen mit einem SDS-haltigen Puffer gekocht, so dass Proteininteraktionen gelöst und die Aktivität von Enzymen gestoppt wurde, welche zum Proteinabbau führen könnten.

Der Lysepuffer aus PBS mit 1% SDS, 10 mM *N*-Ethylmaleimid (NEM) und Proteaseinhibitor-Mix wurde hierbei zunächst 5 min aufgekocht und direkt auf die Zellen gegeben, welche zuvor einmal mit PBS/10 mM NEM gewaschen wurden. Diese wurden daraufhin zügig in ein Eppendorfgefäß überführt und für weitere 10 min gekocht. Da sich eine hohe SDS-Konzentration störend auf viele Anwendungen auswirkt, wurden die Lysate im Verhältnis 1:9 mit kaltem PBS mit 1,1% NP-40, 0,56% DOC, 10 mM NEM und Proteaseinhibitor-Mix verdünnt. Für einen vollständigen Aufschluss der Zellen wurden die Proben zudem 5 min auf Eis inkubiert und 20 sec durch Vortexen gemischt. Unlösliche Bestandteile wurden bei 4°C für 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert.

### 3.3.1.3 *Herstellung von nativen Zellextrakten für Pulldown-Assays*

Für die Untersuchung von Proteinbindungen in *Pulldown-Assays* wurden Zellextrakte durch mechanischen Zellaufschluss hergestellt. Hierzu wurden HuH7- oder HEK293-TT-Zellen in großen Ø12cm-Kulturschalen kultiviert bis sich ein dichter Zellrasen gebildet hatte. Die Zellen wurden einmal mit TBS gewaschen und es wurden 1 ml hypotonischer Lysepuffer mit 25 mM Tris-HCl pH7,2, 125 mM K-Acetat, 2,5 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT und Proteaseinhibitor-Mix zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurden die Zellen in einen Homogenisator überführt und mit 20 Stößen aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 6000 g pelletiert und der Überstand anschließend bei -20°C gelagert.

## 3.3.2 *Immunpräzipitation (IP)*

Die Immunpräzipitation dient der gezielten Isolierung eines Proteins aus einem Proteingemisch, wie es beispielsweise in Form der Zellextrakte vorliegt. Dies erfolgt über spezifische Antikörper, welche an Sepharose oder eine andere Trägersubstanz gekoppelt werden und das entsprechende Antigen reversibel binden. Die Analyse des Präzipitats erfolgt meist über SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot.

Je nach Aufarbeitung der Zellextrakte und Wahl der Fällungsbedingungen besteht dabei die Möglichkeit, mit dem Antigen auch dessen direkte Interaktionspartner zu fällen, welche dann

über einen zweiten spezifischen Antikörper identifiziert werden können. Man bezeichnet dies auch als Koimmunpräzipitation.

### 3.3.2.1 Immunpräzipitation mittels ProteinA-Sepharose

An Sepharose gekoppeltes ProteinA bindet vor allem IgG-Antikörper mit hoher Spezifität und eignet sich daher für zahlreiche Immunpräzipitationen mit mono- oder polyklonalen Antikörpern verschiedener Spezies.

Vor der Anwendung wurde die gewünschte Menge der in 20% Ethanol gelagerten Sepharose zunächst zweimal mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper zugegeben, deren Bindung an die Sepharose bei einer Inkubation für 4 h bei 4°C in einem Überkopfschüttler erfolgte. Um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen wurde die Sepharose daraufhin dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Fällung des Antigens wurde die beschichtete Sepharose für weitere 3 h mit dem Zellysate im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert und anschließend überschüssige und unspezifisch gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und einen Waschschrift mit 0,125 M Tris-HCl pH6,8 entfernt. Die vollständig trockengelegte Sepharose wurde dann in 1xLämmli-Puffer aufgenommen und 10 min gekocht. Die fertige Probe kann danach bei 4°C gelagert werden, wobei auch eine Lagerung bei -20°C möglich ist, sofern die Probe von der Sepharose abgenommen und in ein neues Cup überführt wurde. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot.

Ausgehend von diesem Grundprotokoll wurden für jeden Versuchsansatz die jeweiligen Pufferbedingungen, Inkubationszeiten und Arbeitsabfolgen optimiert bzw. Arbeitsschritte ergänzt. Auch das jeweils beste Verhältnis von Antigen, Antikörper und Sepharose wurde individuell bestimmt. Die wichtigsten Protokolle sind dabei im Folgenden kurz aufgeführt.

#### 3.3.2.1.1 Protokoll A - IP zur Interaktion von $\gamma$ 2-Adaptin mit Core bzw. L

Lysepuffer: 200 mM NaCl  
5 mM HEPES-KOH pH7,5  
2% CHAPS  
20 mM NEM  
1x Proteaseinhibitor-Mix

Waschpuffer: 200 mM NaCl  
50 mM HEPES-KOH pH 7,5  
2% CHAPS

Die Zellen einer  $\varnothing 10$  cm-Schale wurden drei Tage nach der Transfektion (2.2.3.) mit 1 ml Lysepuffer, wie unter 2.3.1. beschrieben, aufgeschlossen. Für die Kontrolle der Proteinexpression wurden davon 60  $\mu$ l mit 20  $\mu$ l 4xLämmli-Puffer für 5 min aufgekocht und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die restlichen Zelllysate wurden vor der eigentlichen Fällung mit unbeschichteter ProteinA-Sepharose vorgereinigt, um später unspezifische Bindungen an die Sepharose zu verhindern. Dazu wurde jedes Lysat mit 50  $\mu$ l gewaschener ProteinA-Sepharose für 1 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend in ein neues Cup überführt.

Die Beschichtung der Sepharose erfolgte, indem je Probe 75  $\mu$ l ProteinA-Sepharose zweimal mit TBS gewaschen und anschließend 2 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einem Überkopfschüttler mit den Antikörpern inkubiert wurde. Für die Fällung des HBV-L-Proteins wurde dabei je Probe 7  $\mu$ l K37- und 7  $\mu$ l K38-Kaninchenserum eingesetzt, während für das Core-Protein ein Mix aus je 10  $\mu$ l K45- und K46-Kaninchenserum verwendet wurde. Um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die beschichtete Sepharose zweimal mit TBS gewaschen und mit TBS auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

Für die Proteinfällung wurde jede Probe mit 75  $\mu$ l der beschichteten Sepharose und 1% BSA für 4 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit je 750  $\mu$ l des angegebenen Waschpuffers. Abschließend wurde mit 0,125 M Tris-HCl pH6,8 gewaschen und die vollständig trockengelegte Sepharose in 70  $\mu$ l 1xLämmli-Puffer aufgenommen und 10 min gekocht. Die fertigen Proben wurden von der Sepharose abgenommen und in einem neuen Eppendorfgefäß bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.3.2.1.2 Protokoll B - IP zur Interaktion von $\gamma 2$ -Adaptin und Nedd4

Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl pH7,5  
150 mM NaCl  
10 mM NEM  
1x Proteaseinhibitor-Mix  
0,5% Triton X-100  
0,01% DOC

Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl pH7,5  
150 mM NaCl  
0,5% Triton X-100  
1x Proteaseinhibitor-Mix

Die Zellen einer  $\varnothing 6$  cm-Schale wurden drei Tage nach der Transfektion mit 600  $\mu$ l Lysepuffer, wie unter 2.3.1. beschrieben, aufgeschlossen. Die Vorreinigung der Lysate erfolgte mit je 40  $\mu$ l unbeschichteter, gewaschener ProteinA-Sepharose für eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Anders als bei den zuvor beschriebenen Protokollen erfolgte bei diesem Versuchsansatz keine separate Beschichtung der Sepharose. Die Antikörper wurden direkt zu den

vorgereinigten Lysaten gegeben, wobei je Probe 3  $\mu\text{l}$   $\alpha\text{Flag}$ -Antikörper für die Fällung von Nedd4 bzw. 8  $\mu\text{l}$   $\alpha\text{HA}$ -Antikörper für die Fällung von  $\gamma\text{2-Adaptin}$  eingesetzt wurden. Die Antikörper-Bindung erfolgte während einer Inkubation der Proben für mindestens 4 h oder über Nacht ruhend bei 4°C. Anschließend wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe an die Sepharose gekoppelt. Dazu wurde jeder Probe 50  $\mu\text{l}$  gewaschene ProteinA-Sepharose zugegeben und der Ansatz mindestens 2 h bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Überschüssige, ungebundene Proteine und Antikörper wurden durch dreimaliges waschen mit je 800  $\mu\text{l}$  Waschpuffer und einem Waschschrift mit 800  $\mu\text{l}$  0,125 M Tris-HCl pH6,8 entfernt. Die vollständig trockengelegte Sepharose wurde anschließend in 70  $\mu\text{l}$  1xLämmli-Puffer für 10 min gekocht und die denaturierte Probe ohne Sepharose bei -20°C gelagert.

### 3.3.2.2 Immunpräzipitation mittels *Dynabeads*

Bei verschiedenen Versuchsansätzen wurden für die Proteinfällung magnetische *beads* verwendet, die bereits mit einem Spezies-spezifischen Antikörper vorbeschichtet waren (*Dynabeads*® M-280 *Sheep anti-mouse* bzw. *-rabbit IgG*; Dynal/Invitrogen). Die Antigen-spezifischen Antikörper werden dadurch sehr spezifisch und effektiv gebunden. Ein weiterer Vorteil dieses Systems besteht in der Möglichkeit, die Antikörper kovalent zu koppeln, wodurch diese beim Aufkochen mit Lämmli-Puffer nicht in das Präzipitat gelangen und bei der späteren Analyse möglicherweise andere Proteinsignale überlagern.

*Dynabeads* wurden nach dem folgenden Protokoll zur Untersuchung der Ubiquitinierung von  $\gamma\text{2-Adaptin}$  und Nedd4, sowie bei Analysen zur Interaktion von  $\gamma\text{2-Adaptin}$  und Nedd4 eingesetzt.

Zur Untersuchung von Zelllysaten einer Ø6 cm-Schale, wurden je Probe 25  $\mu\text{l}$  *Dynabeads* eingesetzt und diese in einem Gesamtansatz zunächst zweimal mit 1 ml PBS/0,1% BSA gewaschen. Hierbei wurden spezielle magnetische Halterungen verwendet, durch die die *Dynabeads* an die Gefäßwand gezogen wurden, wodurch die Überstände ohne Verluste abgenommen werden konnten. Die *beads* wurden daraufhin im Ausgangsvolumen bzw. mindestens 300  $\mu\text{l}$  PBS/0,1% BSA aufgenommen.

Je nach Versuchsansatz, folgte die Beschichtung mit den Antigen-spezifischen Antikörpern aus Maus oder Kaninchen, wobei diese zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert wurde. Für monoklonale Antikörper aus Maus, wie beispielsweise  $\alpha\text{Flag}$  oder  $\alpha\text{HA}$ , wurden dabei je Probe 2-3  $\mu\text{l}$  eingesetzt, für polyklonale Kaninchenserum etwa 10  $\mu\text{l}$ .

Um die Antikörper kovalent zu koppeln wurden die *beads* nach der eigentlichen Beschichtung zunächst zweimal mit je 1 ml 0,2 M Triethanolamin pH8,2 gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml einer frischen Lösung aus 20 mM Dimethyl Pimelimidate (DMP) in 0,2 mM Triethanolamin resuspendiert und 30 min bei 20°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und durch 1 ml 50 mM Tris-HCl

pH7,5 ersetzt und es folgte eine weitere Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Die gekoppelten *beads* wurden weitere dreimal mit 1 ml PBS/0,1% BSA gewaschen und im Ausgangsvolumen von 25 µl je Probe in PBS/0,1% BSA aufgenommen. Diese wurde dann für die eigentliche Fällung zu den Lysaten gegeben und 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Ungebundene Proteine wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml PBS/0,2% Triton X-100 und einem Waschriff mit 1 ml PBS entfernt.

Die Proben wurden schließlich in 75 µl 1xLämmli-Puffer aufgenommen und 10 min gekocht. Für die Lagerung bei -20°C wurden die Proben von den *beads* abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

### 3.3.3 *Pulldown-Assay* mittels Ubiquitin-Agarose

Um Proteine bezüglich einer möglichen Interaktion mit Ubiquitin zu untersuchen, wurden Zelllysate mit einer Ubiquitin-gekoppelten Agarose inkubiert und das Präzipitat jeweils auf die Fällung spezifischer Proteine durch das Ubiquitin untersucht. Alle Lysate wurden dabei doppelt hergestellt und für die Negativkontrolle mit ProteinA-Agarose getestet.

Lysepuffer: 50 mM HEPES-KCl pH7,5  
75 mM NaCl  
0,25% Triton X-100  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1x Proteaseinhibitor-Mix

Waschpuffer: 25 mM HEPES-KCl pH 7,4  
75 mM NaCl  
0,25% Triton X-100

Transfizierte Zellen einer Ø10 cm-Schale wurden drei Tage nach der Transfektion wie unter 2.3.1 beschrieben mit je 1 ml Lysepuffer aufgeschlossen. Um gleiche Voraussetzungen zu bieten wurden jeweils die beiden gleichen Lysate zusammengefügt.

Für die Präzipitation wurden die Lysate auf zwei Ansätze aufgeteilt und dabei einmal mit 50 µl Ubiquitin-Agarose bzw. für die Kontrolle mit 50 µl ProteinA-Agarose und jeweils 0,1% BSA inkubiert. Dies erfolgte für 4 h bei 4°C im Überkopfschüttler.

Zum Entfernen überschüssiger, ungebundener Proteine wurde dreimal mit 750 µl Waschpuffer und einmal mit 0,125 M Tris-HCl pH6,8 gewaschen. Die Agarose wurde anschließend in 45 µl 1xLämmli-Puffer für 5 min gekocht und die Proben gegebenenfalls über Nacht bei 4°C gelagert. Vor der Analyse durch SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben erneut erhitzt.



### 3.3.4 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden die gewünschten DNA-Fragmente in den pGEX-3X Expressionsvektor kloniert und in den Expressionsstamm *E.coli* TG1 transformiert. Die Expression der Proteine wurde dann in frischen Bakterienkulturen mit logarithmischer Wachstumsphase durch IPTG-Zugabe induziert.

Um dabei eine ausreichende Menge frischer Bakterienkultur zu erhalten, wurde zunächst eine Vorkultur von 100 ml LB Medium/Ampicillin mit 500 µl Bakterienkultur eines Einzelklons angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Hiervon wurden dann zwei frische Kulturen à 600 ml LB Medium/Ampicillin mit je 30 ml der Vorkultur angesetzt ( $OD_{600} \sim 0,2-0,3$ ) und bei 37°C und 200 rpm inkubiert bis eine  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 erreicht wurde. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von je 6 ml 100 mM IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert und erfolgte für weitere 4 h bei 37°C. Die Bakterien wurden anschließend für 20 min bei 4°C und 6000 g zentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert.

Für den Aufschluss der Bakterien wurde dieses zunächst auf Eis aufgetaut und in drei Zyklen abwechselnd für 30 sec in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Das Pellet wurde anschließend in 15 ml Lysepuffer aus 50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA und Proteaseinhibitor-Mix resuspendiert und auf Eis dreimal für 45 sec mit Ultraschall bei etwa 60 Hz behandelt. Die Zelltrümmer wurden 30 min bei 10.000 g abzentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinanteilen für die Aufreinigung der Fusionsproteine verwendet.

Die Fällung der GST-Fusionsproteine erfolgte dabei über die Bindung an Glutathion-Sepharose 4B (Amersham). Dazu wurden 0,8 ml der Sepharose mit 8 ml PBS gewaschen, in 0,6 ml frischem PBS aufgenommen und zu dem Bakterienüberstand gegeben, wobei die Bindung während der Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur in einem Überkopffrotor erfolgte. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit je 6 ml kaltem PBS gewaschen.

Für die Elution der Fusionsproteine wurde die Sepharose vollständig trockengelegt und in 0,6 ml frischem Elutionspuffer aus 50 mM Tris-HCl pH8 mit 10 mM Glutathion vorsichtig resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler wurde das Eluat abgenommen. Der Elutionsschritt wurde dreimal wiederholt. Die Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot kontrolliert.

Um die GST-Fusionsproteine für *Pulldown-Assays* wieder an Glutathion-Sepharose koppeln zu können, wurden die Proben über Nacht in PBS dialysiert.

### 3.3.5 *Pulldown-Assay* für GST-Fusionsproteine

Eine Möglichkeit zur Untersuchung von Proteininteraktionen bieten Bindungsstudien mit immobilisierten GST-Fusionsproteinen. Für diese *Pulldown-Assays* wurden GST-Fusionsproteine wie unter 2.3.3 beschrieben in Bakterien exprimiert und an Glutathion-

Sepharose gebunden. Pro Ansatz wurden dabei 60 µl Glutathion-Sepharose zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend für die Beschichtung mit den GST-Proteinen inkubiert. Hierbei besteht die Möglichkeit, die Sepharose direkt durch Inkubation mit dem Bakterienüberstand zu beschichten oder definierte Mengen bereits aufgereinigter GST-Proteine in PBS zuzugeben. In beiden Fällen erfolgte die Bindung für 1,5 h bei Raumtemperatur in einem Überkopfrotor, woraufhin die Sepharose zweimal mit Waschpuffer aus 25 mM Tris-HCl pH7,2, 125 mM K-Acetate, 2,5 mM Mg-Acetate, 1 mM DTT und 0,1% Triton X-100 gewaschen wurde. Die eigentliche Fällung möglicher Interaktionspartner der gekoppelten GST-Fusionsproteine erfolgte bei der Inkubation mit Zellextrakten, die entsprechend den Angaben unter 2.3.1.3 hergestellt wurden. Hierzu wurde jeder Ansatz mit 1 ml Lysat für 2 h bei 4°C in einem Überkopfrotor geschüttelt. Die Sepharose wurde daraufhin viermal mit dem oben angegebenen Waschpuffer gewaschen, vollständig trockengelegt und mit 70 µl 1xLämmli-Puffer für 5 min gekocht. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot.

### 3.3.6 Assay zur Analyse der Membranassoziation von Proteinen

Um Proteine bezüglich einer möglichen Bindung an Membranen zu untersuchen, wurden Zellextrakte hergestellt und die löslichen und membranassoziierten Bestandteile durch Zentrifugation getrennt.

Hierzu wurden transfizierte Zellen einer Ø6 cm-Schale 2-3 Tage nach der Transfektion mechanisch aufgeschlossen. Hierzu wurden diese zunächst mit TBS gewaschen und anschließend mit einem hypotonischen Puffer, in diesem Fall je 1 ml 0,1-fach konzentriertem TBS, für 10 min auf Eis inkubiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Um die aufgeblähten Zellen zum Platzen zu bringen, wurde diese mit einer Spritze viermal durch eine 26G-Kanüle gezogen und anschließend mit zwanzig Stößen in einem Homogenisator behandelt. Durch Zugabe von 100 µl 10-fach konzentriertem TBS wurden die Lysate auf einfache TBS-Pufferbedingungen eingestellt und unvollständig aufgeschlossene Zellen anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 2500 g und 4°C pelletiert. Das Pellet diente der späteren Kontrolle der Proteinexpression und wurde in 200 µl 1xLämmli-Puffer aufgenommen und für 10 min gekocht.

Der vorgeklärte Überstand wurde vollständig auf ein Saccharosekissen aus 250 mM in TBS gelöster Saccharose geschichtet und in einer Ultrazentrifuge (Beckman) für 45 min bei 160.000 g und 4°C mit einem SW60-Rotor zentrifugiert. Bei diesem Vorgang werden die Membrananteile pelletiert, während lösliche Proteine im Überstand bleiben. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und zur weiteren Bearbeitung gesichert. während das Pellet in 200 µl 1xLämmli-Puffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert wurde. Das resuspendierte Pellet wurde anschließend, noch in den SW60-Röhrchen, vorsichtig für etwa

1 min erhitzt und nach Überführen der Probe in ein Eppendorfgefäß weitere 10 min bei 100°C gekocht.

Die Proteine der löslichen Fraktion wurden aus dem Saccharose-Überstand durch eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) isoliert. Dazu wurden je Probe zweimal 1800 µl des Überstands mit jeweils 200µl TCA (100%) gemischt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 10000g und 4°C wurde das resultierende Pellet mit 500 µl einer 5%igen TCA-Lösung gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Pellet mit 500 µl Aceton gespült, 5 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Resuspendiert in 100 µl 1xLämmli-Puffer wurde die Probe anschließend 5 min bei 100°C gekocht.

Für die Analyse wurden bei der SDS-Gelelektrophorese jeweils gleiche Probenmengen der löslichen und unlöslichen Fraktion von 80 µl eingesetzt.

### 3.3.7 Aufreinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum

Bei der Herstellung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen, enthält das gewonnene Serum neben den Antikörpern auch zahlreiche Serumproteine und andere Bestandteile, die sich störend auf verschiedene Anwendungen auswirken können. Man isoliert daher die Antikörper beispielsweise über Affinitätschromatographie, wobei häufig an Sepharose gekoppeltes ProteinG genutzt wird, welches spezifisch die Fc-Region von IgG-Antikörpern bindet.

Für die Aufreinigung des gegen  $\gamma$ 2-Adaptin gerichteten  $\alpha$ 830-Antikörpers aus Kaninchenserum, wurde eine mit ProteinG-Sepharose Fast Flow (Amersham) gefüllte Säule mit einem Volumen von etwa 5 ml genutzt. Alle Schritte wurden dabei an einer FPLC-Anlage durchgeführt, wobei der Proteinfluss über spektroskopische Messung mit einer UV-Einheit und einem Schreiber überwacht wurde. Alle verwendeten Puffer, sowie das Antiserum wurden sterilfiltriert um ein Verstopfen der Säule oder der Leitungen durch Verunreinigungen zu verhindern.

Zunächst wurde die in 20% Ethanol gelagerte Säule mit 15 ml Bindungspuffer (20 mM Na-Phosphatpuffer pH7) äquilibriert. Anschließend wurden 3 ml des 1:1 mit Bindungspuffer verdünnten  $\alpha$ 830-Kaninchenserums mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule gegeben, wobei die Antikörper an ProteinG binden. Die Säule wurde anschließend so lange mit Bindungspuffer gespült, bis keine ungebundenen Proteine mehr im Durchfluss detektiert werden konnten. Das Ablösen der Antikörper erfolgt durch einen stark sauren pH-Wert, weshalb für die Elution ein Puffer mit 0,1 M Glycin-HCl pH2,7 über die Säule geleitet wurde. Das Eluat wurde direkt in Fraktionen von je 500 µl gesammelt und mit 25 µl 1MTris-HCl pH9 neutralisiert. Sobald keine Proteine mehr im Säulendurchfluss detektiert werden konnten, wurde die Säule mit 15 ml Bindungspuffer wieder äquilibriert und zur Lagerung mit 15 ml 20% Ethanol gewaschen und verschlossen.

Für die einzelnen Fraktionen wurde eine Proteinbestimmung nach der BCA-Methode mit dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ (Pierce) durchgeführt und die positiven Fraktionen vereinigt. Für die langfristige Lagerung wurden diese mit PBS dialysiert und Aliquots bei -20°C gelagert.

### 3.3.8 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Untersuchung von Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden diese in 6-well-Platten direkt auf abgeflamnten Deckgläschen ausgesät, gegebenenfalls transfiziert und vor der eigentlichen Färbung hierauf fixiert. Der Zeitpunkt der Fixierung richtete sich hierbei nach dem jeweiligen Versuchsansatz. Die Analyse endogener Proteine konnte nach 24 h erfolgen, während bei Transfektion mit Plasmid-DNA eine Expressionszeit von weiteren 24 h und bei Behandlung mit siRNA eine Inkubation von mindestens 48 h notwendig war.

#### **Standartprotokoll**

Für die Standartfärbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann 2-4 min mit kaltem Methanol/0,2 M EGTA bei -20°C fixiert und dieses anschließend durch mehrmaliges Waschen mit reichlich PBS entfernt. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurde Serum der Spezies des sekundären Antikörpers 1:20 in PBS verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit dem spezifisch in PBS verdünnten primären Antikörper für 1 h bei 37°C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden anschließend durch Waschen mit PBS entfernt, bevor der sekundäre Antikörper ebenfalls für 1 h bei 37°C zugegeben wurde. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Zellen daraufhin noch für 10 min mit dem im Verhältnis 1:20000 in PBS verdünnten Farbstoff Höchst 33342 inkubiert. Abschließend wurden die Präparate über 30 min mehrfach mit PBS gewaschen und mit Fluoprep Einbettungsmedium auf einen Objektträger überführt.

#### **Protokoll zur Färbung mit dem LBPA-Antikörper**

Ein alternatives Protokoll zum Fixieren und Färben der Zellen wurde vorwiegend bei der Färbung mit dem LBPA-Antikörper verwendet, ist aber auch für andere Antikörper geeignet. Die Zellen wurden hierbei mit 4% Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Zum Permeabilisieren der Zellen wurde 50 mM NH<sub>4</sub>Cl für 10 min bei Raumtemperatur zugegeben. Dieses wurde dann ebenfalls durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,2% BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde anschließend der primäre Antikörper für 1 h bei 37°C zugegeben. Dieser wurde in PBS mit 0,05% Saponin verdünnt, was zusätzlich eine Permeabilisierung der Zellen bewirkt. Die Präparate wurden daraufhin erneut dreimal mit

PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei 37°C folgte. Für die Kernfärbung wurde im Anschluss 10 min der in PBS verdünnte Höchst 33342-Farbstoff zugegeben. Die Zellen wurden dann mehrfach mit PBS gewaschen und in Fluoprep-Medium auf Objektträgern eingebettet.

### 3.3.9 EGF-Assay

Der *Epidermal Growth Factor* (EGF) ist ein Wachstumsfaktor, welcher an seinen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche bindet und mit diesem zusammen von der Zelle internalisiert wird. Innerhalb der Zelle werden EGF und Rezeptor zu den Multivesikulären Endosomen (MVB) transportiert, wo ihr Abbau stattfindet. Um Defekte beim Transportweg oder der Bildung von MVBs zu untersuchen, benutzt man Fluorochrom-markiertes EGF, welches sich durch Fluoreszenzmikroskopie in der Zelle beobachten lässt.

Für diese Untersuchung wurden die Zellen wie unter 2.3.7. beschrieben auf Deckgläsern kultiviert und je nach Versuchsansatz beispielsweise mit Plasmid-DNA (2.2.3) und/oder siRNA (2.2.4) transfiziert. Vor der eigentlichen Behandlung mit EGF wurden die Zellen zunächst unter Mangelbedingungen für mindestens 1 h in serumfreiem Opti-MEM kultiviert. Anschließend wurde das Medium gegen Opti-MEM mit 0,2 µg/ml EGF Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) ausgetauscht und die Zellen im dunklen Brutschrank bei 37°C inkubiert. Für die Analyse der Aufnahme und Verteilung von EGF in den Zellen wurde die EGF-Lösung nach 30 min abgenommen, die Zellen einmal mit Opti-MEM gewaschen und anschließend fixiert (siehe 2.3.8). Um Defekte beim Transport oder dem Abbau und damit eine Akkumulation von EGF in den Zellen zu beobachten, wurden diese nach den 30 min einmal mit Opti-MEM gewaschen und mit frischem Opti-MEM für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Fixiert wurden die Zellen dann entsprechend den Angaben unter 2.3.8.

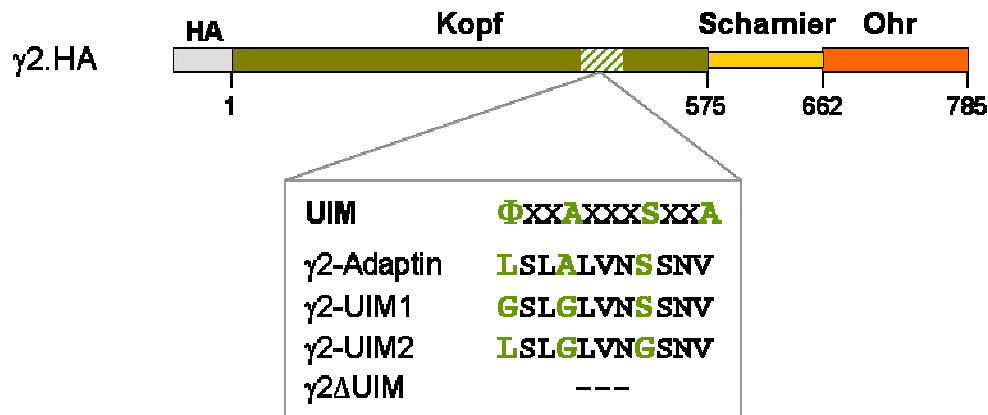
## 4 ERGEBNISSE

Grundlegend für die hier durchgeführten Untersuchungen waren vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen das mutmaßliche Adaptorprotein  $\gamma 2$ -Adaptin als spezifischer Interaktionspartner des HBV-L-Proteins identifiziert werden konnte (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001). Genauere Analysen zeigten, dass durch die Reduktion von  $\gamma 2$ -Adaptin die Freisetzung von HBV-Partikeln beeinträchtigt wird, woraus die Hypothese resultierte, dass  $\gamma 2$ -Adaptin an der Umhüllung und/oder Freisetzung von HBV beteiligt ist (Dissertation Thome, 2007; Rost et al., 2006). Die Wirkungsweise von  $\gamma 2$ -Adaptin, sowohl auf zellulärer Ebene, als auch bei der HBV-Morphogenese, ist bislang noch nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die zelluläre Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin genauer zu charakterisieren, um dadurch neue Hinweise zu erhalten, in welcher Form  $\gamma 2$ -Adaptin die Sprossung und Ausschleusung von HBV beeinflusst.

### 4.1 Untersuchungen zur Verknüpfung von $\gamma 2$ -Adaptin und Ubiquitin

#### 4.1.1 Analyse der Primärsequenz von $\gamma 2$ -Adaptin

Um Anhaltspunkte für die Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin zu erhalten, wurde eine *In silico*-Analyse der Primärsequenz vorgenommen. Dabei konnte in der N-terminalen Kopfregion ein Sequenzmotiv identifiziert werden, welches Homologie zu einem Ubiquitin-Interaktionsmotiv (UIM) zeigt. Charakterisiert wird ein solches UIM durch die Konsensus-Sequenz  $\Phi XXAXXXSXXe$ , bei der die Positionen einer hydrophoben Aminosäure  $\Phi$  zu Beginn, sowie Alanin und Serin hochkonserviert sind, und am Ende häufig noch eine saure Aminosäure (AS)  $e$  vorliegt (Hofmann & Falquet, 2001). Wie der in Abbildung 4-1 dargestellte Vergleich zeigt, stimmen die Aminosäuren 369-377 von  $\gamma 2$ -Adaptin weitgehend mit dem UIM überein, wobei lediglich die saure Aminosäure am Ende des Motivs fehlt.

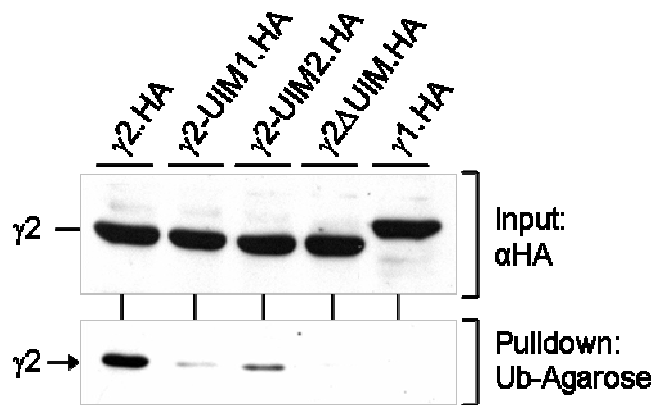


**Abb. 4-1** Schematische Darstellung des Ubiquitin-Interaktionsmotivs von  $\gamma 2$ -Adaptin und den hergestellten UIM-Mutanten.  $\gamma 2$ -Adaptin trägt ein mögliches UIM an den Positionen 369-377, das in den konservierten AS  $\Phi$ , Alanin und Serin mit der bekannten Konsensus-Sequenz übereinstimmt. Für eine funktionelle Analyse wurden die Punktmutanten  $\gamma 2$ -UIM1 und  $\gamma 2$ -UIM2 sowie eine Deletionsmutante  $\gamma 2$ - $\Delta$ UIM generiert.

#### 4.1.2 $\gamma 2$ -Adaptin interagiert über ein UIM mit Ubiquitin

Ob es sich bei dem identifizierten Motiv tatsächlich um ein funktionelles UIM handelt und  $\gamma 2$ -Adaptin folglich mit Ubiquitin interagieren kann, wurde in *Pulldown*-Studien mit Ubiquitin-beschichteter Agarose untersucht. Dabei wurden Lysate transfizierter HuH7-Zellen mit Ubiquitin-Agarose inkubiert und die gebundenen Proteine durch Western-Blot-Analyse untersucht. Neben HA-markiertem  $\gamma 2$ -Adaptin, wurde dabei auch  $\gamma 1$ -Adaptin getestet. Dabei zeigen die Resultate deutlich, dass  $\gamma 2$ -Adaptin durch Ubiquitin gefällt werden kann, während  $\gamma 1$ -Adaptin keine Interaktion zeigt (Abb.4-2). Obwohl  $\gamma 1$ -Adaptin eine starke Homologie zu  $\gamma 2$ -Adaptin besitzt, fehlt hier das mögliche UIM-Motiv. Funktionelle Unterschiede könnten somit darauf beruhen, dass nur  $\gamma 2$ -Adaptin in Wechselwirkung mit Ubiquitin und ubiquitinierten Proteinen treten kann.

Um zu klären, ob die Bindung tatsächlich durch das mögliche UIM-Motiv vermittelt wird, wurden UIM-Mutanten von  $\gamma 2$ -Adaptin generiert und bezüglich ihrer Fähigkeit Ubiquitin zu binden untersucht. Hierzu wurden die im UIM konservierten Aminosäuren durch Punktmutationen ausgetauscht ( $\gamma 2$ -UIM1;  $\gamma 2$ -UIM2) oder das Motiv vollständig deletiert ( $\gamma 2$ - $\Delta$ UIM) (Abb.4-1). Bei gleicher Versuchsdurchführung konnte dabei gezeigt werden, dass Veränderungen des Motivs zu einer stark reduzierten Fällung der  $\gamma 2$ -Mutanten führen bzw. dass keine Interaktion mehr mit Ubiquitin stattfindet, wenn das Motiv fehlt (Abb.4-2).



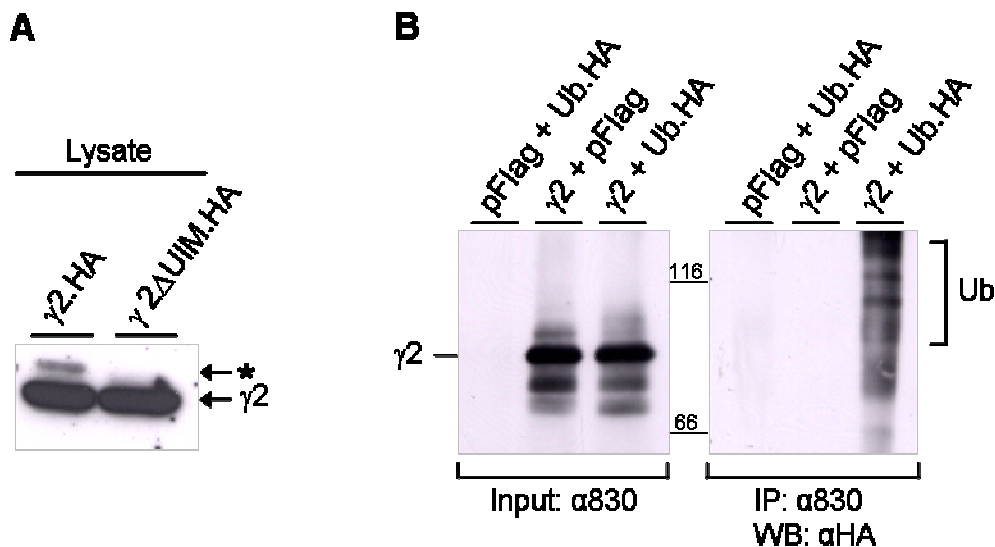
**Abb. 4-2**  $\gamma$ 2-Adaptin interagiert in UIM-abhängiger Weise mit Ubiquitin. HuH7-Zellen wurden mit HA-markiertem  $\gamma$ 1-Adaptin,  $\gamma$ 2-Adaptin oder den UIM-Mutanten transfiziert. Die Expression wurde durch Western-Blot-Analyse mit einem HA-Antikörper kontrolliert (Input). Zum Test der Interaktion mit Ubiquitin wurden die Lysate mit Ubiquitin-gekoppelter Agarose inkubiert und die gebundenen Proteine anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western-Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper analysiert (Pulldown).

#### 4.1.3 UIM-abhängige Ubiquitinierung von $\gamma$ 2-Adaptin

Für zahlreiche Proteine, die ein UIM-Motiv tragen, wurde gezeigt, dass sie selbst durch eine Ubiquitinierung modifiziert werden (Polo *et al.*, 2002; Hicke *et al.*, 2005). Hinweise darauf, dass auch  $\gamma$ 2-Adaptin eine solche Modifikation tragen könnte, ergaben sich bei der Analyse von Zelllysaten transfizierter Zellen, die HA-markiertes  $\gamma$ 2-Adaptin bilden. Insbesondere nach dem Aufschluss der Zellen unter denaturierenden Bedingungen, durch den ein Proteinabbau im Lysat weitgehend verhindert wird, lässt sich im HA-spezifischen Immunoblot neben dem erwarteten  $\gamma$ 2-Signal mit der Größe von 90 kDa eine zusätzliche Bande bei etwa 96 kDa detektieren (Abb.4-3A). Bei längerer Exposition werden zudem weitere höhermolekulare Banden sichtbar, die ein leiterartiges Muster bilden und auf mehrere Modifikationen von  $\gamma$ 2-Adaptin hindeuten (nicht dargestellt). Da für die Deletionsmutante  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM solche Signale nicht detektiert werden konnten, scheinen die zusätzlichen Formen von  $\gamma$ 2-Adaptin in Abhängigkeit vom UIM zu entstehen. Ob es sich bei dem detektierten Signal tatsächlich um eine ubiquitinierte Form von  $\gamma$ 2-Adaptin handelt, wurde über Immunpräzipitations-Analysen untersucht. Hierzu wurde unmarkiertes  $\gamma$ 2-Adaptin zusammen mit HA-markiertem Ubiquitin in HuH7-Zellen exprimiert und diese durch denaturierende Lyse mit kochendem SDS-Puffer aufgeschlossen. Bestehende Proteininteraktionen werden unter diesen Bedingungen gelöst, so dass nur direkte Modifikationen der Proteine erhalten bleiben. Nach der Fällung mit einem  $\gamma$ 2-spezifischen Antikörper konnten daher im Western-Blot nur kovalent-gebundenes Ubiquitin über einen HA-Antikörper nachgewiesen werden. Wie Abb. 4-3B zeigt, sind dabei für  $\gamma$ 2-Adaptin tatsächlich eindeutige Ubiquitinsignale detektierbar.  $\gamma$ 2-Adaptin wird folglich

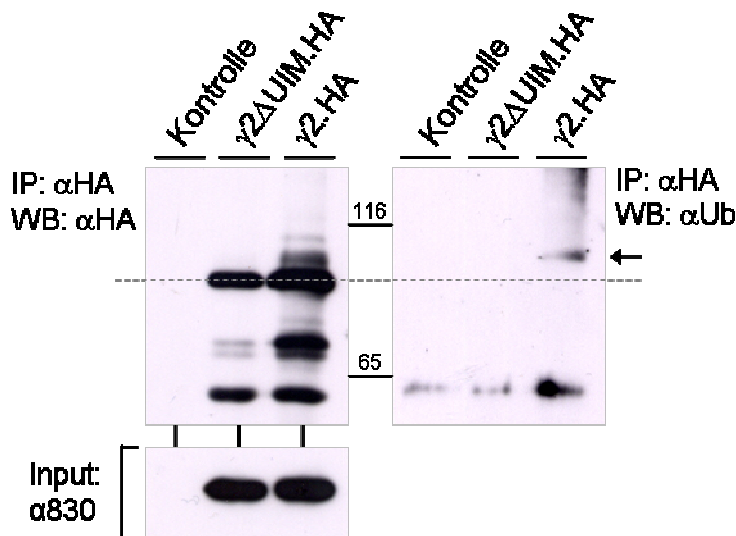


ubiquitiniert, wobei vermutlich mehrere Ubiquitinmoleküle in Form einer Poly- oder Multiubiquitinierung gebunden sind.



**Abb. 4-3 Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin.** **A**  $\gamma 2$ .HA- bzw.  $\gamma 2\Delta$ UIM-exprimierende Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen. Die Analyse der Lysate erfolgte im Western-Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper. **B** HuH7-Zellen wurden mit  $\gamma 2$ -Adaptin und HA-markiertem Ubiquitin transfiziert und mit kochendem SDS-Puffer aufgeschlossen. Nach Fällung der Lysate mit dem  $\gamma 2$ -Adaptin-spezifischen Antikörper  $\alpha 830$  (IP) wurden die Proben mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper im Western-Blot (WB) analysiert.

Da die bisherigen Daten darauf hindeuten, dass das UIM Einfluss auf die Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin hat, wurde auch die UIM-defiziente  $\gamma 2$ -Mutante ( $\gamma 2\Delta$ UIM) untersucht. Hierzu wurde ein alternativer Versuchsansatz gewählt, um damit gleichzeitig die Ubiquitin-Modifikation von  $\gamma 2$ -Adaptin in einem zweiten System zu bestätigen. Hierbei wurde  $\gamma 2$ .HA bzw.  $\gamma 2\Delta$ UIM.HA in HuH7-Zellen exprimiert und die durch kochende SDS-Lyse gewonnenen Lysate für eine HA-spezifische Immunpräzipitation eingesetzt. Die Analyse der Proben im Western-Blot erfolgte daraufhin mit einem gegen Ubiquitin gerichteten Antikörper. Entsprechend den vorangegangenen Ergebnissen konnte dabei die Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin bestätigt werden, während für die Mutante  $\gamma 2\Delta$ UIM keine Signale einer Modifikation mit Ubiquitin detektiert werden konnten (Abb.4-4). Das UIM scheint somit nicht nur die Interaktion mit Ubiquitin zu vermitteln, sondern auch die Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin selbst direkt zu beeinflussen.



**Abb. 4-4 Die Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin ist abhängig vom UIM.**  $\gamma$ 2- bzw.  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM-exprimierende HuH7-Zellen wurden mit kochendem SDS-Lysepuffer aufgeschlossen und die Lysate für eine HA-spezifische Immunpräzipitation (IP) eingesetzt. Die Analyse der Proben im Western-Blot (WB) erfolgte mit einem  $\alpha$ Ubiquitin-Antikörper.

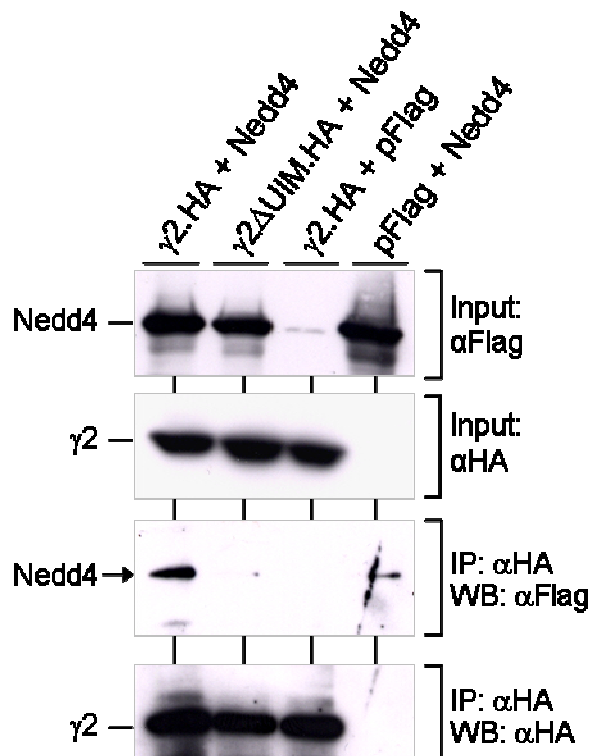
#### 4.1.4 $\gamma$ 2-Adaptin interagiert mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 in UIM-abhängiger Reaktion

Eine Modifikation mit Ubiquitin erfolgt im Allgemeinen durch Ubiquitin-Ligasen, wobei für einige UIM-tragende Proteine gezeigt werden konnte, dass hier speziell E3-Ubiquitin-Ligasen der Nedd4-Familie eine Rolle spielen (Hicke *et al.*, 2005). Da in vorangegangenen Arbeiten zudem belegt werden konnte, dass die zelluläre Ubiquitin-Ligase Nedd4.1 ebenso wie  $\gamma$ 2-Adaptin an der Morphogenese von HBV beteiligt ist (Dissertation Mann, 2007; Rost *et al.*, 2006), erscheint es durchaus möglich, dass hier eine direkte Verbindung zwischen beiden Zellfaktoren besteht.

Ob es dabei tatsächlich zu einem direkten Kontakt zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 kommt, wurden daher durch Koimmunpräzipitationen untersucht. Hierzu wurde HA-markiertes  $\gamma$ 2-Adaptin und Flag-markiertes Nedd4 in HuH7-Zellen exprimiert und die Lysate anschließend für eine HA-spezifische Fällung von  $\gamma$ 2-Adaptin eingesetzt. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden die Zellextrakte zusätzlich im Western-Blot mit HA- bzw. Flag-spezifischen Antikörpern untersucht (Input). Die Detektion von kopräzipitiertem Nedd4 erfolgte über einen  $\alpha$ Flag-Antikörper im Western-Blot. Hierbei konnte ein starkes Nedd4-Signal, welches sich deutlich vom schwachen Hintergrundsignal der Kontrollprobe abhebt, nur bei der Fällung mit  $\gamma$ 2-Adaptin gefunden werden (Abb.4-5). Folglich scheint es in der Tat zu einer direkten Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 zu kommen.

Ob das UIM-Motiv bei dieser Bindung eine Rolle spielt wurde im gleichen Versuchsansatz untersucht. Dazu wurde die Mutante  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM mit Nedd4 koexprimiert und nach der  $\gamma$ 2-

spezifischen Fällung auf gebundenes Nedd4 untersucht. In diesem Fall konnte jedoch kein Nedd4-Signal detektiert werden, so dass das UIM demnach einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion von  $\gamma 2$ -Adaptin und Nedd4 hat (Abb.4-5). Um ausschließen zu können, dass die verschieden starken Nedd4-Signale daher resultieren, dass unterschiedliche Mengen  $\gamma 2$ -Adaptin präzipitiert wurden, erfolgte zusätzlich eine Kontrolle des spezifisch gefällten  $\gamma 2$ -Adaptins. Dazu wurde dieses im gleichen Western-Blot durch einen  $\alpha$ HA-Antikörper detektiert, wobei eine gleichmäßige Fällung von  $\gamma 2$ -Adaptin nachgewiesen werden konnte.

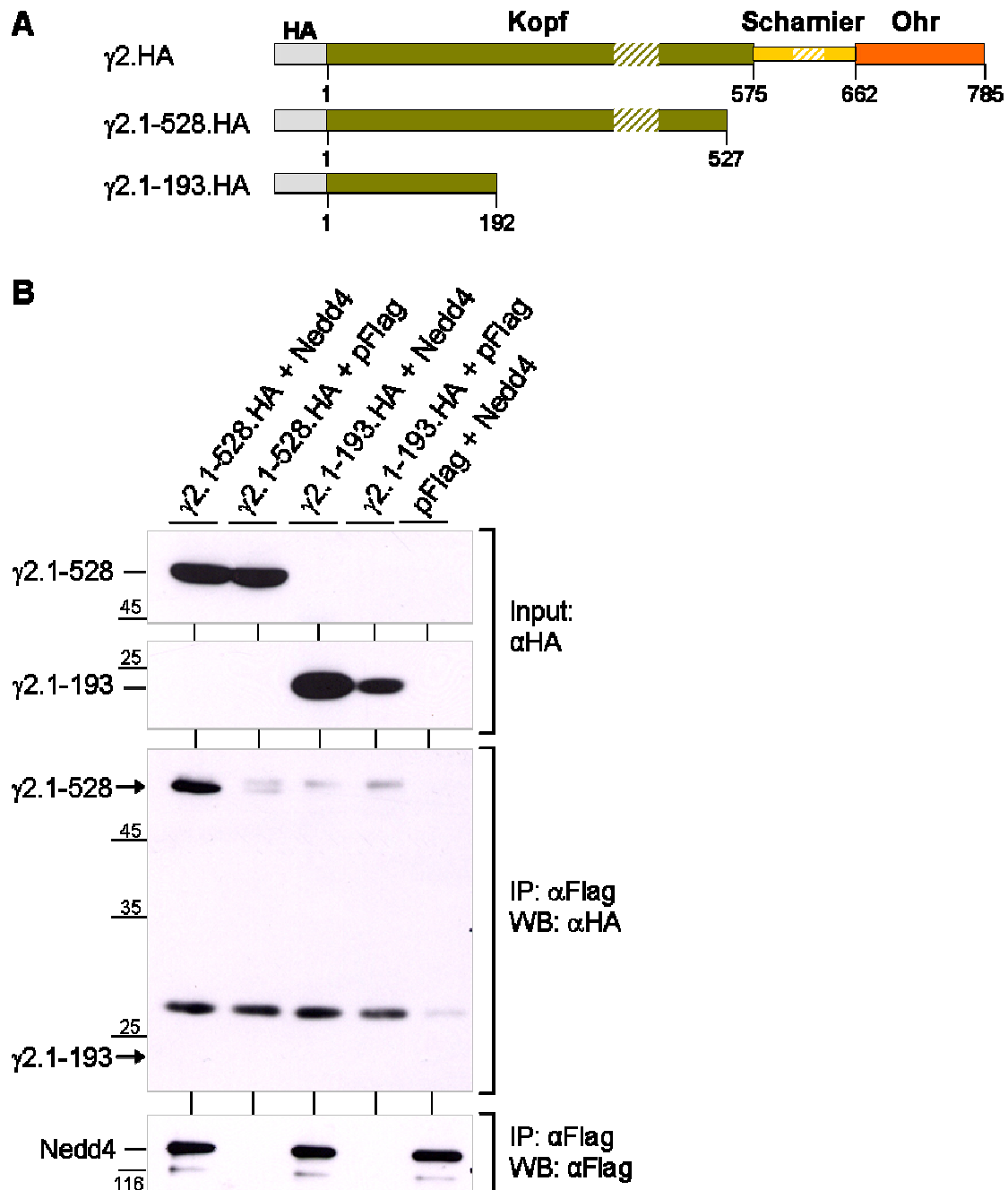


**Abb. 4-5 UIM-abhängige Interaktion von  $\gamma 2$ -Adaptin und Nedd4.** HA-markiertes  $\gamma 2$ -Adaptin bzw.  $\gamma 2\Delta$ UIM und Flag-markiertes Nedd4 wurden in HuH7-Zellen exprimiert und die gleichmäßige Proteinexpression über Epitop-spezifische Antikörper kontrolliert. Nach einer Proteinfällung mittels HA-Antikörper (IP) erfolgte der Nachweis von kopräzipitiertem Nedd4 im Western-Blot (WB) durch einen  $\alpha$ Flag-Antikörper. Um nachzuweisen, dass in allen Proben gleiche Mengen  $\gamma 2$ -Adaptin präzipitiert wurden, erfolgte die Kontrolle der Fällung durch einen  $\alpha$ HA-Antikörper.

#### 4.1.5 Lokalisation der Nedd4-Interaktionsregion in $\gamma 2$ -Adaptin

Um den für die Interaktion mit Nedd4 verantwortlichen Bereich von  $\gamma 2$ -Adaptin näher zu bestimmen, wurden ergänzend zu den in Kapitel 4.1.4 dargestellten Ergebnissen, auch verkürzte Mutanten von  $\gamma 2$ -Adaptin bezüglich ihrer Bindung an Nedd4 untersucht. Hierzu wurde die um die Ohr- und Scharnierregion verkürzte Mutante  $\gamma 2.1-528$  und eine aus den ersten 192 AS bestehende Mutante  $\gamma 2.1-193$  mit Nedd4 oder leerem Kontrollvektor pFlag in HuH7-Zellen exprimiert. Die effektive Proteinsynthese wurden im Western-Blot über Epitop-spezifische Antikörper kontrolliert und die Lysate für eine Immunpräzipitation eingesetzt. In diesem Fall erfolgte die Fällung über einen  $\alpha$ Flag-Antikörper und die Proben wurden im Western-Blot über einen  $\alpha$ HA-Antikörper auf kopräzipitiertes  $\gamma 2$ -Adaptin untersucht. Eine Interaktion mit Nedd4 konnte dabei nur für die größere  $\gamma 2.1-528$ -Mutante nachgewiesen werden, während die ersten 192 AS von  $\gamma 2$ -Adaptin alleine offenbar nicht ausreichen, um

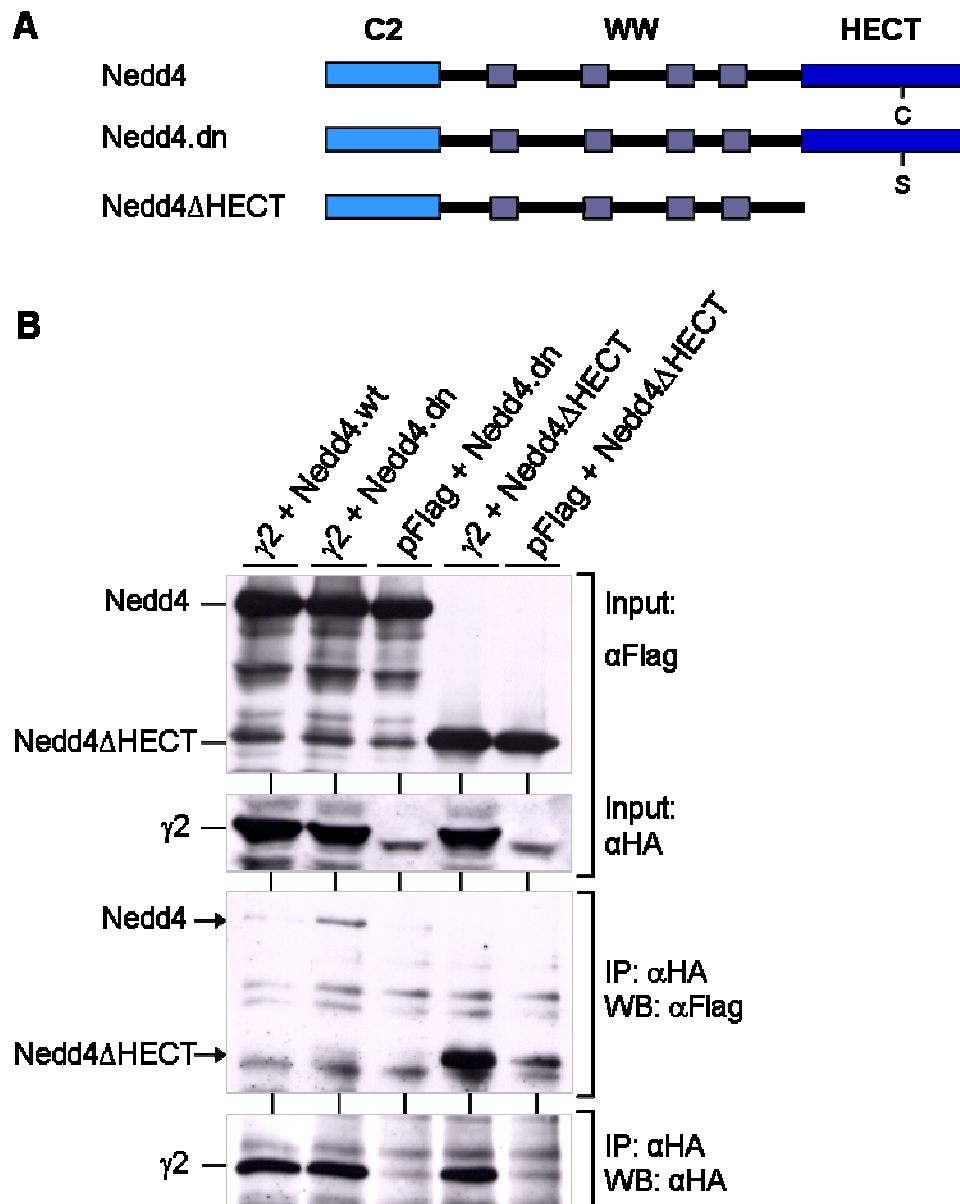
eine Bindung an Nedd4 zu vermitteln (Abb. 4-6). Folglich interagiert  $\gamma$ 2-Adaptin über den Bereich zwischen AS 192 und AS 527 mit Nedd4. Da innerhalb dieser Region auch das UIM lokalisiert ist, wird dessen Einfluss auf die Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 damit zusätzlich bekräftigt.



**Abb. 4-6**  $\gamma$ 2-Adaptin interagiert über einen Bereich zwischen AS193 und AS528 mit Nedd4. **A** Schematische Darstellung von  $\gamma$ 2-Adaptin sowie der Mutanten  $\gamma$ 2.1-528.HA und  $\gamma$ 2.1-193.HA. **B** Die verkürzten  $\gamma$ 2-Mutanten  $\gamma$ 2.1-528.HA und  $\gamma$ 2.1-193.HA wurden in HuH-7 Zellen mit Flag-markiertem Nedd4 koexprimiert und die Zellextrakte für eine Flag-spezifische Immunpräzipitation eingesetzt. Die Kopräzipitation der  $\gamma$ 2-Mutanten wurde durch einen  $\alpha$ HA-Immunoblot analysiert. Die Kontrolle der Fällung von Nedd4 erfolgte mit einem  $\alpha$ Flag-Antikörper.

#### 4.1.6 Nedd4 interagiert unabhängig von seiner katalytischen Aktivität und der HECT-Domäne mit $\gamma$ 2-Adaptin

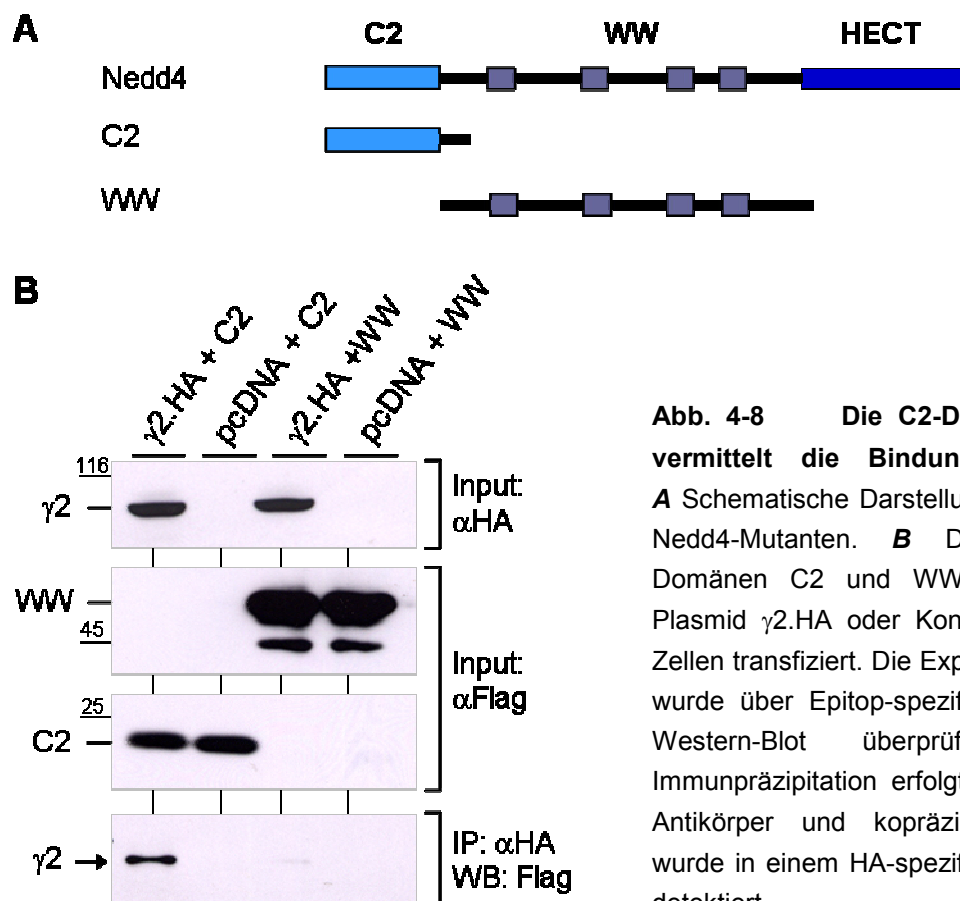
Um die Bindung zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 weiterführend zu charakterisieren, wurden verschiedene Nedd4-Mutanten bezüglich ihrer Interaktion mit  $\gamma$ 2-Adaptin untersucht. Aufgrund der bereits gezeigten Funktion des UIMs, wäre anzunehmen, dass der Kontakt über Ubiquitin vermittelt werden könnte, das im katalytischen Zentrum der HECT-Domäne von Nedd4 zu finden ist. Ob dies der Fall ist und ob zudem die katalytische Aktivität von Nedd4 eine Rolle spielt, wurde auch hier in Koimmunpräzipitationsstudien untersucht. Getestet wurde dabei eine Punktmutante von Nedd4, die aufgrund eines AS-Austauschs im katalytischen Zentrum von Cystein zu Serin nicht mehr funktionell ist (Nedd4.dn). Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage, Ubiquitin auf ein Substratprotein zu übertragen und wirkt bei der Expression in Zellen dominant-negativ (dn) auf das endogene Nedd4, welches dadurch inaktiv ist (Blot *et al.*, 2004; Segura-Morales *et al.*, 2005). Zudem wurde eine Deletionsmutante untersucht, bei der die HECT-Domäne vollständig fehlt (Nedd4 $\Delta$ HECT). Beide Flag-markierten Mutanten Nedd4.dn und Nedd4 $\Delta$ HECT wurden mit HA-markiertem  $\gamma$ 2-Adaptin oder einem leeren Kontrollvektor in HuH7-Zellen kotransfiziert und die Proteinsynthese wurde dann über Epitop-spezifische Antikörper im Western-Blot kontrolliert. Die Lysate wurden für eine HA-spezifische Proteinfällung eingesetzt und die präzipitierten Proteine über einen Flag-Antikörper detektiert. Im Vergleich zur „Positivkontrolle“ mit  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4, die hier ein sehr schwaches Signal liefert, können beide Nedd4-Mutanten klar nachgewiesen werden. Trotz einer gleichmäßigen Fällung von  $\gamma$ 2-Adaptin und vergleichbaren Mengen der eingesetzten Proteine, zeigt dabei die Nedd4-Mutante mit fehlender HECT-Domäne das stärkste Signal. Daraus lässt sich schließen, dass die Interaktion zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 unabhängig von der HECT-Domäne und damit unabhängig von der katalytischen Aktivität der Ligase erfolgt. Die Annahme, dass die Bindung zwischen dem UIM und dem an der HECT-Domäne gebundenen Ubiquitin erfolgen könnte, wurde demnach nicht bestätigt.



**Abb. 4-7 Die katalytische Domäne von Nedd4 ist nicht an der Bindung an  $\gamma$ 2-Adaptin beteiligt.** **A** Schematische Darstellung von Nedd4 und den im Folgenden verwendeten Nedd4-Mutanten. **B** Nedd4 bzw. die Mutanten Nedd4.dn und Nedd4 $\Delta$ HECT wurden mit HA-markiertem  $\gamma$ 2-Adaptin oder einem leeren Kontrollvektor in HuH7-Zellen exprimiert. Die Kontrolle der Proteinexpression erfolgte über die Detektion der HA- und Flag-Epitope im Western-Blot (Input). Mit den Lysaten wurde eine HA-spezifische Immunpräzipitation durchgeführt und das dabei kopräzipitierte Nedd4 in einem Flag-spezifischen Western-Blot analysiert. Die Fällung von  $\gamma$ 2-Adaptin wurde durch Detektion mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper kontrolliert.

#### 4.1.7 Die Interaktion mit $\gamma$ 2-Adaptin erfolgt über die C2-Domäne von Nedd4

Da die katalytische HECT-Domäne von Nedd4 nicht an der Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin beteiligt ist, wurden im Folgenden andere Bereiche von Nedd4 genauer untersucht. Die hierfür eingesetzten Mutanten bestehen aus dem N-terminalen Bereich, der durch eine C2-Domäne charakterisiert ist (C2), oder dem zentralen Teil des Proteins, den die Wiederholung einer WW-Domäne kennzeichnet (WW). Die beiden Flag-markierten Mutanten wurden mit  $\gamma$ 2-Adaptin oder leerem Kontrollvektor in HuH7-Zellen kotransfiziert und die Zellextrakte mit einem Flag-spezifischen Antikörper inkubiert. Wie die Analyse der präzipitierten Proteine im Western-Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper zeigt, konnte  $\gamma$ 2-Adaptin dabei nur durch die C2-Domäne von Nedd4 effektiv gefällt werden. Während hier also eine deutliche Interaktion vorliegt, erfolgt dagegen keine Reaktion der WW-Domäne mit  $\gamma$ 2-Adaptin. Dieser Befund ist unerwartet, da häufig die WW-Domäne die Interaktion von Nedd4 mit anderen Proteinen vermittelt (Ingham *et al.*, 2004; Shearwin-Whyatt *et al.*, 2006).

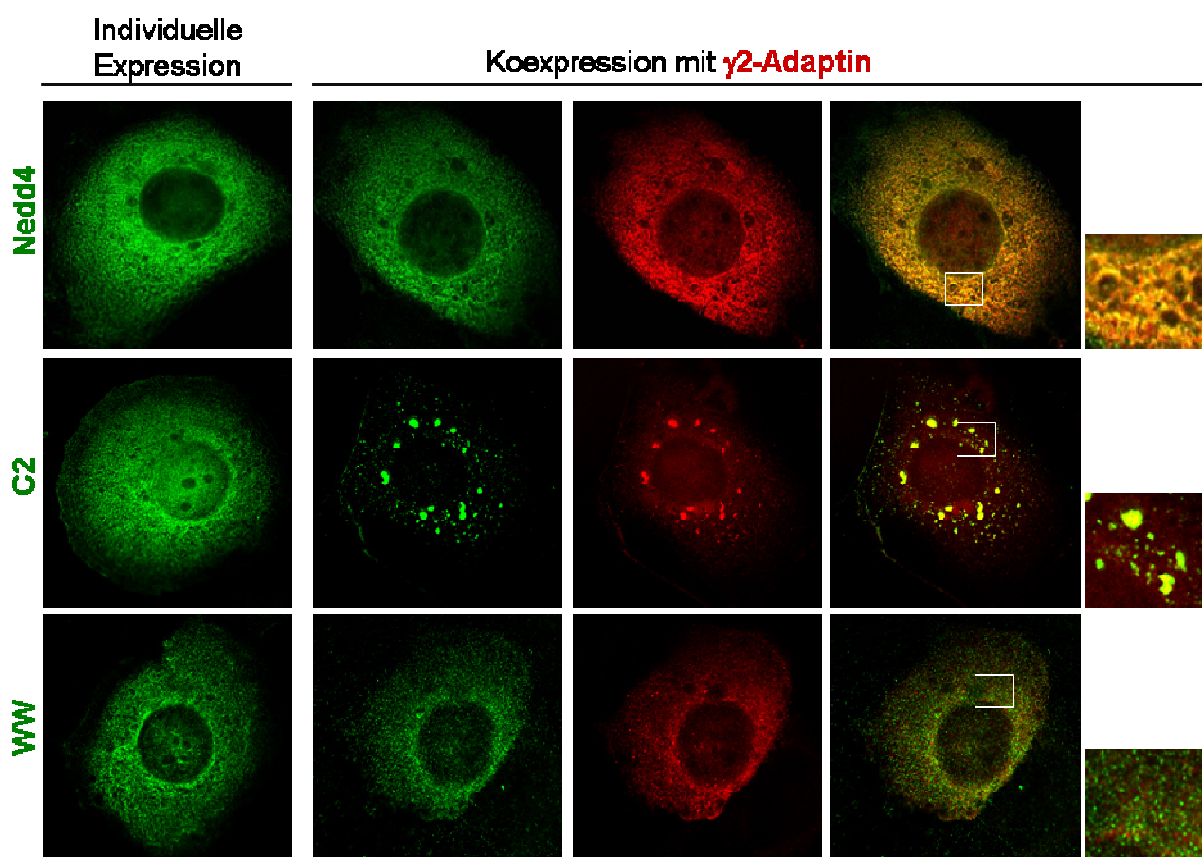


**Abb. 4-8 Die C2-Domäne von Nedd4 vermittelt die Bindung an  $\gamma$ 2-Adaptin.** **A** Schematische Darstellung der verwendeten Nedd4-Mutanten. **B** Die Flag-markierten Domänen C2 und WW wurden mit dem Plasmid  $\gamma$ 2.HA oder Kontrollvektor in HuH7-Zellen transfiziert. Die Expression der Proteine wurde über Epitop-spezifische Antikörper im Western-Blot überprüft (Input). Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem  $\alpha$ Flag-Antikörper und kopräzipitiertes  $\gamma$ 2-Adaptin wurde in einem HA-spezifischen Western-Blot detektiert.



#### 4.1.8 Immunfluoreszenzanalyse zur Lokalisation von $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4

Um die Daten zur Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 in einem zweiten experimentellen Ansatz zu bestätigen und um möglicherweise weitere Erkenntnisse über das Zusammenwirken der Proteine zu erhalten, wurden zusätzliche Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierbei wurde Flag-markiertes Nedd4, sowie die Mutanten C2 und WW sowohl alleine, als auch in Kombination mit HA-markiertem  $\gamma$ 2-Adaptin in HuH7-Zellen exprimiert (Abb.4-9).



**Abb. 4-9 Kolokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4.** HuH-7-Zellen wurden mit Flag-markiertem Nedd4, C2 oder WW transfiziert, sowohl einzeln als auch zusammen mit HA-markiertem  $\gamma$ 2-Adaptin. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit einem  $\alpha$ Flag-Antikörper (Maus) und mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper (Ratte) inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte über die sekundären Antikörper  $\alpha$ Ratte/AlexaFluor546 und  $\alpha$ Maus/AlexaFluor488, so dass Nedd4 und seine Mutanten grün dargestellt sind, und  $\gamma$ 2-Adaptin ein rotes Signal zeigt. Die Bilder wurden an einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und durch Dekonvolution bearbeitet. In den übereinander gelegten Bildern mit beiden Färbungen und deren Ausschnittsvergrößerungen sind deckungsgleiche Signale gelb gefärbt.



Bei individueller Expression zeigen alle Nedd4-Konstrukte eine relativ gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma der gesamten Zelle. Die Koexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin verändert dabei die Lokalisation von Nedd4 nicht. Vielmehr wird die biochemisch identifizierte Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 bestätigt, da  $\gamma$ 2-Adaptin weitgehend mit Nedd4 kolokalisiert. Wie die Ausschnittsvergrößerung verdeutlicht, kommt es an markanten Strukturen zu einer spezifischen und signifikanten Überlagerung der Signale. Dass es sich hier nicht um eine zufällige Übereinstimmung handelt, zeigt der Vergleich mit der Lokalisation der WW-Domäne von Nedd4 und  $\gamma$ 2-Adaptin. Auch hier sind beide Proteine im gesamten Zytoplasma der Zelle verteilt. Wie aber in der Ausschnittsvergrößerung zu erkennen ist, beobachtet man hier keine signifikante Überlagerung der Signale. Dies bestätigt die oben gezeigten Daten, nach denen keine Interaktion zwischen der WW-Domäne und  $\gamma$ 2-Adaptin stattfindet.

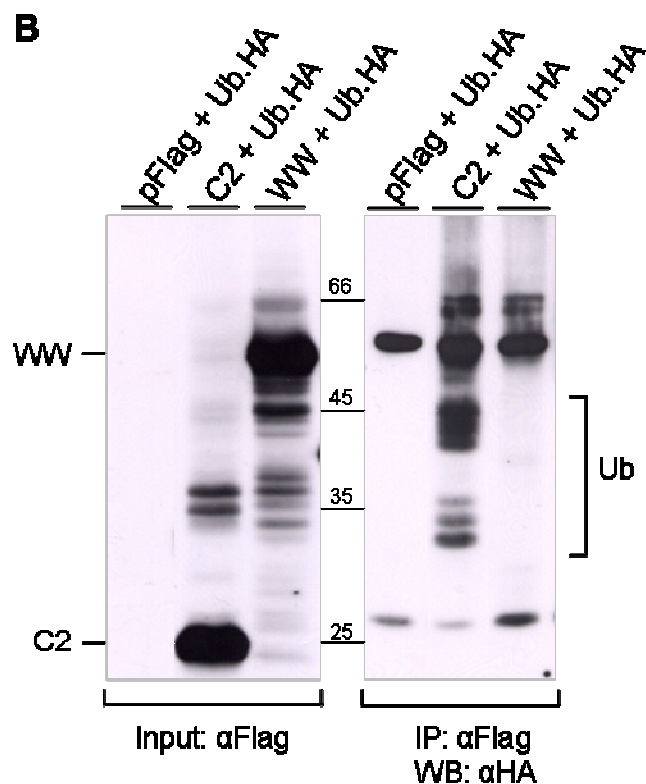
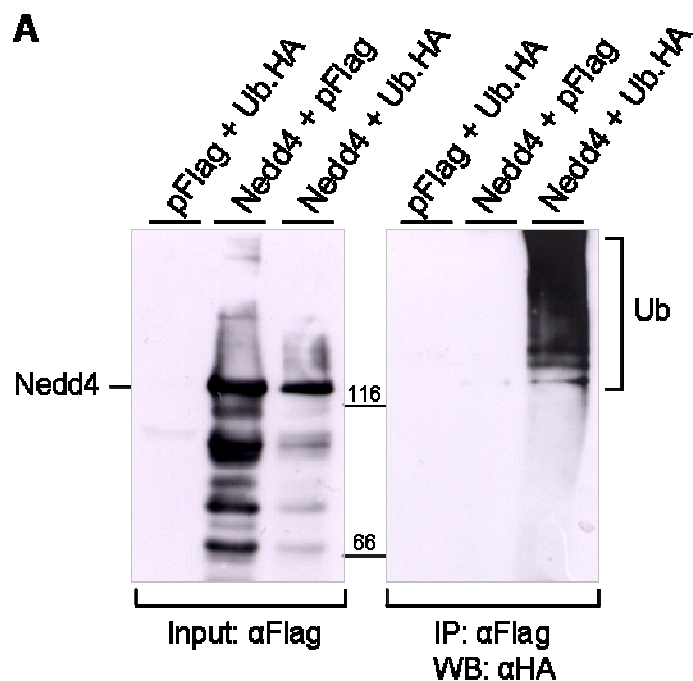
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die C2-Domäne eine Kolokalisation mit  $\gamma$ 2-Adaptin erwartet. Diese konnte auch klar nachgewiesen werden, wobei sich in diesem Fall die Verteilung beider Proteine in der Zelle deutlich verändert.  $\gamma$ 2-Adaptin und die C2-Domäne akkumulieren gemeinsam in kernnahen Bereichen der Zelle und bilden größere, punktartige Strukturen, die allerdings bislang noch nicht näher charakterisiert werden konnten.

#### 4.1.9 Die C2-Domäne von Nedd4 wird ubiquitiniert

Die vorangegangenen Versuche zeigen deutlich, dass Nedd4 über die C2-Domäne an  $\gamma$ 2-Adaptin bindet. Allerdings ist noch unklar, wie diese Interaktion erfolgt. Da das UIM dabei eine entscheidende Rolle spielt, ist es wahrscheinlich, dass Ubiquitin den entscheidenden Kontakt vermittelt. Unter dieser Annahme müsste Nedd4, d.h. speziell die C2-Domäne, durch Ubiquitin modifiziert werden.

Um dies zu untersuchen, wurde Flag-markiertes Nedd4, sowie die Domänen C2 und WW mit HA-markiertem Ubiquitin kotransfiziert. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen mit kochendem SDS-Puffer aufgeschlossen, um den Proteinabbau in den Lysaten zu verhindern und vorhandene Proteininteraktionen zu lösen. Über eine Flag-spezifische Immunpräzipitation wurde Nedd4 isoliert und seine mögliche Modifikation mit Ubiquitin über einen HA-spezifischen Western-Blot nachgewiesen. Nedd4 zeigt dabei deutliche Signale einer Ubiquitinierung, die in der Kontrollprobe fehlen (Abb. 4-10A). Das leiterartige Muster deutet dabei auf mehrere Ubiquitinmoleküle hin, die an Nedd4 gekoppelt sind. Dass die Modifikation mit Ubiquitin speziell die C2-Domäne betrifft, zeigt Abb. 4-10B. Die Proben resultieren aus dem gleichen Versuchsansatz wie in Abb. 4-10A, wurden jedoch aufgrund der kleineren Proteingröße in einem hochprozentigen SDS-Gel aufgetrennt. Im Vergleich zur Kontrollprobe liefert hier die Detektion des HA-markierten Ubiquitins eindeutige Signale für die Ubiquitinierung von C2. Durch die gute Auftrennung der Probe ist zu erkennen, dass diese Signale jeweils ein um etwa 6-8kDa größeres Proteinprodukt im

Vergleich zu C2 darstellen, was der Größe eines angehängten Ubiquitinmoleküls entspricht. Erwartungsgemäß konnten für die WW-Domäne keine spezifischen Ubiquitinsignale nachgewiesen werden, so dass in dieser Nedd4-Domäne eine Modifikation unwahrscheinlich ist.

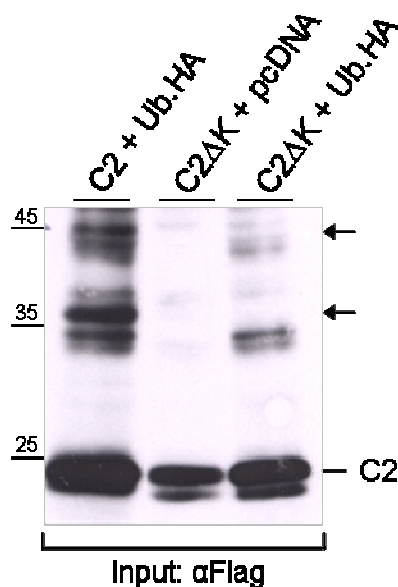


**Abb. 4-10 Die C2-Domäne von Nedd4 wird mit Ubiquitin modifiziert.** Flag-markiertes Nedd4 und seine Domänen C2 und WW wurden im Verhältnis 3:1 mit HA-markiertem Ubiquitin in HuH7-Zellen transfiziert. Die Lysate wurden unter denaturierenden Bedingungen mit kochendem SDS-Puffer hergestellt und anschließend für eine Immunpräzipitation mit einem αFlag-Antikörper eingesetzt. Die Expression der Proteine wurde im Western-Blot ebenfalls über einen αFlag-Antikörper nachgewiesen, während die Ubiquitinierung der gefällten Proteine mit einem αHA-Antikörper detektiert wurde. **A** Western-Blot-Analyse zur Ubiquitinierung von Nedd4 nach Auftrennung in einem 8%igen SDS-Gel. **B** Western-Blot der Proben der C2- und WW-Domänen, die in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt wurden.

#### 4.1.10 Die Ubiquitinierung der C2-Domäne ist für die Interaktion mit $\gamma$ 2-Adaptin essentiell

Dieser Befund, dass Nedd4 selbst ubiquitiniert wird und dies innerhalb der C2-Domäne erfolgt, bestärkt die Vermutung, dass hierdurch der Kontakt zum UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin hergestellt wird. Um diese Verbindung belegen zu können, muss jedoch auch gezeigt werden, dass eine Interaktion nicht mehr möglich ist, wenn die Ubiquitin-Modifikation der C2-Domäne fehlt. Zu diesem Zweck wurde eine Mutante der C2-Domäne generiert, die nicht mehr ubiquitiniert werden kann. Da die Kopplung von Ubiquitin spezifisch an Lysinresten erfolgt, wurden durch gerichtete Mutagenese alle acht vorhandenen Lysine gegen Arginine ausgetauscht (C2 $\Delta$ K).

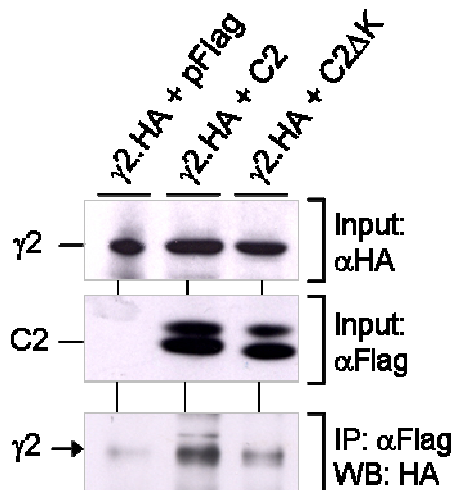
Um zu kontrollieren, ob so die Ubiquitinierung tatsächlich verhindert wird, wurde sowohl das Wildtyp-C2 als auch die lysinfreie Mutante in HuH-7-Zellen exprimiert und das Bandenmuster beider Proteine im Western-Blot verglichen. Da aus den vorangegangenen Versuchen hervorgeht, dass Ubiquitinierungssignale deutlich stärker sind, wenn ein Überschuss an Ubiquitin in der Zelle vorliegt, wurde HA-markiertes Ubiquitin kotransfiziert. Wie Abb. 4-11A zeigt, ist das Muster der größeren Proteinbanden bei der C2 $\Delta$ K-Mutante deutlich verändert. Im Vergleich zum Wildtyp fallen bei der Mutante die Signale im Bereich von 35 kDa und 45 kDa weg, was den Verlust der Ubiquitinmodifikation zeigt. Obwohl nicht alle Banden vollständig verschwinden, ist es offensichtlich, dass die Ubiquitinierung von C2 durch die Substitution der Lysine stark beeinträchtigt bzw. unterdrückt wird.



**Abb. 4-11 Die Mutante C2 $\Delta$ K wird nicht ubiquitiniert.** HuH7-Zellen wurden mit Flag-markiertem C2 bzw. C2 $\Delta$ K und HA-markiertem Ubiquitin im Verhältnis 3:1 transfiziert und im Western-Blot mit einem  $\alpha$ Flag-Antikörper analysiert.

Ob sich der Ausfall der Ubiquitinierung von C2 auf die Interaktion mit  $\gamma$ 2-Adaptin auswirkt, wurde in einem zweiten Versuchansatz untersucht. Hierzu wurde HA-markiertes  $\gamma$ 2-Adaptin mit Flag-markiertem C2 oder der C2 $\Delta$ K-Mutante koexprimiert, und die Zellextrakte wurden

für eine Flag-spezifische Immunpräzipitation eingesetzt. Die anschließende Western-Blot-Analyse der Proben mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper zeigt, dass  $\gamma$ 2-Adaptin wie erwartet an die C2-Domäne bindet, jedoch nicht mehr an die C2 $\Delta$ K-Mutante (Abb.4-12). Die Ubiquitinierung der C2-Domäne scheint somit für die Interaktion von Nedd4 mit  $\gamma$ 2-Adaptin essentiell zu sein. Demnach sollte das UIM des Adaptors mit der ubiquitinylierten C2-Domäne von Nedd4 in Wechselwirkung treten.

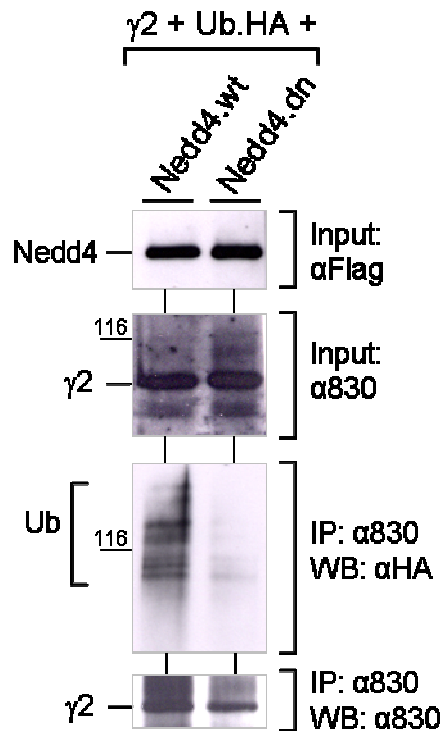


**Abb. 4-12 Die Ubiquitinierung von C2 vermittelt die Interaktion mit  $\gamma$ 2-Adaptin.**  $\gamma$ 2.HA wurde mit Flag-markiertem C2 oder C2 $\Delta$ K in HuH-7 Zellen koexprimiert, und die Lysate wurden mit Epitop-spezifischen Antikörpern im Western-Blot bezüglich der gleichmäßigen Proteinsynthese kontrolliert. Nach Immunpräzipitation mit einem  $\alpha$ Flag-Antikörper wurden die Proben in einem HA-spezifischen Western-Blot analysiert.

#### 4.1.11 Nedd4 katalysiert die Ubiquitinierung von $\gamma$ 2-Adaptin

Hieraus ergab sich die Frage nach der funktionellen Relevanz der Nedd4/ $\gamma$ 2-Adaptin-Interaktion. Da  $\gamma$ 2-Adaptin ubiquitiniert wird, könnte die Nedd4-Ubiquitin-Ligase die Modifikation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit Ubiquitin vermitteln. Um dies zu untersuchen, wurden mehrere Versuchsvarianten durchgeführt.

In einem ersten Ansatz wurde der Einfluss der dominant-negativen Nedd4-Mutante (Nedd4.dn) auf die Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin untersucht. Dazu wurde unmarkiertes  $\gamma$ 2-Adaptin mit HA-markiertem Ubiquitin und Flag-markiertem Nedd4 bzw. Nedd4.dn im Verhältnis 2:1:2 transfiziert, und die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen. Nach der Fällung von  $\gamma$ 2-Adaptin konnte nur in Anwesenheit von intaktem Nedd4 eine Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin nachgewiesen werden (Abb.4-13). Unter dem Einfluss der katalytisch-inaktiven Nedd4-Mutante hingegen ist das typische Ubiquitinierungsmuster von  $\gamma$ 2-Adaptin nicht detektierbar. Folglich sprechen diese Daten dafür, dass Nedd4 die Modifikation von  $\gamma$ 2-Adaptin katalysiert.



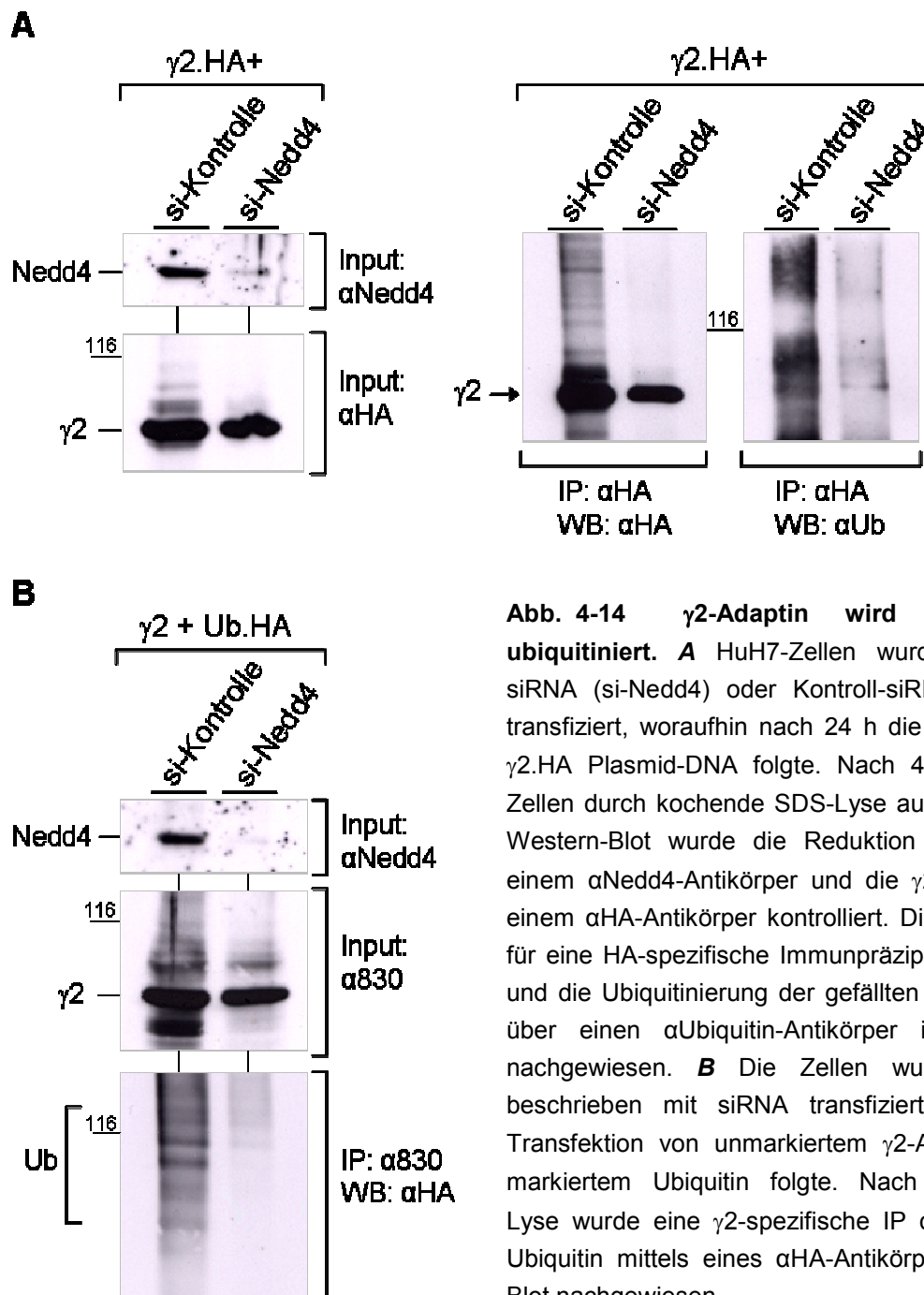
**Abb. 4-13 Dominant-negatives Nedd4 verhindert die Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin.**

Mit unmarkiertem  $\gamma$ 2-Adaptin, HA-markiertem Ubiquitin und Flag-markiertem Nedd4 bzw. Nedd4.dn transfizierte HuH-7-Zellen wurden mit kochendem SDS-Puffer lysiert, und die Proteinexpression wurde im Western-Blot mit  $\alpha$ HA-/ $\alpha$ Flag-Antikörpern kontrolliert (Input). Nach einer Immunpräzipitation mit dem  $\gamma$ 2-spezifischem Antikörper  $\alpha$ 830 wurde die Ubiquitinierung durch Detektion des HA-Epitops untersucht.

Um zu bestätigen, dass die Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin durch Nedd4 erfolgt, wurde ein zweiter Versuch unter veränderten Bedingungen durchgeführt. Die Inaktivierung von Nedd4 erfolgte in diesem Fall nicht durch Mutation, sondern indem der gesamte Pool des endogenen Proteins durch eine spezifische siRNA reduziert wurde. Dabei wurden HuH7-Zellen zunächst mit Nedd4-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert, woraufhin nach einer Inkubation von 24 h eine Transfektion der Plasmid-DNA für HA-markiertes  $\gamma$ 2-Adaptin folgte. Nach weiteren 48 h wurde eine kochende SDS-Lyse durchgeführt und  $\gamma$ 2-Adaptin anschließend mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper gefällt. Zum Nachweis der Ubiquitinierung im Western-Blot wurde hier ein  $\alpha$ Ubiquitin-Antikörper eingesetzt. Wie die Kontrolle der Lysate in Abb.4-14A zeigt, konnte die Menge des endogenen Nedd4 durch die spezifische siRNA effektiv reduziert werden, wobei die Expression von  $\gamma$ 2-Adaptin unbeeinflusst blieb. Bei der Analyse der präzipitierten Proben lässt sich Ubiquitin deutlich stärker in der Kontrollprobe nachweisen, während der Nedd4-depletierte Ansatz praktisch kein Ubiquitinsignal von  $\gamma$ 2-Adaptin liefert.

Zur weiteren Bestätigung, dass Nedd4 die Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin vermittelt, wurde der Versuch in abgewandelter Form wiederholt. Hierbei wurde ebenfalls das endogene Nedd4 durch eine spezifische siRNA depletiert, bevor die Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert wurden. In diesem Ansatz wurden unmarkiertes  $\gamma$ 2-Adaptin sowie HA-markiertes Ubiquitin exprimiert und die Zellen wie zuvor unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Bei der folgenden Immunpräzipitation wurde  $\gamma$ 2-Adaptin über einen spezifischen Antikörper gefällt und die Proben wurden anschließend im Western-Blot bezüglich der Ubiquitinierung mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper analysiert. Unter diesen Bedingungen konnte bei einer deutlichen

Reduktion von Nedd4 und gleichen Mengen  $\gamma$ 2-Adaptin im Ausgangslysat (Abb. 4-14B, Input) eindeutig gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin nur in Anwesenheit von Nedd4 erfolgt. In den Nedd4-siRNA behandelten Proben ist dagegen keine Modifikation von  $\gamma$ 2-Adaptin durch Ubiquitin detektierbar. Diese Daten bestätigen somit den Effekt der dominant-negativen Nedd4-Mutante und belegen folglich die Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin durch die Ubiquitin-Ligase Nedd4.



**Abb. 4-14  $\gamma$ 2-Adaptin wird durch Nedd4 ubiquitiniert.** **A** HuH7-Zellen wurden mit Nedd4-siRNA (si-Nedd4) oder Kontroll-siRNA (si-Kontrolle) transfiziert, woraufhin nach 24 h die Transfektion mit  $\gamma$ 2.HA Plasmid-DNA folgte. Nach 48 h wurden die Zellen durch kochende SDS-Lyse aufgeschlossen. Im Western-Blot wurde die Reduktion von Nedd4 mit einem  $\alpha$ Nedd4-Antikörper und die  $\gamma$ 2-Expression mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper kontrolliert. Die Lysate wurden für eine HA-spezifische Immunpräzipitation eingesetzt und die Ubiquitinierung der gefällten Proteine wurden über einen  $\alpha$ Ubiquitin-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. **B** Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit siRNA transfiziert, woraufhin die Transfektion von unmarkiertem  $\gamma$ 2-Adaptin und HA-markiertem Ubiquitin folgte. Nach denaturierender Lyse wurde eine  $\gamma$ 2-spezifische IP durchgeführt und Ubiquitin mittels eines  $\alpha$ HA-Antikörpers im Western-Blot nachgewiesen.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen zur Verbindung von  $\gamma$ 2-Adaptin und Ubiquitin, dass es sich bei  $\gamma$ 2-Adaptin um einen neuen Ubiquitin-Rezeptor handelt, der ubiquitinierte Proteine über ein UIM binden kann und selbst durch Ubiquitin modifiziert wird. Die Ubiquitinierung erfolgt hierbei spezifisch durch die Ubiquitin-Ligase Nedd4, für die eine Interaktion mit  $\gamma$ 2-Adaptin nachgewiesen werden konnte. Der Kontakt wird dabei offenbar zwischen der ubiquitinierten C2-Domäne von Nedd4 und dem UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin hergestellt.

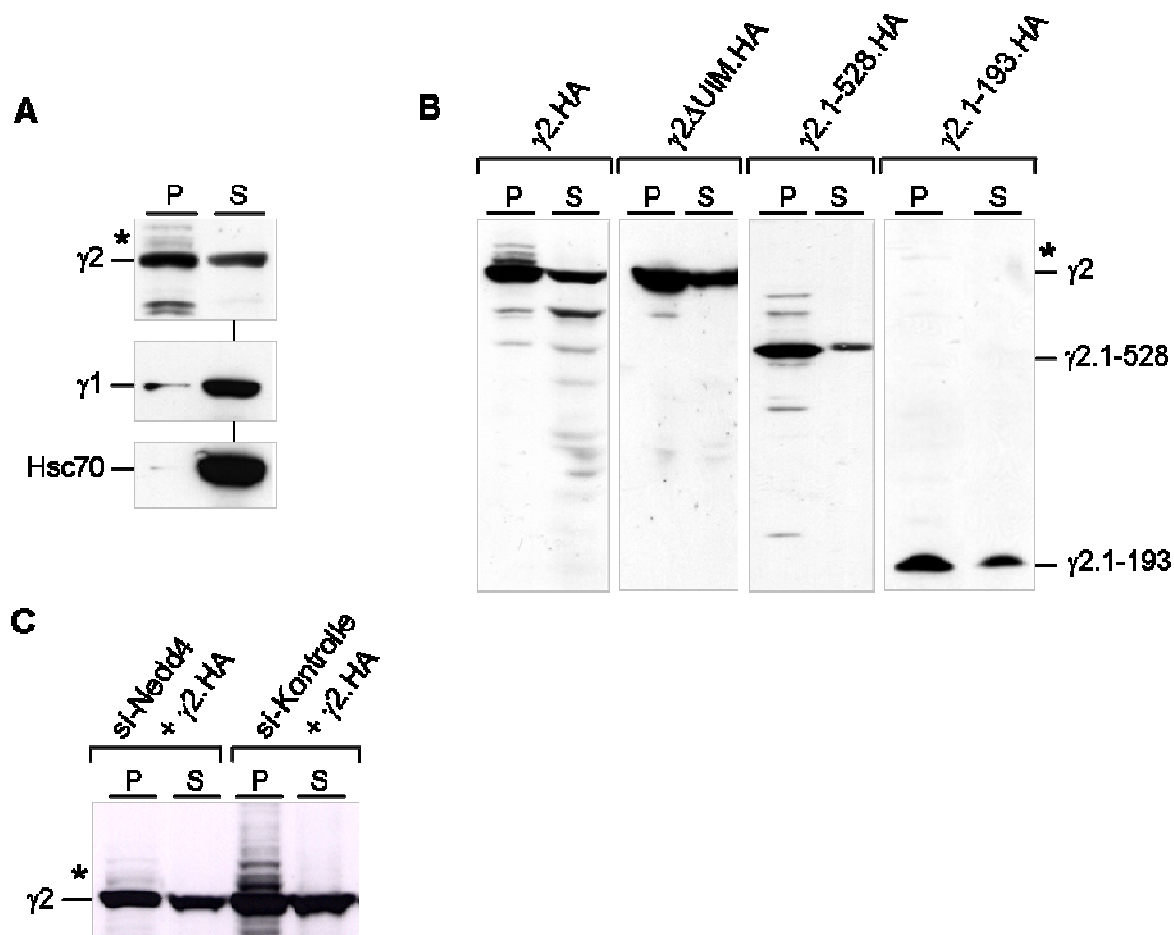
## 4.2 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von $\gamma$ 2-Adaptin

### 4.2.1 Analyse zur Membranassoziation von $\gamma$ 2-Adaptin

Aufgrund der Homologie zu dem klassischen Adaptorprotein  $\gamma$ 1-Adaptin ist eine ähnliche Funktion für  $\gamma$ 2-Adaptin denkbar. Neben der Ähnlichkeit zu  $\gamma$ 1-Adaptin weist auch das identifizierte UIM auf eine Adaptorfunktion von  $\gamma$ 2-Adaptin hin, da mittlerweile zahlreiche UIM-tragende Proteine charakterisiert werden konnten, die als Adaptoren bei der Vesikelbildung fungieren (Boehm & Bonifacino, 2001). Generell sind Adaptorproteine an vesikulären Transportprozessen innerhalb der Zelle beteiligt, wo sie vorwiegend die Cargo-Erkennung und Abschnürung von Vesikeln vermitteln. Dabei kommt es zu einer temporären Assoziation mit den beteiligten Membranen (Robinson, 2004; Hicke & Dunn, 2003).

Um zu untersuchen, ob  $\gamma$ 2-Adaptin tatsächlich an zelluläre Membranen bindet, wurden Fraktionierungsstudien durchgeführt. Dabei wurden Zellysate durch Zentrifugation in eine lösliche Fraktion S (soluble) und unlösliche Membranfraktion P (particulate) aufgetrennt, und die Proteinverteilung wurde im Western-Blot durch spezifische Antikörper analysiert.

In einem ersten Ansatz wurden zunächst untransfizierte HuH7-Zellen fraktioniert und die Verteilung von endogenem  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-Adaptin verglichen, wobei die Detektion über einen  $\alpha\gamma$ 1-Antikörper bzw. den  $\gamma$ 2-spezifischen  $\alpha$ 830-Antikörper erfolgte (Abb.4-15A). Zusätzlich wurde das Hitzeschockprotein Hsc70 untersucht, welches ausschließlich in löslicher Form vorliegt, und damit als Kontrolle für die Auftrennung der Lysate dient. Entsprechend den Erwartungen ist nur ein geringer Anteil von  $\gamma$ 1-Adaptin in der Membranfraktion zu finden, da die Bindung nur kurzzeitig erfolgt und somit vorwiegend eine zytosolische Lokalisation vorliegt. Im Gegensatz dazu zeigt  $\gamma$ 2-Adaptin eine deutlich stärkere Membranaffinität, da etwa gleiche Anteile in membrangebundener und löslicher Form vorliegen. Die nur in der Membranfraktion auftretenden Banden oberhalb von  $\gamma$ 2-Adaptin deuten dabei zudem darauf hin, dass ubiquitiniertes  $\gamma$ 2-Adaptin vorwiegend mit Membranen assoziiert ist und nicht in gelöster Form vorliegt.



**Abb. 4-15 Charakterisierung der Membranassoziation von  $\gamma 2$ -Adaptin.** Für die Fraktionierung der Zellen wurden diese mechanisch aufgebrochen und die Extrakte durch Ultrazentrifugation in einen löslichen Anteil (S) und den membrangebundenen Anteil (P) aufgetrennt. Die Analyse der Proben erfolgte durch Detektion mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot. Ubiquitiniertes  $\gamma 2$ -Adaptin ist jeweils durch einen Stern (\*) markiert. **A** Untransfizierte HuH-7-Zellen wurden wie beschrieben behandelt. Anschließend wurde durch Inkubation mit Antikörpern gegen  $\gamma 1$ -Adaptin und  $\gamma 2$ -Adaptin die Verteilung der endogenen Proteine untersucht. Als Kontrolle für die Versuchsbedingungen wurde das ausschließlich löslich vorliegende Hitzeschockprotein Hsc70 nachgewiesen. **B** HuH-7 Zellen wurden mit den Plasmiden  $\gamma 2$ .HA,  $\gamma 2\Delta UIM$ .HA,  $\gamma 2$ .1-528.HA und  $\gamma 2$ .1-193.HA transfiziert und entsprechend aufgearbeitet. Der Nachweis der Proteine im Western-Blot erfolgte durch einen HA-spezifischen Antikörper. **C** Nach Transfektion mit Nedd4- bzw. Kontroll-siRNA wurden HuH7-Zellen zusätzlich mit HA-markiertem  $\gamma 2$ -Adaptin transfiziert und die Zellextrakte wie beschrieben fraktioniert. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte durch einen  $\alpha$ HA-Antikörper.

Um die membranbindenden Eigenschaften von  $\gamma 2$ -Adaptin näher zu charakterisieren, wurden unter gleichen Versuchsbedingungen auch verschiedene  $\gamma 2$ -Mutanten untersucht. Dabei wurden HuH7-Zellen zunächst mit HA-markiertem  $\gamma 2$ -Adaptin sowie der Mutante  $\gamma 2\Delta UIM$ .HA transfiziert und die Zellextrakte wie zuvor fraktioniert. Die Proteinverteilung wurde anschließend durch einen HA-spezifischen Western-Blot analysiert.



Wie Abb.4-14B zeigt, liegt dabei das ektopisch exprimierte  $\gamma 2$ -Adaptin, ähnlich wie die endogene Form, zu vergleichbaren Teilen membrangebunden und gelöst vor. Wesentlich deutlicher zeigt sich hier allerdings, dass ubiquitiniertes  $\gamma 2$ -Adaptin ausschließlich in der Membranfraktion zu finden ist, während lösliches  $\gamma 2$ -Adaptin keine Modifikation trägt. Überraschend zeigte allerdings die Mutante  $\gamma 2\Delta\text{UIM}$ , welche nicht mit Ubiquitin modifiziert wird, etwa die gleiche Verteilung zwischen löslicher und membrangebundener Fraktion wie der  $\gamma 2$ -Wildtyp. Somit ist das UIM und folglich auch die Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin für die Membranassoziation nicht entscheidend; vielmehr scheint die Modifikation von  $\gamma 2$ -Adaptin erst nach der Bindung an Membranen zu erfolgen. Zur Charakterisierung der für die Membranbindung relevanten Proteinbereiche wurden die verkürzten  $\gamma 2$ -Mutanten  $\gamma 2.1-528.\text{HA}$  und  $\gamma 2.1-193.\text{HA}$  untersucht. Dabei konnten beide Proteine in beiden Fraktionen nachgewiesen werden und zeigten somit eine ähnliche Verteilung wie das Wildtyp-Protein. Dies verdeutlicht, dass schon die ersten 193 AS von  $\gamma 2$ -Adaptin ausreichen, um den Kontakt mit der Membran zu vermitteln.

Ogleich bereits gezeigt wurde, dass weder die Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin noch sein UIM für die Membranbindung erforderlich sind, wurde dennoch der Einfluss von Nedd4 auf die Lokalisation von  $\gamma 2$ -Adaptin an Membranen untersucht. Dabei wurden Nedd4-depletierte Zellen und mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen mit HA-markiertem  $\gamma 2$ -Adaptin transfiziert und wie zuvor aufgearbeitet. Erwartungsgemäß verhinderte das Fehlen von Nedd4 die Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin, nicht jedoch die Membranassoziation (Abb. 4-15C).  $\gamma 2$ -Adaptin bindet folglich unabhängig von der Ubiquitin-Modifikation an Membranen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass  $\gamma 2$ -Adaptin in der Lage ist, ebenso wie zahlreiche andere Adaptorproteine, an Membranen zu binden. Dabei weist es eine deutlich stärkere Affinität als  $\gamma 1$ -Adaptin auf, was einen weiteren Unterschied zwischen beiden Adaptoren darstellt und auf unterschiedliche Funktionsweisen hindeutet. Die Ubiquitinierung von  $\gamma 2$ -Adaptin hat dabei keinen Einfluss auf die Membranassoziation. Vielmehr wird deutlich, dass diese Modifikation erst membranständig erfolgt.

#### 4.2.2 Analysen zur Kolokalisation von $\gamma 2$ -Adaptin mit zellulären Markern

Um ein genaueres Bild zu erhalten, wo  $\gamma 2$ -Adaptin in der Zelle lokalisiert ist und an welche Membranen es bindet, wurde in Immunfluoreszenzstudien die Kolokalisation von  $\gamma 2$ -Adaptin mit verschiedenen zellulären Markerproteinen untersucht. Dazu wurden untransfizierte HuH7-Zellen fixiert und permeabilisiert und mit dem über ProteinG-Sepharose aufgereinigten  $\alpha 830$ -Antikörper gegen das endogene  $\gamma 2$ -Adaptin inkubiert. Die verschiedenen Zellkompartimente wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Markerproteine detektiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper konnten

die Proben am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Dabei zeigt das rote Signal für  $\gamma$ 2-Adaptin eine Vielzahl punktueller, vesikelartiger Strukturen, die weitgehend in der gesamten Zelle verteilt sind.

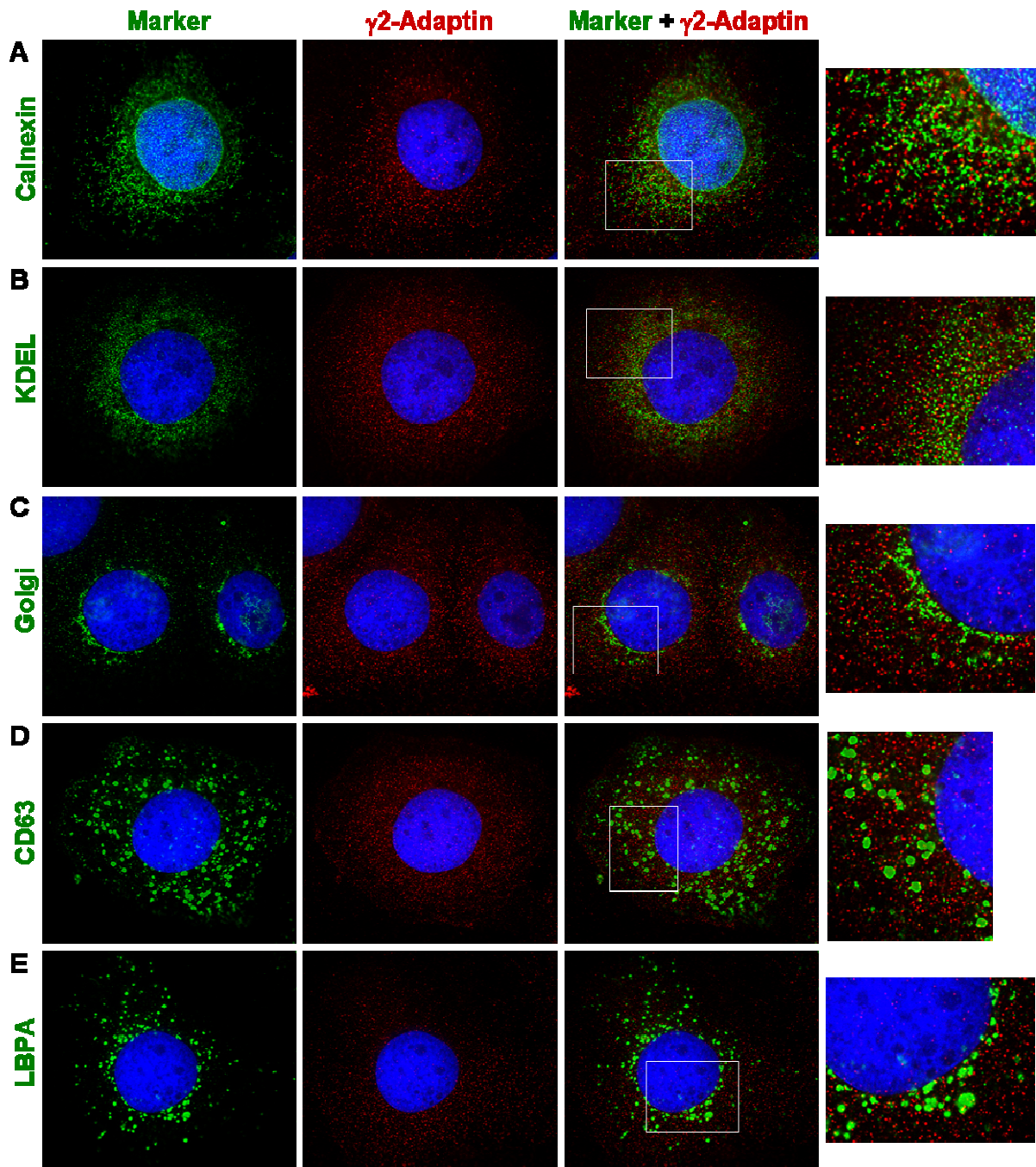
Das endoplasmatische Retikulum (ER), angefärbt durch das ER-spezifische Protein Calnexin, ist ebenfalls durch vesikuläre Strukturen gekennzeichnet, die allerdings in kernnahen Bereichen der Zelle angehäuft sind.  $\gamma$ 2-Adaptin ist oft nahe den ER-Strukturen zu finden, wobei eine Überlagerung der Signale jedoch nur selten auftritt (Abb.4-16A). Eine signifikante Kolo-kalisation mit dem ER ist nicht zu beobachten.

Ähnliches gilt für das Intermediärkompartiment, welches durch die Detektion des Retentionssignals KDEL angefärbt wurde. Dieses Kompartiment besteht ebenfalls aus Vesikeln, die nahe dem Zellkern angehäuft sind, wobei auch hier keine spezifischen, deckungsgleichen Signale mit  $\gamma$ 2-Adaptin auftreten (Abb.4-16B). Eine Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin an Membranen des Intermediärkompartiments ist daher nicht anzunehmen.

Der Golgi-Apparat, welcher vergleichsweise kompakte, tubuläre Strukturen nahe dem Zellkern bildet, wurde in früheren Arbeiten als Lokalisationsort von  $\gamma$ 2-Adaptin beschrieben (Lewin *et al.*, 1998). Diese Daten konnten hier jedoch nicht eindeutig belegt werden. Obgleich  $\gamma$ 2-Adaptin-Vesikel teilweise nahe den Endbereichen der Golgi-Strukturen auftreten, ist dabei nur vereinzelt eine Überlagerung der Signale erkennbar (Abb.4-16C). Eine großflächige und spezifische Kolo-kalisation kann nicht detektiert werden, so dass eine Assoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit dem Golgi-Apparat nicht bestätigt werden kann.

Die Anfärbung endosomaler Kompartimente erfolgte durch das Membranprotein CD63, welches als Marker für die späten Endosomen dient, und LBPA, ein für die internen Membranen Multivesikulärer Endosomen (*multivesicular bodies* = MVBs) charakteristisches saures Phospholipid. Beide Kompartimente sind als große Vesikel erkennbar, die in der gesamten Zelle verteilt vorliegen.  $\gamma$ 2-Adaptin ist dabei häufig eng mit beiden endosomalen Strukturen assoziiert, wobei die Anlagerung oft in solchen Bereichen erfolgt, in denen die endosomalen Vesikel prägnante Verformungen zeigen, die auf eine Aus- oder Einstülpung hinweisen (Abb.4-16D/E). Auch Kolo-kalisationen können beobachtet werden, wobei  $\gamma$ 2-Adaptin sowohl innerhalb der Kompartimente liegen könnte als auch außen angelagert sein könnte. Folglich zeigt  $\gamma$ 2-Adaptin eine enge Assoziation mit späten Endosomen und MVBs.

Aufgrund der großflächigen Verteilung von  $\gamma$ 2-Adaptin ist die genaue Analyse und Interpretation der Daten schwierig. Dennoch konnte hier gezeigt werden, dass keine spezifische Kolo-kalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit dem ER und dem Intermediärkompartiment auftritt. Zudem konnte die bislang veröffentlichte Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin am Golgi-Apparat nicht bestätigt werden. Stattdessen konnte eine enge Assoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit späten Endosomen und MVBs beobachtet werden, deren funktionelle Bedeutung im Folgenden genauer untersucht wurde.



**Abb. 4-16 Immunfluoreszenzanalyse zur zellulären Lokalisation von  $\gamma 2$ -Adaptin.** Für den Nachweis des endogenen  $\gamma 2$ -Adaptins wurden fixierte HuH-7 Zellen mit einem  $\gamma 2$ -spezifischen Kaninchen-Antikörper inkubiert und anschließend mit einem AlexaFluor546-gekoppelten Antikörper fluoreszenzmarkiert. Die zellulären Kompartimente wurden durch die Behandlung mit Antikörpern gegen die folgenden Markerproteine/-motive und AlexaFluor488-konjugierte Sekundärantikörper nachgewiesen. **A** ER – Calnexin **B** Intermediärkompartiment – KDEL **C** Golgi-Apparat – Golgin97 **D** Späte Endosomen – CD63 **E** Multivesikuläre Endosomen – LBPA. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss), und die erstellten Aufnahmen wurden durch die Dekonvolutionsfunktion der AxioVision-Software (Zeiss) bearbeitet. Das rote Fluoreszenzsignal markiert die Verteilung von  $\gamma 2$ -Adaptin, während die spezifischen zellulären Kompartimente grün gefärbt sind. Die Zellkerne wurden über den Farbstoff Höchst33342 blau angefärbt.

## 4.3 Analysen zur zellulären Funktion von $\gamma$ 2-Adaptin

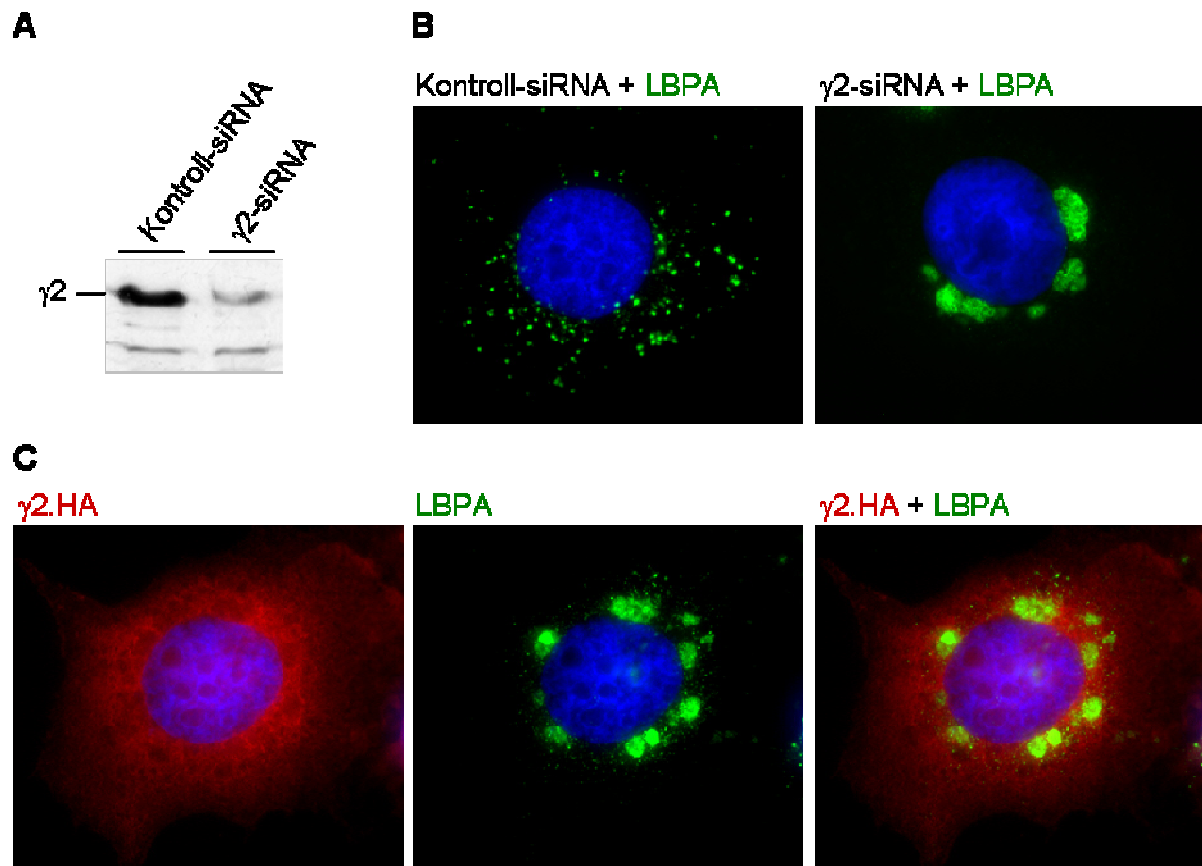
### 4.3.1 $\gamma$ 2-Adaptin beeinflusst die Morphologie von Multivesikulären Endosomen

Anlehnend an die Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von endogenem  $\gamma$ 2-Adaptin scheint eine Verbindung zu späten Endosomen und MVBs möglich.

Um eine Korrelation zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Endosomen, speziell den MVBs, näher zu untersuchen, wurde daher  $\gamma$ 2-Adaptin gezielt durch siRNA depletiert und mögliche Veränderungen der MVBs mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden HuH7-Zellen mit einer spezifischen siRNA transfiziert, welche die Expression von  $\gamma$ 2-Adaptin unterdrückt (Abb.4-17A), und die MVBs wurden anschließend über die Detektion von LBPA fluoreszenzmarkiert. Wie die in Abb.4-17B dargestellten Aufnahmen zeigen, bewirkt die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin eine starke Vergrößerung der MVB-Vesikel im Vergleich zu den Kontrollzellen. Zudem ist die Anzahl der MVBs deutlich reduziert. Auch ist statt der großflächigen Verteilung in der gesamten Zelle eine starke Akkumulation nahe dem Zellkern zu beobachten. Dieser Effekt tritt unabhängig vom Zelltyp auf, da er auch in Hela-Zellen beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Beobachtung, dass die Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin eine deutliche Veränderung der MVBs bewirkt, wurde dann untersucht, wie sich ein Überschuss von  $\gamma$ 2-Adaptin auf die MVBs auswirkt. Dazu wurden HuH7-Zellen mit HA-markiertem  $\gamma$ 2-Adaptin transfiziert zusammen mit LBPA durch spezifische Primär- und AlexaFluor-gekoppelte Sekundärantikörper markiert. Wie Abb. 4-17C zeigt, induziert eine Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin überraschenderweise einen ähnlichen Phänotyp wie die Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin. Auch hier sind die MVBs stark vergrößert und akkumulieren nahe dem Zellkern.

Diese Daten verdeutlichen, dass ein enger Zusammenhang zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und MVBs besteht, da sowohl die Überexpression als auch die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin Veränderungen der MVBs hervorrufen.

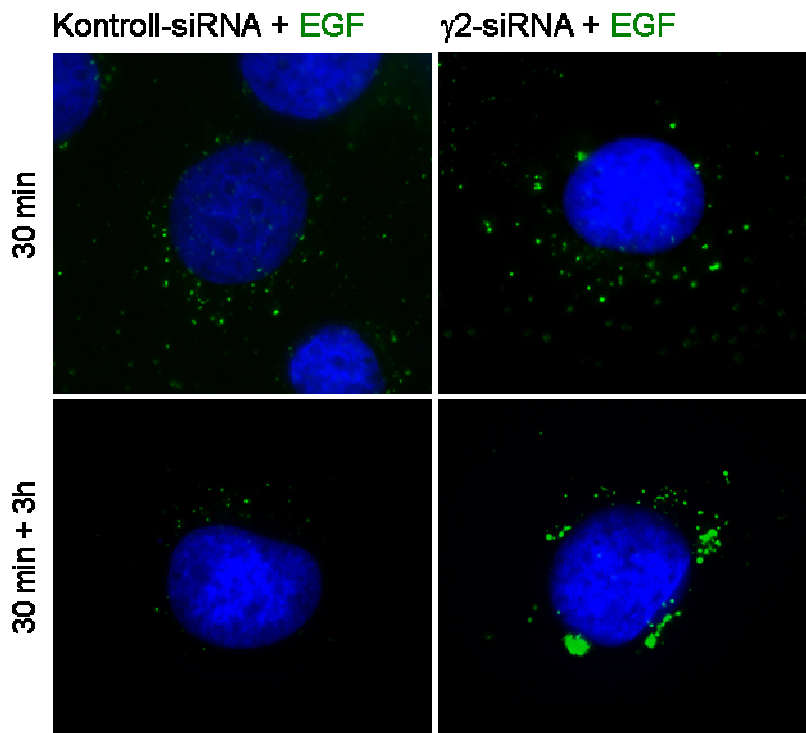


**Abb. 4-17  $\gamma 2$ -Adaptin beeinflusst die Morphologie von MVBs.** In HuH7-Zellen, die mit Kontroll- bzw.  $\gamma 2$ -siRNA behandelt wurden, erfolgte die Analyse der MVBs durch Detektion des spezifischen Markers LBPA. **A** Die Kontrolle der Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin erfolgte durch einen Western-Blot mit dem  $\alpha 830$ -Antikörper. **B** Für die Untersuchung zur Morphologie der MVBs wurden LBPA-spezifische Primär- und AlexaFluor488-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. **C** Um den Einfluss der Überexpression von  $\gamma 2$ -Adaptin zu untersuchen, wurden HuH7-Zellen mit HA-markiertem  $\gamma 2$ -Adaptin transfiziert. Dieses wurde über den  $\alpha 830$ -Antikörper und einen Alexa-Fluor546-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen, während MVBs durch den  $\alpha$ LBPA-Antikörper und sekundären AlexaFluor488-Antikörper markiert wurden. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Höchst33342 blau angefärbt.

#### 4.3.2 $\gamma 2$ -Adaptin beeinflusst den Abbau des Wachstumsfaktors EGF

Eine Erhöhung oder Reduktion des intrazellulären  $\gamma 2$ -Adaptin-Spiegels induziert strukturelle Veränderungen der MVBs. Daraus resultiert die Frage, ob hierbei Fusions- und Abschnürungsprozesse beeinflusst und somit die Funktionen der MVBs beeinträchtigt werden. Um mögliche funktionelle Defekte der MVBs zu detektieren, wurden Studien mit fluoreszenzmarkiertem *Epidermal Growth Factor* (EGF) durchgeführt. Dieser Wachstumsfaktor wird normalerweise nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche endozytiert und intrazellulär zu den MVBs transportiert, wo seine Degradation

erfolgt (Marmor & Yarden, 2004). Treten Defekte innerhalb der Transport- oder Abbauprozesse auf, kommt es zu einer Akkumulation von EGF in der Zelle (Doyotte *et al.*, 2005; von Zastrow & Sorkin, 2007). Um den Einfluss von  $\gamma 2$ -Adaptin auf endozytisiertes EGF zu untersuchen, wurden HuH7-Zellen mit  $\gamma 2$ -spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt und anschließend mit AlexaFluor488-gekoppeltem EGF inkubiert. Dabei lässt sich nach 30 Minuten beobachten, dass EGF in beiden Ansätzen von den Zellen aufgenommen wird und dieser Prozess somit unabhängig von  $\gamma 2$ -Adaptin erfolgt (Abb.4-18, oben). Deutliche Unterschiede zeigen sich allerdings nach weiteren drei Stunden, in denen keine zusätzliche Zufuhr von EGF erfolgte. Während EGF in Kontrollzellen erwartungsgemäß weitgehend abgebaut wurde, konnten dagegen in  $\gamma 2$ -depletierten Zellen noch starke EGF-Signale detektiert werden, die nahe dem Zellkern akkumulieren. Das EGF scheint somit zwar noch innerhalb der Zelle transportiert zu werden, allerdings wird sein Abbau in den MVBs durch das fehlende  $\gamma 2$ -Adaptin gestört.



**Abb. 4-18** Depletion von  $\gamma 2$ -Adaptin verhindert den Abbau von endozytiertem EGF. Mit Kontroll- oder  $\gamma 2$ -siRNA transfizierte HuH7-Zellen wurden 30 min mit EGF-AlexaFluor488 inkubiert. Die Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgte entweder direkt oder nach einem Zeitraum von 3 h ohne weitere EGF-Zufuhr. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Höchst33342 blau angefärbt.



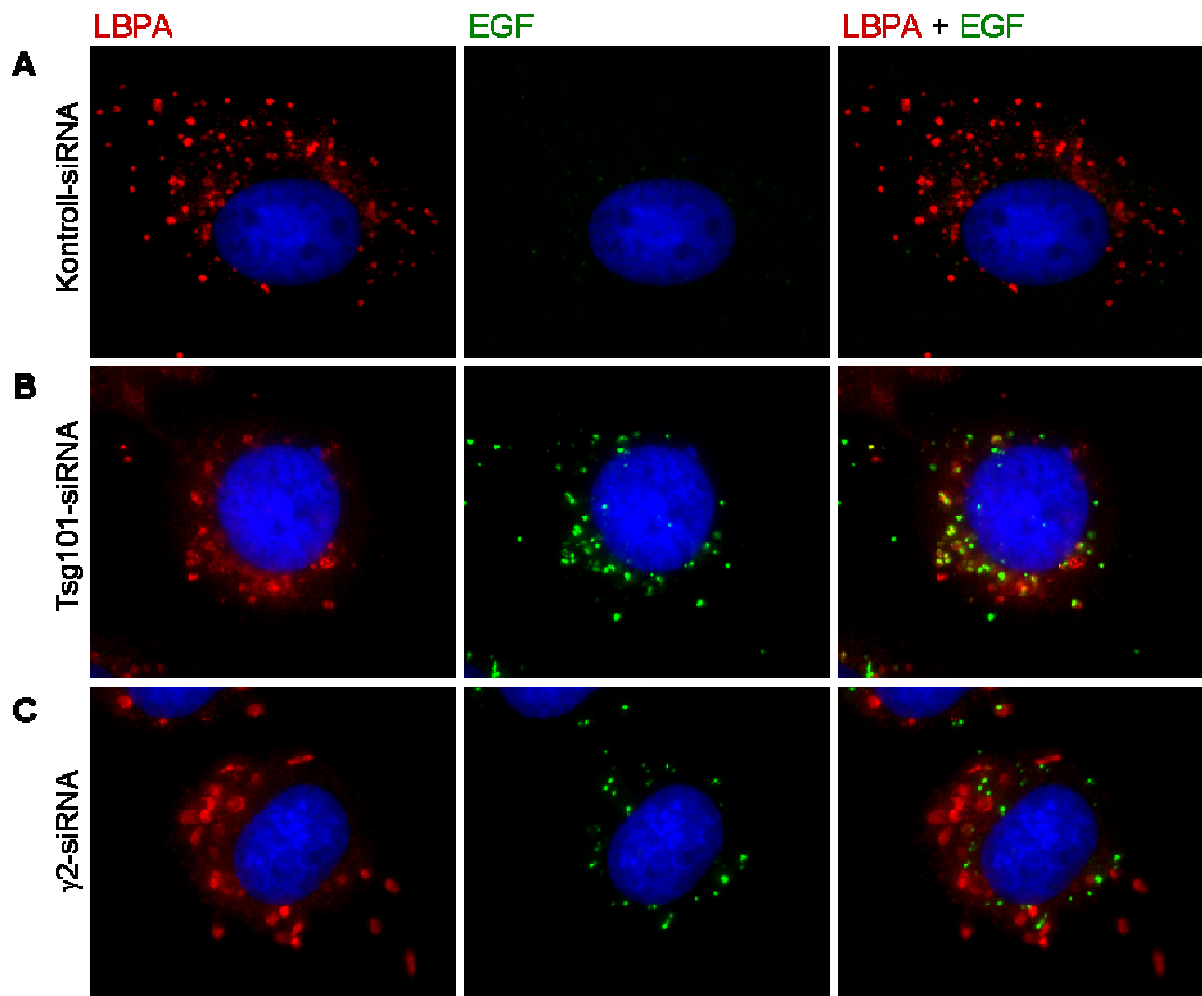
### 4.3.3 Einfluss von $\gamma$ 2-Adaptin auf den Transport von EGF zu den MVBs

Die vorangegangenen Versuche zeigen, dass es durch die Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin zu einer starken Vergrößerung der MVBs kommt und dass der Abbau von EGF in der Zelle verhindert wird. Diese Effekte wurden in verschiedenen Arbeiten auch bei der Depletion von Tsg101 beobachtet. Tsg101 ist ein Bestandteil der ESCRT-Maschinerie, speziell des ESCRT I-Komplexes und maßgeblich an der Entstehung interner MVB-Vesikel beteiligt (Williams & Urbe, 2007). Ebenso wie bei  $\gamma$ 2-Adaptin kommt es auch bei der Reduktion von Tsg101 zu vergrößerten Endosomen und zur Akkumulation von EGF in der Zelle (Bishop *et al.*, 2002). Offen bleibt in beiden Fällen, an welchem Punkt es zur Störung des Abbauwegs von EGF kommt. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass durch die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin bzw. Tsg101 der Transport von EGF zu den MVBs blockiert wird oder dass die Funktion der MVBs selbst beeinträchtigt wird, woraufhin EGF in den MVBs akkumuliert.

Um zu klären, ob EGF nach der Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin bzw. Tsg101 noch in die MVBs transportiert wird, wurde die Verteilung von EGF in siRNA-behandelten Zellen untersucht. Die MVBs wurden dabei durch den  $\alpha$ LBPA-Antikörper angefärbt. Im Vergleich zum Kontrollpräparat (Abb.4-20A) sind die MVBs nach der Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Tsg101 wie erwartet deutlich vergrößert und verstärkt in Kernnähe lokalisiert (Abb.4-20B-C). Zudem sind in beiden Fällen starke Signale für das aufgenommene EGF detektierbar, welches ebenfalls in kernnahen Bereichen akkumuliert. Erwartungsgemäß ist der Abbau von EGF hier blockiert, während es in den Kontrollzellen fast vollständig degradiert wurde.

Betrachtet man nun die Verteilung von LBPA und EGF genauer, so zeigt sich eine weitgehende Kollokalisierung von EGF und LBPA in Tsg101-depletierten Zellen (Abb.4-20B). Das aufgenommene EGF scheint hier nach wie vor in die MVBs zu gelangen, wo es jedoch nicht abgebaut wird. Ein anderes Bild ergibt sich durch die Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin. Obwohl sich EGF nahe dem Zellkern und damit nahe den MVBs ansammelt, sind praktisch keine deckungsgleichen Signale detektierbar (Abb.4-20C). EGF gelangt hier offenbar nicht mehr in die MVBs.

Folglich bewirkt zwar die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin ebenso wie die Depletion von Tsg101 eine Veränderung der MVBs und die Akkumulation von EGF in der Zelle, vermutlich wirken die beiden Faktoren jedoch auf unterschiedliche Schritte im Abbauweg von EGF. Während Tsg101 primär die Funktion der MVBs beeinflusst scheint  $\gamma$ 2-Adaptin am Transport der EGF-Vesikel zu den MVBs oder bei deren Assoziation und Fusion mit der MVB-Membran beteiligt zu sein.



**Abb. 4-19** Einfluß verschiedener siRNAs auf den Transport von EGF zu den MVBs. 48 h nach Transfektion einer Kontroll-siRNA (**A**) und spezifischen siRNAs gegen Tsg101 (**B**) und  $\gamma$ 2-Adaptin (**C**) wurden die Zellen 30 min mit EGF-AlexaFluor488 stimuliert und weitere 3 h ohne EGF inkubiert. Die MVBs der fixierten Zellen wurden über einen LBPA-spezifischen Primärantikörper und einen AlexaFluor546-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Die Zellkerne sind blau dargestellt.

#### 4.3.4 Die Rolle von Clathrin bei der Funktion von $\gamma$ 2-Adaptin

Clathrin ist vorwiegend aufgrund seiner Funktion als Vesikelhülle im Sekretionsweg und bei der Endozytose bekannt. Hier ist es an der Sortierung der zu verpackenden Membranproteine beteiligt und beeinflusst entscheidend die eigentlichen Abschnürungsprozesse, vor allem an der Golgi- und Plasmamembran (Traub, 2005). Mittlerweile wurde jedoch auch gezeigt, dass Clathrin zudem eine wichtige Funktion bei der Sortierung ubiquitinierten Membranproteine an endosomalen Membranen übernimmt. Bei der Vesikelbildung an den Membranen der MVBs vermittelt Clathrin zusammen mit Adaptorproteinen die Anhäufung der ubiquitinierten Frachtmoleküle in speziellen



Mikromembrandomänen, welche dann unter Beteiligung der ESCRT-Maschinerie als interne Vesikel in des Lumen der MVBs abgeschnürt werden (Clague, 2002; Raiborg et al., 2006). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse scheint auch  $\gamma 2$ -Adaptin eine Funktion als Ubiquitin-Rezeptor und Adaptor an endosomalen Membranen, speziell den MVBs, inne zu haben. Daher wurde eine mögliche Verbindung zu Clathrin untersucht. Die Analyse der Primärsequenz von  $\gamma 2$ -Adaptin zeigte, dass es tatsächlich ein mögliches Clathrin-Bindemotiv in der Scharnierregion aufweist (Abb.4-21). Um die Funktionalität dieses durch die Abfolge von Leuzin- und Asparaginsäureresten charakterisierten Motivs untersuchen zu können, wurde eine Deletionsmutante generiert ( $\gamma 2\Delta C$ .HA). Die Scharnierregionen von  $\gamma 2$ -Wildtyp und  $\gamma 2\Delta C$  wurden dann in einen GST-Vektor kloniert (C-GST,  $\Delta C$ -GST).

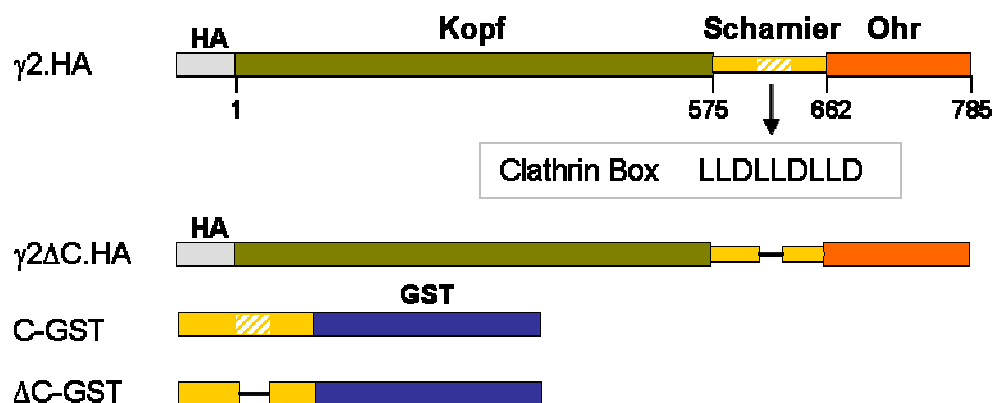
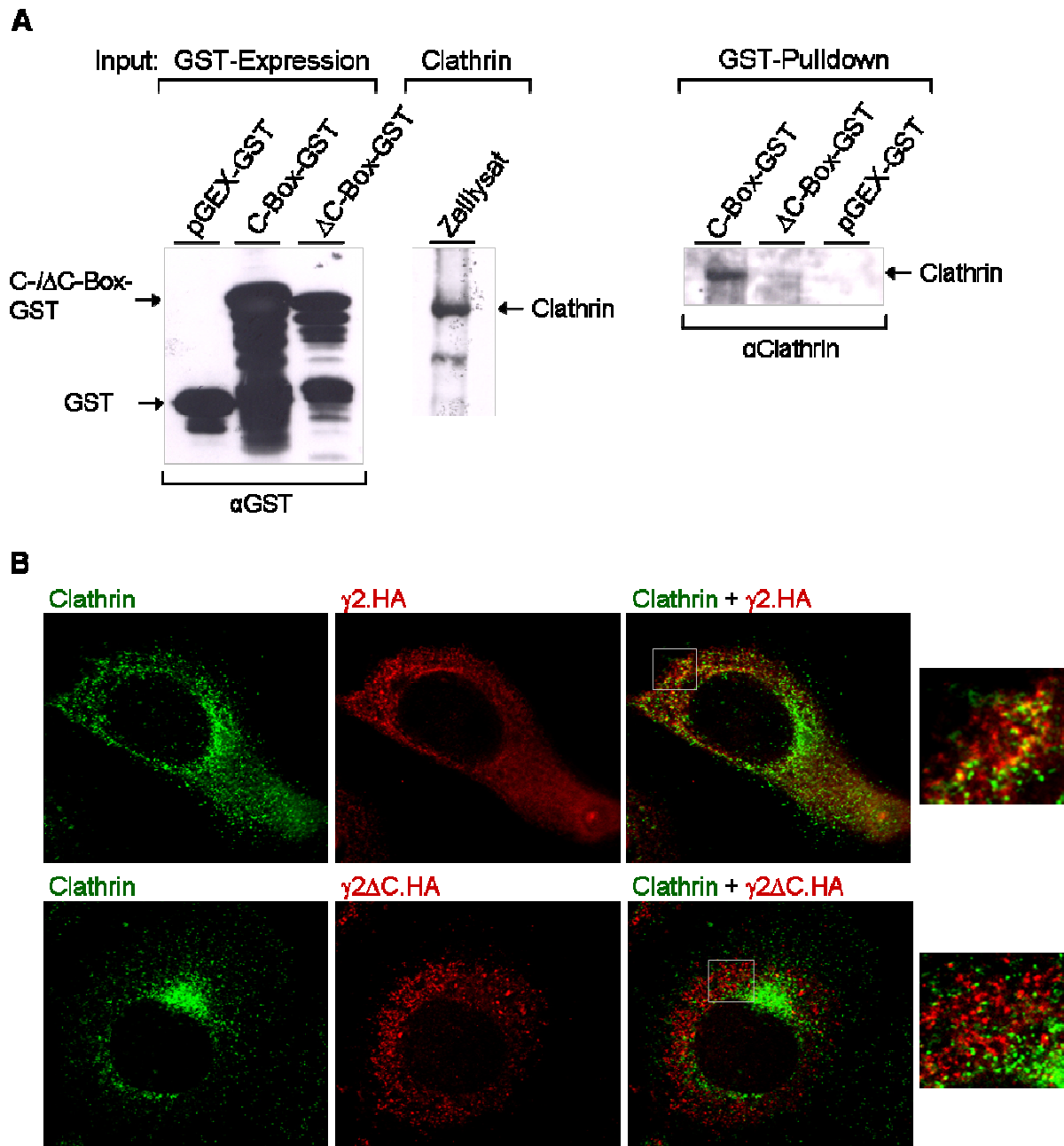


Abb. 4-20 Schematische Darstellung des Clathrin-Bindemotivs sowie der generierten Mutanten und GST-Konstrukte.

Ob das Motiv tatsächlich die Bindung von Clathrin vermittelt, wurde in GST-Pulldown-Studien analysiert (Abb.4-21A). Dazu wurden die GST-Konstrukte in *E.coli*-Zellen exprimiert und über die GST-Markierung spezifisch an Glutathion-Sepharose gekoppelt und damit gereinigt. Die immobilisierten GST-Konstrukte wurden dann mit Lysaten von Säugerzellen als Quelle für Clathrin inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem Clathrin-spezifischen Western-Blot untersucht. Dabei zeigte sich, dass Clathrin durch die intakte Clathrin-Box von  $\gamma 2$ -Adaptin gefällt werden konnte, während die Deletion dieses Motivs eine Bindung von Clathrin verhindert (Abb. 4-21A). Somit scheint es sich um ein funktionelles Clathrin-Bindemotiv zu handeln.



**Abb. 4-21 Untersuchungen zur Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Clathrin.** **A** Für einen *Pull-down-Assay* wurden GST sowie die Fusionsproteine C-GST und  $\Delta$ C-GST (Abb.4-21) in *E.coli* TG1 exprimiert. Zur Kontrolle der Expression wurden die Bakterienlysate im Western-Blot mit einem  $\alpha$ GST-Antikörper analysiert. Die Fusionsproteine wurden durch Kopplung an Glutathion-Sepharose isoliert und diese anschließend für die Bindung von Clathrin mit Säugerzelllysate inkubiert. Präzipitiertes Clathrin wurde, ebenso wie das in den Zelllysaten enthaltene Clathrin, im Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen die schweren Clathrin-Ketten (*heavy chain*, HC) nachgewiesen. **B** Für die mikroskopische Untersuchung der Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin und Clathrin wurden HuH7-Zellen mit HA-markiertem  $\gamma$ 2-Adaptin und der Mutante  $\gamma$ 2 $\Delta$ C transfiziert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte über HA- bzw. Clathrin-spezifische Antikörper und AlexaFluor546-/AlexaFluor488-gekoppelte Sekundärantikörper.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die Clathrin-Bindungsfähigkeit des Motivs im Kontext des Volllängen- $\gamma 2$ -Adaptins untersucht. Da GST-Fusionsproteine des kompletten  $\gamma 2$ -Adaptins bzw. der  $\gamma 2\Delta C$ -Mutante nach bakterieller Expression unlöslich sind, wurde hierzu eine alternative Methode gewählt. Dazu wurden HA-markiertes  $\gamma 2$ -Adaptin und die Deletionsmutante  $\gamma 2\Delta C$  in HuH7-Zellen exprimiert und eine mögliche Kolokalisation mit Clathrin wurde durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb.4-21B). Sowohl Clathrin als auch  $\gamma 2$ -Adaptin und die Mutante  $\gamma 2\Delta C$  zeigen eine vesikuläre Verteilung in der gesamten Zelle, wobei nur Clathrin zudem in einem Bereich nahe dem Zellkern deutlich angehäuft ist. Eine Kolokalisation ist in dieser Region nicht zu beobachten. In anderen Bereichen der Zelle können jedoch deckungsgleiche Signale von  $\gamma 2$ -Adaptin und Clathrin beobachtet werden, wodurch die Interaktion von  $\gamma 2$ -Adaptin und Clathrin bestätigt wird. Die Mutante  $\gamma 2\Delta C$  dagegen kolokalisiert nicht mit Clathrin. Durch das Fehlen des Clathrin-Bindemotivs wird somit die Bindung von Clathrin verhindert.

Folglich konnte in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen gezeigt werden, dass  $\gamma 2$ -Adaptin in der Scharnierregion ein spezifisches Motiv trägt, welches die Bindung von Clathrin vermittelt. Diese Interaktion scheint eine funktionelle Bedeutung zu haben, da es in Abhängigkeit von dem Clathrin-Bindungsmotiv auch zu einer Kolokalisation von  $\gamma 2$ -Adaptin und Clathrin innerhalb der Zelle kommt.

#### 4.4 Analysen zur Bedeutung des UIMs von $\gamma 2$ -Adaptin und der MVBs für die Morphogenese von HBV

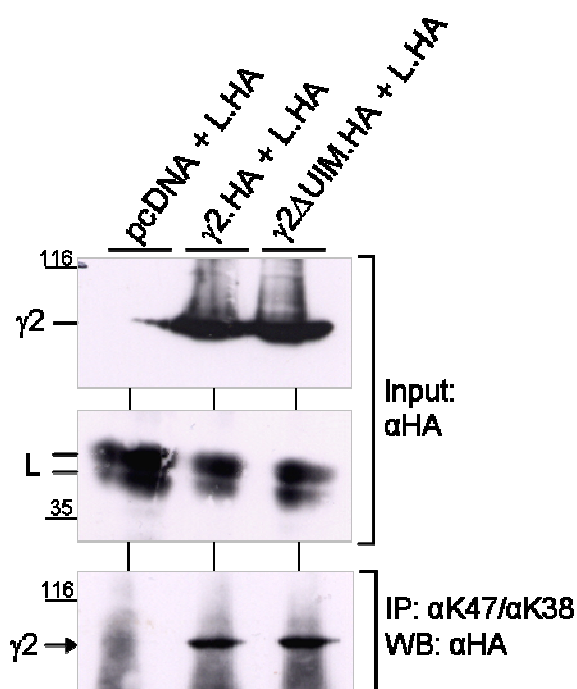
Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin von seinem UIM abhängig ist und durch Ubiquitin und Nedd4 beeinflusst wird. Da  $\gamma 2$ -Adaptin auch an der HBV-Morphogenese beteiligt ist, wobei es sowohl mit dem L-Protein als auch mit Core interagiert, sollte nun geklärt werden, inwieweit die Ubiquitin-bindenden Eigenschaften von  $\gamma 2$ -Adaptin hierbei von Bedeutung sind. Desweiteren lässt die funktionelle Beteiligung von  $\gamma 2$ -Adaptin an der Bildung der MVB-Vesikel darauf schließen, dass diese Prozesse auch bei der Umhüllung der HBV-Partikel eine Rolle spielen könnten. Eine solche Verbindung sollte daher ebenfalls untersucht werden.

##### 4.4.1 Das UIM von $\gamma 2$ -Adaptin hat keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem L-Protein

Die initiale Verknüpfung von  $\gamma 2$ -Adaptin mit der HBV-Morphogenese resultierte aus der Beobachtung, dass es zu einer spezifischen Interaktion zwischen der Ohrdomäne von  $\gamma 2$ -Adaptin und der zytosolisch-orientierten präS1-Domäne des L-Hüllproteins von HBV kommt

(Hartmann-Stuhler & Prange, 2001). Weitere Determinanten, welche diese Interaktion beeinflussen könnten, sind bislang allerdings noch nicht bekannt. Da gezeigt werden konnte, dass  $\gamma$ 2-Adaptin offenbar in enger Verbindung mit Ubiquitin agiert und das charakterisierte UIM einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin hat, könnte folglich auch die Bindung an das L-Protein von diesen Faktoren abhängig sein. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die Ubiquitinierung von Membranproteinen häufig als Sortierungssignal für die gezielte Verpackung in Vesikel dient, wobei die Erkennung der Modifikation oftmals über UIM-tragende Adaptorproteine erfolgt (Hicke & Dunn, 2003).

Um die Rolle des UIMs bei der Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin an das L-Protein zu klären, wurde die Interaktion des HBV-Hüllproteins mit der Deletionsmutante  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM untersucht. Dabei zeigt sich in Immunpräzipitationsstudien, dass bei der spezifischen Fällung des L-Proteins eine effektive Kopräzipitation von  $\gamma$ 2-Adaptin erfolgt, unabhängig davon, ob das UIM-Motiv vorhanden ist oder nicht (Abb.4-22). Folglich spielt die Ubiquitin-Erkennung durch das UIM keine entscheidende Rolle bei der Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und L.



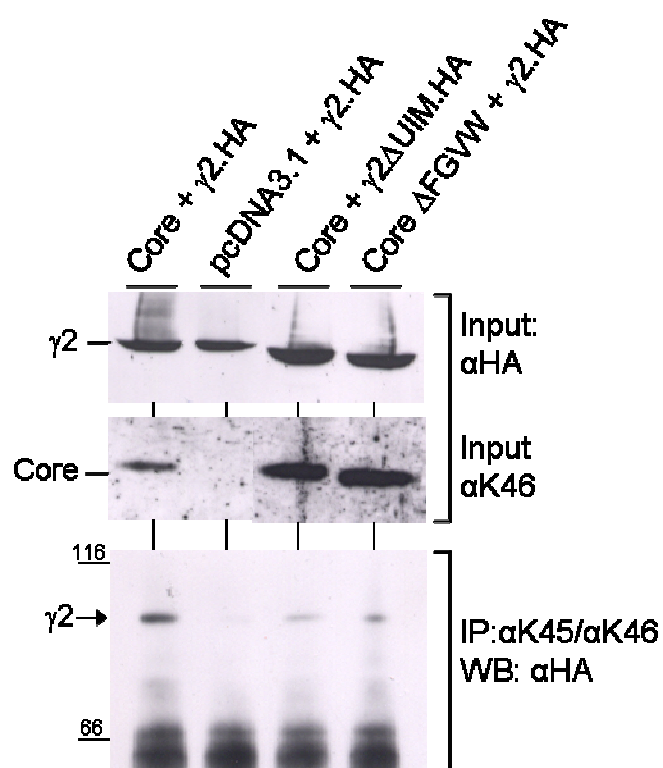
**Abb. 4-22 Die Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und L erfolgt unabhängig vom UIM.** Zum Nachweis der Interaktion wurde das L-Protein mit HA-markiertem  $\gamma$ 2-Adaptin oder der Mutante  $\gamma$ 2 $\Delta$ UIM koexprimiert. Die Lysate wurden für eine Fällung mit den L-spezifischen Antikörpern  $\alpha$ K47 und  $\alpha$ K38 eingesetzt. Die Detektion von kopräzipitiertem  $\gamma$ 2-Adaptin erfolgte durch  $\alpha$ HA-Antikörper im Western-Blot.

#### 4.4.2 Das UIM von $\gamma$ 2-Adaptin beeinflusst die Interaktion mit Core

Neben der Wechselwirkung mit dem L-Protein wird die funktionelle Beteiligung von  $\gamma$ 2-Adaptin an der HBV-Morphogenese auch durch seine Interaktion mit dem Kapsidprotein Core unterstrichen. Auch in diesem Zusammenhang gibt es Hinweise auf eine Verbindung zum Ubiquitin-System, da unter anderem gezeigt werden konnte, dass für die Bindung an  $\gamma$ 2-Adaptin ein spezifischer Lysinrest des Core-Proteins erforderlich ist und zudem eine enge

Verknüpfung zwischen Core und der Ubiquitin-Ligase Nedd4 besteht (Dissertation Mann, 2007; Rost *et al.*, 2006). Somit ist auch eine Rolle des UIM-Motivs von  $\gamma 2$ -Adaptin bei dem Kontakt mit dem HBV-Kapsid denkbar.

Um dies zu klären, wurde für diese Interaktion die UIM-Abhängigkeit durch eine Koimmunpräzipitation von Core mit der Mutante  $\gamma 2\Delta UIM$  untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei der spezifischen Fällung des Core-Proteins nur die Wildtyp-Form von  $\gamma 2$ -Adaptin effektiv gebunden wird, während das Fehlen des UIM-Motivs die Interaktion nahezu vollständig verhindert (Abb.4-23). Somit scheint das UIM und die damit verbundenen Funktionen von  $\gamma 2$ -Adaptin und Ubiquitin tatsächlich für die Wechselwirkung mit dem Kapsid relevant zu sein und folglich auch den Zusammenbau der Viren in der Zelle zu beeinflussen.



**Abb. 4-23 Analyse der Interaktion von  $\gamma 2$ -Adaptin und Core.** HuH7-Zellen wurden mit Core und HA-markiertem  $\gamma 2$ -Adaptin bzw. der Mutante  $\gamma 2\Delta UIM$  transfiziert oder mit  $\gamma 2$ .HA und der Core-Mutante Core $\Delta$ FGVW. Die Zellysate wurden für eine Core-spezifische Immunpräzipitation mit den Antikörpern  $\alpha$ K45/ $\alpha$ K46 eingesetzt, und gebundenes  $\gamma 2$ -Adaptin wurde im Western-Blot durch einen  $\alpha$ HA-Antikörper detektiert.

Dieser Befund, in Verbindung mit dem für die Interaktion kritischen Lysinrest von Core, deutet darauf hin, dass der Kontakt zwischen dem UIM und einer Ubiquitinierung des Kapsidproteins erfolgen könnte. Dennoch war es bislang nicht möglich, trotz einer Vielzahl unterschiedlicher Versuchsansätze, eine solche Modifikation von Core nachzuweisen. Es ist

somit möglich, dass das UIM nicht die eigentliche Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin und Core vermittelt, sondern dass es diese Interaktion über andere Prozesse beeinflusst.

Es wurde daher nach weiteren Motiven gesucht, die zur Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin und Core führen. Hinweise auf ein solches Motiv ergeben sich aus Arbeiten zu anderen Proteinen, die eine  $\gamma$ -Adaptin-ähnliche Ohrdomäne besitzen (Mattera *et al.*, 2004). Hierbei wurde ein Konsensusmotiv für die Interaktion definiert, welches sich an der AS-Position 122-125 des Core-Proteins wieder findet und durch die AS-Abfolge FGVW gekennzeichnet ist. Ob es sich dabei wirklich um ein für die Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin relevantes Motiv handelt, wurde mit Hilfe einer Deletionsmutante Core $\Delta$ FGVW in dem bereits beschriebenen Versuchsansatz untersucht. Tatsächlich zeigte hier das Fehlen des Motivs einen deutlichen Effekt, indem die Kopräzipitation von  $\gamma$ 2-Adaptin stark reduziert wird. Folglich sind beide Motive, sowohl das UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin als auch die FGVW-Sequenz von Core für die Assoziation der Proteine notwendig. Weitere Versuche müssen allerdings noch zeigen, wie genau der Kontakt hergestellt wird.

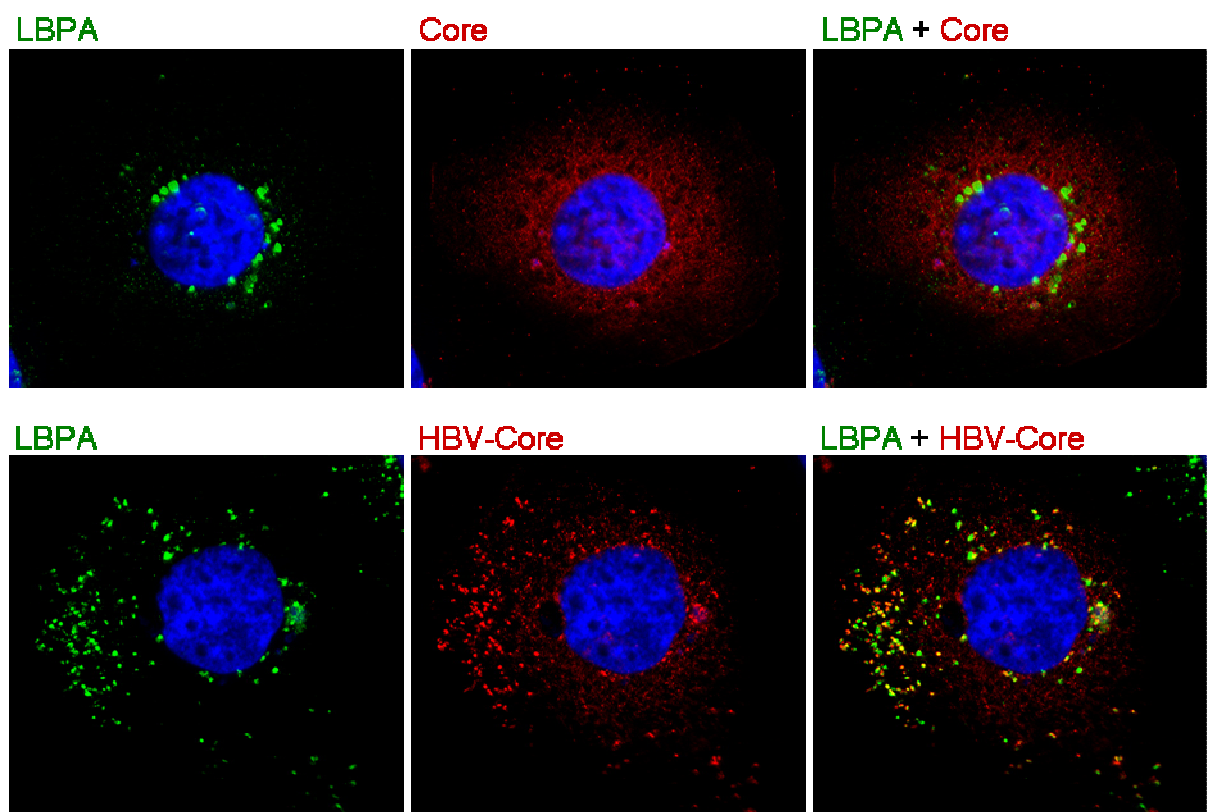
#### 4.4.3 HBV-Core kolokalisiert mit MVBs

$\gamma$ 2-Adaptin ist offenbar sowohl an der Vesikelbildung der MVBs, als auch an der Umhüllung der HBV-Partikel beteiligt, was darauf hin deutet, dass auch die HBV-Morphogenese von den Prozessen an der MVB-Membran abhängen könnte. Diesbezügliche Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die Störung später Schritte der MVB-Kaskade zur Bildung abnormaler Endosomen führt, in denen sich die HBV-Komponenten anhäufen (Lambert *et al.*, 2007). Bislang wurde jedoch noch nicht gezeigt, dass die HBV-Morphogenese auch mit intakten MVBs verknüpft ist.

Ergänzend zu den bisherigen Daten sollte daher untersucht werden, ob unter physiologischen Bedingungen mit einer funktionierenden MVB-Maschinerie ebenfalls eine Verbindung zwischen der Virusbildung und den MVBs beobachtet werden kann. Hierbei wurde die intrazelluläre Verteilung des Core-Proteins bei individueller Expression, sowie in HBV-replizierenden Zellen untersucht und bezüglich einer Kolokalisation mit dem MVB-Marker LBPA analysiert. Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem Core-Plasmid oder dem vollständigen HBV-Genom transfiziert und die Lokalisation von Core und LBPA durch Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Betrachtet man nur das Core-Protein, so ist dieses in der gesamten Zelle verteilt mit einzelnen Anhäufungen in vesikulären Strukturen, wobei keine auffälligen Übereinstimmungen mit MVBs auftreten, welche sich nahe dem Zellkern befinden (Abb.4-25, oben). Diese Verteilung ändert sich jedoch im HBV-Kontext, wenn alle Viruskomponenten exprimiert werden und somit vollständige Nukleokapside sowie die HBV-Hüllproteine in der Zelle vorliegen (Abb.3-25, unten). Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Anhäufung des Core-Proteins bzw. der Kapside in größeren Vesikeln, welche zwar in der ganzen Zelle zu finden sind, jedoch in den Randbereichen deutlich stärker konzentriert

sind. Besonders auffällig ist hier, dass es zu einer spezifischen Kolo­kalisierung mit LBPA kommt, wodurch die Vesikel als MVB-Strukturen charakterisiert werden können. Überraschend ist dabei, dass es zudem zu einer deutlichen Umverteilung der MVBs in der Zelle kommt. In Verbindung mit HBV verschwinden die kernnahen LBPA-Signale fast vollständig, so dass MVBs praktisch nur noch zusammen mit Core in Form der kleineren Vesikel in der Zellperipherie nachgewiesen werden können.

Diese Daten bestätigen somit, dass HBV offenbar die zellulären MVB-Strukturen für die Umhüllung und die Freisetzung der Viruspartikel nutzt. Hierbei werden alle viralen Substrukturen benötigt, da die einzelnen HBV-Komponenten, wie hier am Beispiel des Kapsidproteins gezeigt, scheinbar nicht in der Lage sind, die MVB-Maschinerie zu rekrutieren.



**Abb. 4-24** HBV-Core kolokalisiert mit MVB-Vesikeln in den Randbereichen der Zelle. In HuH7-Zellen wurde Core oder das vollständige HBV-Genom exprimiert, und die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion fixiert. Für die Analyse der Präparate durch Fluoreszenzmikroskopie wurde das Core-Protein über den spezifischen Antikörper  $\alpha$ K45 und einen Alexa-Fluor546-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. MVBs wurden über einen  $\alpha$ LBPA-Antikörper und einen AlexaFluor488-Antikörper nachgewiesen.

## 5 DISKUSSION

Ein charakteristischer Prozess im Replikationszyklus umhüllter Viren ist die Entstehung der Viruspartikel durch die Sprossung an Membranen der Wirtszelle. Die Kapside werden hierbei von einer Membranhülle umschlossen und aus intrazellulären Kompartimenten sezerniert oder direkt an der Plasmamembran freigesetzt. Über die genauen Vorgänge bei der Umhüllung von Viren war lange Zeit nur sehr wenig bekannt, und man ging davon aus, dass es sich vorwiegend um ein spontanes Ereignis handelt, das weitgehend durch die Viruskomponenten selbst vermittelt wird. Durch die intensive Forschung der letzten Jahre konnte jedoch gezeigt werden, dass die Morphogenese umhüllter Viren vielmehr ein regulierter Prozess ist, der von zahlreichen zellulären Faktoren und Mechanismen abhängt. Die Viren bedienen sich dabei häufig verschiedener Komponenten, die in der Zelle die Entstehung intrazellulärer Vesikel an den MVBs vermitteln (Welsch *et al.*, 2007).

Auch bei HBV handelt es sich um ein umhülltes Virus, dessen Nukleokapsid von einer Lipidhülle umschlossen wird. Im Replikationszyklus von HBV werden die viralen Hüllproteine S, M und L an der ER-Membran synthetisiert, während das Kapsidprotein Core und das P-Protein im Zytoplasma translatiert werden. Das Nukleokapsid entsteht, indem sich die Core-Proteine zusammenlagern und dabei das virale Genom und das P-Protein umschließen. Damit vollständige Viruspartikel gebildet werden, müssen daraufhin die Viruskomponenten zusammengefügt werden, d.h. die Nukleokapside müssen in die Virushülle verpackt werden. Dies erfolgt an intrazellulären Membranen der Wirtszelle, wobei die genauen Vorgänge bei der Umhüllung und Ausschleusung von HBV derzeit noch weitgehend unbekannt sind (Bruss, 2007). Ähnlich wie bei anderen umhüllten Viren scheinen allerdings auch hier zelluläre Proteine beteiligt zu sein.

Um solche Faktoren der Wirtszelle zu identifizieren, wurde im Vorfeld dieser Arbeit das große HBV-Hüllprotein genauer untersucht. Das L-Protein ist für die Umhüllung der Viruspartikel essentiell, wobei speziell die i-präS-Form eine entscheidende Rolle spielt. Hier ist die L-spezifische präS-Domäne auf der zytosolischen Seite der Membran orientiert und kann mit dem Nukleokapsid sowie mit zytosolischen Wirtszellproteinen in Kontakt treten. Aufgrund seiner Bedeutung für die HBV-Morphogenese wurde daher die präS-Domäne in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen eingesetzt, um spezifische Interaktionspartner des L-Proteins zu identifizieren. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte  $\gamma 2$ -Adaptin entdeckt werden, das an die präS-Domäne des L-Proteins bindet (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001). Bei  $\gamma 2$ -Adaptin handelt es sich vermutlich um ein neues Mitglied der Clathrin-Adaptor-Familie, das zunächst als eine neue Isoform des Adaptorproteins  $\gamma 1$ -Adaptin beschrieben wurde (Takatsu *et al.*, 1998; Lewin *et al.*, 1998). Details zur zellulären Funktion und Lokalisation von  $\gamma 2$ -Adaptin sind bislang noch nicht bekannt. In unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings gezeigt werden, dass  $\gamma 2$ -Adaptin für die Morphogenese von HBV essentiell ist, da



eine Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin in HBV-replizierenden Zellen die Entstehung umhüllter Viruspartikel hemmt (Dissertation Thome, 2007; Rost *et al.*, 2006). Um klären zu können, wie  $\gamma$ 2-Adaptin die Virusumhüllung und Freisetzung beeinflusst, ist es notwendig, mehr über die zelluläre Funktionsweise dieses potentiellen Adaptorproteins zu erfahren. Die funktionelle Charakterisierung von  $\gamma$ 2-Adaptin war daher das primäre Ziel dieser Arbeit.

### **Die Interaktion von $\gamma$ 2-Adaptin und Clathrin**

Einen ersten Anhaltspunkt für die Funktionsweise von  $\gamma$ 2-Adaptin lieferte seine große Ähnlichkeit zu den Clathrin-Adaptor-Proteinen, speziell zu  $\gamma$ 1-Adaptin. Die als Adaptine bezeichneten Mitglieder dieser Proteinfamilie sind in heterotetrameren Proteinkomplexen organisiert und vermitteln die Bildung intrazellulärer Transportvesikel und die Sortierung der darin enthaltenen Frachtmoleküle (Boehm & Bonifacino, 2001). Dabei spielt Clathrin eine wichtige Rolle, welches durch die AP-Komplexe an die Membranen rekrutiert wird und hier unter anderem die Deformation der Membran bewirkt. Die Adaptorproteine binden meist über Leuzin-reiche Sequenzmotive an Clathrin, die auch als Clathrin-Box bezeichnet werden. Bei  $\gamma$ 1-Adaptin erfolgt der Kontakt zu Clathrin über die Scharnierregion und wird durch ein Motiv mit der Sequenz LLDLL hergestellt (Doray & Kornfeld, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Sequenzanalysen dieses Clathrin-Bindemotiv auch bei  $\gamma$ 2-Adaptin identifiziert werden. Dabei zeigten die durchgeführten GST-*Pulldown*-Experimente, dass dieses LLDLL-Motiv die Bindung von Clathrin vermittelt. Durch Immunfluoreszenzstudien konnte zudem nachgewiesen werden, dass es zu einer Kolo-kalisation von Clathrin und  $\gamma$ 2-Adaptin kommt, sofern eine intakte Clathrin-Box vorhanden ist. Ebenso wie  $\gamma$ 1-Adaptin ist folglich auch  $\gamma$ 2-Adaptin in der Lage, Clathrin über ein LLDLL-Motiv zu binden. Fraglich ist jedoch, ob beide Proteine auch in gleicher Weise in der Zelle agieren. Trotz einer Homologie von etwa 60% wurden bereits in ersten Untersuchungen von  $\gamma$ 2-Adaptin deutliche Unterschiede zu  $\gamma$ 1-Adaptin festgestellt (Takatsu *et al.*, 1998; Lewin *et al.*, 1998). So zeigen beide Adaptine keine übereinstimmende Verteilung in der Zelle und assoziieren über verschiedene Mechanismen mit Membranen. Auf funktionelle Unterschiede verweist auch die Letalität  $\gamma$ 1-Adaptin-defizienter *Knockout*-Mäuse, in denen  $\gamma$ 1-Adaptin offenbar nicht durch  $\gamma$ 2-Adaptin ersetzt werden kann (Zizioli *et al.*, 1999). Umgekehrt konnten wir zeigen, dass die Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin die HBV-Freisetzung hemmt, was durch  $\gamma$ 1-Adaptin nicht verhindert werden kann (Dissertation Thome, 2007; Rost *et al.*, 2006). Zudem konnte  $\gamma$ 2-Adaptin bislang nicht in den bekannten AP-Komplexen nachgewiesen werden, weshalb eine Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin als AP-unabhängiger, möglicherweise monomerer Clathrin-Adaptor anzunehmen ist.

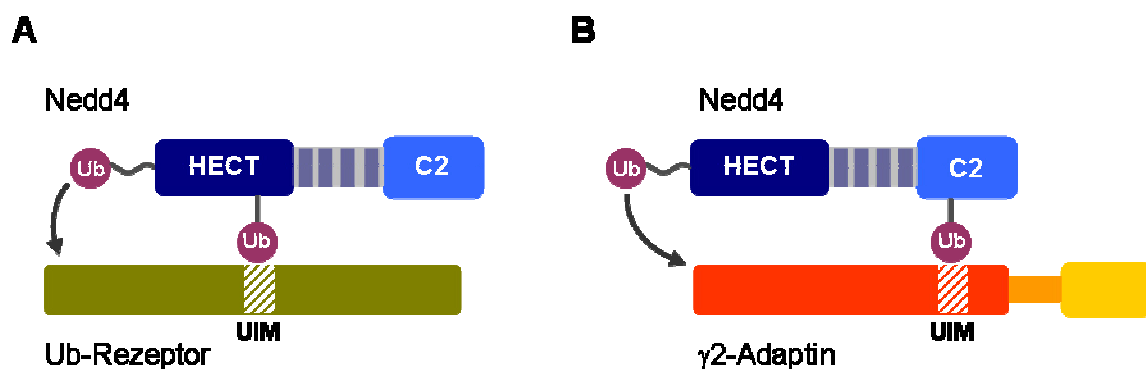
### $\gamma$ 2-Adaptin interagiert über ein UIM mit Ubiquitin

In den letzten Jahren wurden verschiedene monomere Adaptorproteine identifiziert, die bei der Vesikelentstehung an den Membranen der Zelle eine Rolle spielen und dabei ebenfalls Clathrin rekrutieren. Dazu gehören beispielsweise Proteine der GGA-Familie (Golgi-localized,  $\gamma$ -adaptin ear homology, ARF-binding proteins), die als Clathrin-Adaptoren vor allem an den Membranen des TGN, aber auch an den Endosomen wirken (Ghosh & Kornfeld, 2004). Weitere Beispiele sind die an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligten Proteine der Epsin-Familie, z.B. Eps15 (Horvath *et al.*, 2007), sowie Hrs und STAM, welche die Vesikelentstehung an den MVBs initiieren (Raiborg & Stenmark, 2002). Alle diese Proteine sind an der Sortierung der Vesikelfracht beteiligt, wobei meist eine Ubiquitin-Modifikation der *Cargo*-Moleküle als Verpackungssignal dient. Die Adaptorproteine verfügen daher über spezialisierte Ubiquitin-Bindungs-Domänen, durch die sie mit den ubiquitinierten Frachtproteinen interagieren können (Clague, 2002; Haglund & Dikic, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch bei  $\gamma$ 2-Adaptin ein solches Interaktionsmotiv identifiziert werden. Dabei handelt es sich speziell um ein UIM, wie es auch in Hrs, STAM und Eps15 vorkommt (Hofmann & Falquet, 2001; Fisher *et al.*, 2003). Durch das UIM ist  $\gamma$ 2-Adaptin in der Lage, an Ubiquitin bzw. ubiquitinierte Proteine zu binden, so dass  $\gamma$ 2-Adaptin offenbar einen neuen Ubiquitin-Rezeptor darstellt.

Eine charakteristische Eigenschaft UIM-tragender Proteine ist, dass sie häufig selbst durch eine Monoubiquitinierung modifiziert werden. Dieser Prozess wird auch als *Coupled Monoubiquitination* bezeichnet (Hicke *et al.*, 2005; Haglund & Stenmark, 2006). Die Modifikation ist hierbei von einem intakten UIM abhängig und wird häufig durch HECT-Ubiquitin-Ligasen vermittelt. Das UIM spielt dabei eine entscheidende Rolle, indem es vermutlich den Kontakt zur Ubiquitin-Ligase herstellt, welche daraufhin Ubiquitin auf das Akzeptor-Protein überträgt (Polo *et al.*, 2002). Im Einklang mit dem Modell der *Coupled Monoubiquitination* konnte ich nachweisen, dass auch  $\gamma$ 2-Adaptin durch Ubiquitin modifiziert wird und dass diese Ubiquitinierung in Abhängigkeit von dem UIM-Motiv erfolgt. Dabei zeigten die weiterführenden Analysen, dass diese Modifikation von  $\gamma$ 2-Adaptin spezifisch durch die Ubiquitin-Ligase Nedd4 vermittelt wird. Sowohl die Depletion von Nedd4, als auch die Verwendung katalytisch inaktiver Nedd4-Mutanten bewirken eine deutliche Reduktion der Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin.

In zahlreichen Untersuchungen wurde bisher gezeigt, dass speziell Nedd4 für die UIM-abhängige Modifikation verschiedener Ubiquitin-Rezeptoren, z.B. Eps15 oder Hrs, von Bedeutung ist (Hicke & Dunn, 2003). Stabile Interaktionen zwischen diesen UIM-tragenden Proteinen und der HECT-Ubiquitin-Ligase konnten bislang allerdings nicht nachgewiesen werden. Daher ist noch nicht vollständig geklärt, wie genau der Kontakt zwischen dem UIM und der Ubiquitin-Ligase erfolgt. Aktuelle Modelle zur *Coupled Monoubiquitination* gehen jedoch davon aus, dass das UIM mit dem Thiolester-gebundenen Ubiquitin der HECT-Domäne interagiert, welches anschließend auf das Substratprotein übertragen wird (Polo *et al.*, 2002;

Hicke *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten allerdings darauf hin, dass dieses Modell nicht das tatsächliche bzw. alleinige Bild der UIM-Ubiquitin-Interaktion widerspiegelt. Ubiquitin ist über einen spezifischen Cysteinrest mit der HECT-Domäne von Nedd4 verbunden. Dieses Cystein wird jedoch, ebenso wie die gesamte HECT-Domäne, für die Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 nicht benötigt. Das HECT-assoziierte Ubiquitin kann folglich nicht den Kontakt zum UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin vermitteln, so dass vermutlich direkte Ubiquitin-Modifikationen von Nedd4 hierbei eine Rolle spielen. Ähnliche Hinweise liefern Untersuchungen zur Monoubiquitinierung von Eps15, bei denen nachgewiesen werden konnte, dass Nedd4 ubiquitiniert wird und dass dies wichtig für die Nedd4-katalysierte Modifikation von Eps15 ist (Woelk *et al.*, 2006). Die Ubiquitinierung von Nedd4 wurde in der Arbeit von Woelk *et al.* (2006) allerdings nicht genau spezifiziert. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen nun, dass die Ubiquitinierung von Nedd4 an Lysinresten der C2-Domäne erfolgt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer spezifischen Interaktion der C2-Domäne mit  $\gamma$ 2-Adaptin kommt, die von dessen Ubiquitinierung abhängt. Die vorliegenden Daten bestätigen folglich ein zweites Modell von Haglund und Stenmark (2006), das die Interaktion von HECT-Ubiquitin-Ligasen mit UIM-tragenden Proteinen beschreibt und in Abbildung 5.1A dargestellt ist. Demnach wird Nedd4 selbst durch Ubiquitin-Moleküle modifiziert, über die der Kontakt zum UIM der Substratproteine hergestellt wird. Anschließend wird das mit der HECT-Domäne assoziierte Ubiquitin übertragen. Hierbei wurde angenommen, dass die Ubiquitin-Modifikation von Nedd4 ebenfalls innerhalb der HECT-Domäne erfolgt (Woelk *et al.*, 2006; Haglund & Stenmark, 2006). Ein ähnliches Modell lässt sich auch für die Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 ableiten, wobei die Bindung an das UIM durch die ubiquitinierte C2-Domäne von Nedd4 erfolgt. Dies könnte einen allgemeinen Mechanismus darstellen, durch den nicht nur der Kontakt zu  $\gamma$ 2-Adaptin, sondern auch zu anderen UIM-tragenden Proteinen hergestellt wird.



**Abb. 5-1 Modell der Coupled Monoubiquitination. A** Allgemeines Modell nach Haglund und Stenmark (2006). **B** Modell der Coupled Monoubiquitination für  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin, in Abhängigkeit vom UIM mit Ubiquitin modifiziert wird. Eine Besonderheit ist hierbei, dass  $\gamma$ 2-Adaptin wiederholt ubiquitiniert wird. Während bei anderen Ubiquitin-Rezeptoren, z.B. Hrs und Eps15, ihr UIM vorwiegend eine Monoubiquitinierung vermittelt (Hicke *et al.*, 2005), ist  $\gamma$ 2-Adaptin vermutlich in Form einer Multiubiquitinierung modifiziert. Beide Modifikationen werden dabei offensichtlich durch die gleiche Ubiquitin-Ligase Nedd4 bewirkt. Welche Regulationsmechanismen zur Unterscheidung zwischen einer Mono- oder Multiubiquitinierung führen, ist bislang nicht bekannt. Generell binden UIMs mit sehr geringer Affinität an Ubiquitin (Hurley *et al.*, 2006), so dass es vermutlich nur zu einer kurzzeitigen Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase kommt, was eine Monoubiquitinierung ermöglicht. Für  $\gamma$ 2-Adaptin konnte hier jedoch gezeigt werden, dass es abhängig vom UIM zu einer stabilen Interaktion mit Nedd4 kommt, wodurch vermutlich die multiple Ubiquitinierung von  $\gamma$ 2-Adaptin ermöglicht wird. Die Ursachen dieser starken Affinität der UIM-Ubiquitin-Bindung sind nicht bekannt. Eine Möglichkeit ist hierbei, die Interaktion durch mehrere schwache Bindungen zu festigen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das UIM des Ubiquitin-Rezeptors Hrs in der Lage ist, gleichzeitig mit zwei Monoubiquitin-Modifikationen in Kontakt zu treten, wodurch die Affinität erhöht wird (Hirano *et al.*, 2006). Da die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin deuten, dass auch die C2-Domäne mehrfach mit Ubiquitin modifiziert wird, könnte ein solcher Mechanismus auch die Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 stabilisieren.

### **Die Bedeutung des UIM-Motivs für die Interaktion von $\gamma$ 2-Adaptin mit den HBV-Proteinen**

Die bisherigen Daten zeigen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin ein Clathrin-Adaptoprotein ist, dessen Funktion und Interaktion mit anderen Proteinen durch sein UIM und seine Modifikation mit Ubiquitin beeinflusst werden. Dabei wird die Ubiquitinierung durch Nedd4 vermittelt, das mit  $\gamma$ 2-Adaptin interagiert und somit eng mit dessen zellulärer Funktion verknüpft ist. Eine besondere Rolle spielen solche Ubiquitin-bindenden Adaptorproteine für die Ubiquitin-vermittelte Sortierung von Membranproteinen bei der Endozytose sowie bei der Entstehung von Vesikeln am TGN und an den MVBs (Szymkiewicz *et al.*, 2004; Traub, 2005). In den letzten Jahren konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Ubiquitin, Ubiquitin-Rezeptoren und Ubiquitin-Ligasen eine zentrale Funktion bei der Morphogenese vieler umhüllter Viren übernehmen. Durch Ubiquitin-vermittelte Prozesse erhalten diese Viren beispielsweise Zugang zur MVB-Maschinerie, welche häufig die Umhüllung und Ausschleusung der Viruspartikel bewirkt (Martin-Serrano, 2007).

Auch bei HBV ist davon auszugehen, dass die Morphogenese der Virionen von verschiedenen Faktoren und Mechanismen der Wirtszelle abhängt. Eine entscheidende Rolle spielt dabei  $\gamma$ 2-Adaptin. So konnte wir zeigen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin nicht nur an das L-Hüllprotein von HBV bindet (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001), sondern auch mit dem Core-Protein interagiert (Rost *et al.*, 2006). Aufgrund der angenommenen Funktion als

Adaptorprotein könnte  $\gamma$ 2-Adaptin somit den Kontakt zwischen der Virushülle und dem Nukleokapsid bei der Viruszusammensetzung herstellen und so in Form eines zellulären Matrix-Proteins wirken. Um zu untersuchen, welche Rolle dabei die Ubiquitin-bindenden Eigenschaften von  $\gamma$ 2-Adaptin spielen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion der Virusproteine mit der UIM-Deletionsmutante von  $\gamma$ 2-Adaptin untersucht. Das Fehlen des UIM-Motivs hatte dabei keinen Einfluss auf die Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin an das L-Protein. Anders als bei vielen charakterisierten Sortierungsprozessen scheint hier folglich das Adaptorprotein nicht über ein Ubiquitin-Signal an das L-Membranprotein zu binden. Dennoch scheint das UIM für die Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin bei der HBV-Morphogenese von Bedeutung zu sein, da ich für die UIM-Deletionsmutante von  $\gamma$ 2-Adaptin keine Interaktion mehr mit dem Kapsid nachweisen konnte. Eine Ubiquitin-Modifikation des Kapsids bzw. Core-Proteins konnte bislang allerdings nicht gezeigt werden, so dass hierbei ein direkter Kontakt über das UIM-Motiv von  $\gamma$ 2-Adaptin unwahrscheinlich ist. Möglicherweise wird die Verbindung über andere zelluläre Komponenten hergestellt, oder es kommt zu einer unmittelbaren, d.h. Ubiquitin-unabhängigen Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin und Core. Diesbezüglich konnte ich im Core-Protein ein Motiv identifizieren, das einem Bindemotiv für  $\gamma$ -Adaptin-Ohrdomänen entspricht (Mattera *et al.*, 2004). Tatsächlich wird durch die Deletion dieser Sequenz die Interaktion mit  $\gamma$ 2-Adaptin verhindert. Die Deletionsmutanten von Core sind allerdings auch nicht mehr in der Lage, Kapside zu bilden. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass gravierende strukturelle Veränderungen des Core-Proteins hier die Bindung zu  $\gamma$ 2-Adaptin oder zu anderen zellulären Faktoren verhindern, welche möglicherweise den Kontakt vermitteln. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass das UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin die Interaktion mit dem Core-Protein beeinflusst. Demnach ist anzunehmen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin als Ubiquitin-Rezeptor bei der Umhüllung von HBV funktionell ist und dass somit auch Ubiquitin-Modifikationen diesen Prozess beeinflussen.

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von Ubiquitin bei der Morphogenese von HBV lieferte die Identifizierung einer viralen Late-Domäne. Zahlreiche Viren nutzen solche prolinreichen Motive, um eine Verbindung zu den Komponenten des zellulären Ubiquitinsystems herzustellen, die dann den Kontakt zu zellulären Sprossungsfaktoren vermitteln. Die viralen Proteine können dabei unter anderem mit Ubiquitin-Ligasen interagieren (Bieniasz, 2006). Im Rahmen einer Doktorarbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe eine solche Late-Domäne auch im HBV-Kapsidprotein identifiziert werden. Dabei zeigten die durchgeführten Untersuchungen, dass Core in Abhängigkeit von diesem PPAY-Motiv mit der WW-Domäne der Ubiquitin-Ligase Nedd4 interagiert (Dissertation Mann, 2007; Rost *et al.*, 2006). Da für  $\gamma$ 2-Adaptin sowohl eine Bindung an Nedd4 als auch an Core nachgewiesen werden konnte, wird hier möglicherweise ein multimerer Komplex gebildet, welcher die Viruskomponenten miteinander verknüpft und die Umhüllung der HBV-Kapside einleitet. Das UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin wird dabei sowohl für die Interaktion mit Nedd4 als auch

mit Core benötigt; allerdings konnte nur für Nedd4 eine Ubiquitin-Modifikation bestätigt werden. Folglich könnte  $\gamma$ 2-Adaptin über das UIM mit der ubiquitinierten C2-Domäne von Nedd4 interagieren, während Core über das PPxY-Motiv an die WW-Domäne bindet, so dass Nedd4 möglicherweise den Kontakt zwischen  $\gamma$ 2-Adaptin und Core herstellt.  $\gamma$ 2-Adaptin wird daraufhin durch Nedd4 mit Ubiquitin modifiziert, wodurch vermutlich die Interaktion mit anderen zellulären Ubiquitin-Rezeptoren möglich wird.

Bei der Umhüllung von HBV handelt es sich somit offenbar um einen Ubiquitin-abhängigen Prozess, bei dem jedoch, im Gegensatz zu vielen anderen umhüllten Viren, nicht die Virusproteine selbst ubiquitiniert werden. Ein solches Modell wurde in einer aktuellen Arbeit für die PPxY-vermittelte Virusumhüllung vorgeschlagen. Demnach werden nicht die Virusproteine, sondern vermutlich ein noch unbekannter zellulärer Adaptor durch die PPxY-gebundene Ubiquitin-Ligase modifiziert, wodurch dann der Kontakt zu den ESCRT-Komponenten vermittelt wird (Zhadina *et al.*, 2007). Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass  $\gamma$ 2-Adaptin ein solches Adaptorprotein sein könnte.

### Die Membranassoziation von $\gamma$ 2-Adaptin

Adaptorproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Vesikelentstehung an zellulären Membranen. Dabei kommt es zu einer Assoziation der Adaptorproteine mit der jeweiligen Membran, beispielsweise durch die Bindung an die *Cargo*-Proteine oder an Phospholipide (Robinson, 2004; Hicke & Dunn, 2003). Auch für  $\gamma$ 2-Adaptin konnte bereits eine Membranbindung nachgewiesen werden, was einen weiteren Hinweis für die angenommene Funktion als Adaptorprotein liefert. Anders als bei  $\gamma$ 1-Adaptin benötigt  $\gamma$ 2-Adaptin dafür das G-Protein Arf nicht (Takatsu *et al.*, 1998; Lewin *et al.*, 1998), so dass beide Proteine offensichtlich unterschiedliche Mechanismen nutzen, um an Membranen zu binden. Dafür sprechen auch die hier vorgestellten Ergebnisse, die im Vergleich zu  $\gamma$ 1-Adaptin eine stabilere Membranbindung von  $\gamma$ 2-Adaptin zeigen. Wie die Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin erfolgt, ist bislang unklar. Eine direkte Bindung an Phospholipide der Membran, wie sie beispielsweise für Hrs oder Epsin gezeigt wurden (Hicke & Dunn, 2003), konnte bei den durchgeführten Untersuchungen in unserem Labor bislang nicht nachgewiesen werden. Einen möglichen Hinweis darauf, wie  $\gamma$ 2-Adaptin den Kontakt zur Membran herstellt, liefert die Beobachtung, dass ubiquitiniertes  $\gamma$ 2-Adaptin ausschließlich membrangebunden ist. Die Ubiquitin-Modifikation könnte somit dazu beitragen, dass  $\gamma$ 2-Adaptin an Membranen bindet. Interessant ist dabei, dass die C2-Domäne von Nedd4 in der Lage ist, mit Membranlipiden zu interagieren, wodurch Nedd4 sowie damit assoziierte Proteine zu Membranen rekrutiert werden können (Rizo & Sudhof, 1998; Ingham *et al.*, 2004). Die hier durchgeführten Untersuchungen sprechen allerdings gegen eine Nedd4-vermittelte Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin. So bindet die UIM-Deletionsmutante von  $\gamma$ 2-Adaptin, welche nicht mehr mit Nedd4 interagiert und nicht ubiquitiniert wird, nach wie vor an Membranen. Der gleiche Effekt tritt bei der Depletion von Nedd4 auf, so dass folglich Nedd4 ebenso wie die Ubiquitin-

Modifikation von  $\gamma$ 2-Adaptin nicht die Ursache für die Membranbindung sein können. Vielmehr konnte hier in Immunfluoreszenzanalysen beobachtet werden, dass die C2-Domäne von Nedd4 durch  $\gamma$ 2-Adaptin zu vesikulären Strukturen geleitet wird, wo diese kolokalisieren. Aufgrund der vorliegenden Daten ist somit anzunehmen, dass stattdessen Nedd4 durch Membran-assoziiertes  $\gamma$ 2-Adaptin rekrutiert wird, welches dann mit Ubiquitin modifiziert wird. Tatsächlich deuten verschiedene Beispiele darauf hin, dass Adaptorproteine die subzelluläre Lokalisation von Nedd4 oder dessen Kontakt zu spezifischen Substraten verändern können, wodurch sie die Funktion der Ubiquitin-Ligase beeinflussen (Shearwin-Whyatt *et al.*, 2006).

Wie genau die Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin an die Membranen erfolgt, kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht abschließend bestimmt werden. Möglicherweise führt hier die direkte Interaktion mit Membranproteinen zur Membranassoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin. Einen ersten Hinweis darauf liefert die nachgewiesene Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin an das L-Hüllprotein von HBV, bei der die C-terminale Ohrdomäne von  $\gamma$ 2-Adaptin direkt an die präS-Region des L-Proteins bindet (Dissertation Thome, 2007; Hartmann-Stuhler & Prange, 2001).

### **Die intrazelluläre Lokalisation von $\gamma$ 2-Adaptin**

Ubiquitin-Modifikationen spielen eine entscheidende Rolle bei der Sortierung von Transmembranproteinen innerhalb der Zelle, beispielsweise bei der Endozytose an der Plasmamembran oder bei der Sortierung von Membranproteinen in die intraluminalen Vesikel der MVBs (Katzmann *et al.*, 2002). Zudem werden die für den lysosomalen Abbau bestimmten Membranproteine des TGN in Ubiquitin-abhängiger Weise zu den MVBs transportiert (Babst, 2004). Nicht alle Membranproteine werden dabei selbst ubiquitiniert; vielmehr können auch ubiquitinierte Adaptorproteine den Ubiquitin-abhängigen Transport vermitteln (Schnell & Hicke, 2003). Das Ubiquitin-Signal, ob am Membranprotein selbst oder einem Adaptorprotein, wird dabei von Ubiquitin-Rezeptoren erkannt, welche die Verbindung zu weiteren Komponenten für die Abschnürung der Vesikel herstellen (Hicke & Dunn, 2003). Auch für  $\gamma$ 2-Adaptin ist aufgrund der Membranassoziation sowie der Clathrin- und Ubiquitin-bindenden Eigenschaften anzunehmen, dass es in ähnlicher Weise als Ubiquitin-Rezeptor und/oder als ubiquitiniertes Adaptorprotein agiert. Unklar ist bislang, an welchen Prozessen es dabei genau beteiligt ist. Die Analysen zur zellulären Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin deuten allerdings an, dass es weder an der Plasmamembran noch an den Membranen des ER und Intermediärkompartiments funktionell ist. Auch die bereits in der Arbeit von Lewin *et al.* (1998) veröffentlichte Lokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin am TGN konnte ich nicht bestätigen. Aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen scheint dagegen eine Assoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit endosomalen Kompartimenten, speziell den MVBs, wahrscheinlich.  $\gamma$ 2-Adaptin könnte hier, ebenso wie die Adaptorproteine Hrs und GGA, an der Sortierung der ubiquitinierten Frachtmoleküle beteiligt sein (Babst, 2004).

An den Membranen der späten Endosomen und der MVBs bilden ubiquitinierte und Ubiquitin-bindende Proteine ein Netzwerk von Protein-Komplexen, die ESCRT-Komplexe, die die Sortierung der ubiquitinierten Frachtmoleküle in die entstehenden intraluminalen Vesikel vermitteln (Haglund & Dikic, 2005). Durch Defekte innerhalb dieser MVB-Kaskade wird die Vesikelabschnürung in das Lumen der MVBs gehemmt, woraufhin abnormale, vergrößerte Endosomen entstehen. Diese sind nicht funktionell, so dass endozytierte Rezeptormoleküle, welche durch intakte MVBs dem lysosomalen Abbau zugeführt werden, nicht degradiert werden können, sondern in endosomalen Strukturen akkumulieren (Piper & Katzmann, 2007). In verschiedenen experimentellen Ansätzen konnten hier solche Effekte auch durch die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin induziert werden. So entstehen durch die Reduktion von  $\gamma$ 2-Adaptin große vesikuläre Strukturen, die durch Färbung mit dem spezifischen Marker LBPA als veränderte MVBs identifiziert werden konnten. Der Abbau von endozytiertem EGF ist dabei nicht mehr möglich, so dass es zu einer Akkumulation von EGF in der Zelle kommt. Der Verlust von  $\gamma$ 2-Adaptin hat folglich einen starken Einfluss auf die Struktur und Funktion der MVBs. Dabei werden ähnliche Veränderungen hervorgerufen, wie bei der Depletion verschiedener Komponenten der MVB-Kaskade, z.B. Tsg101 oder Vps4 (Williams & Urbe, 2007). Dies deutet darauf hin, dass  $\gamma$ 2-Adaptin bei der Vesikelbildung an den Membranen der MVBs funktionell ist, wo es als Ubiquitin-Rezeptor die Sortierung der ubiquitinierten Frachtmoleküle vermitteln könnte.

Vergleicht man in  $\gamma$ 2-Adaptin- und Tsg101-depletierten Zellen gleichzeitig die Verteilung von EGF und LBPA, so wird dennoch ein Unterschied deutlich. Während die Reduktion von Tsg101 zu einer Anhäufung von EGF in LBPA-positiven Strukturen führt, sind in  $\gamma$ 2-reduzierten Zellen getrennte EGF- und LBPA-Vesikel erkennbar. Da sowohl EGF als auch LBPA in verschiedenen Arbeiten als Marker für MVBs identifiziert wurden, ist diese Beobachtung nur schwer zu interpretieren (Hopkins *et al.*, 1990; Futter *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 1998). Eine aktuelle Arbeit zeigt allerdings, dass es offenbar verschiedene Formen von MVBs gibt. Hierbei konnten in EGF-stimulierten Zellen getrennte EGF- und LBPA-positive MVBs identifiziert werden, die erst in einer sehr späten Phase des EGF-Transports kolokalisieren (White *et al.*, 2006). Diese Beobachtung ist im Einklang mit einem Modell, nach dem es unterschiedliche MVB-Subtypen gibt. Eine LBPA-negative Form dient dabei als eine Art Transport-Vakuole zu den späten Endosomen/MVBs oder Lysosomen, die dann auch LBPA-positive Bereiche aufweisen (Gruenberg & Stenmark, 2004). Es kommt somit zu einem Fusionsprozess der verschiedenen endosomalen Strukturen. Möglicherweise beeinflusst  $\gamma$ 2-Adaptin nicht nur die Entstehung der internen Vesikel, sondern auch die Fusion der MVBs, so dass nach Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin getrennte LBPA- und EGF-positive MVBs erhalten bleiben. Tsg101 ist hierbei offenbar nicht beteiligt, so dass die Fusion stattfinden kann, wodurch EGF und LBPA kolokalisieren. Die Daten zeigen somit, dass  $\gamma$ 2-Adaptin eine andere Funktion im Vergleich zu Tsg101 übernimmt.



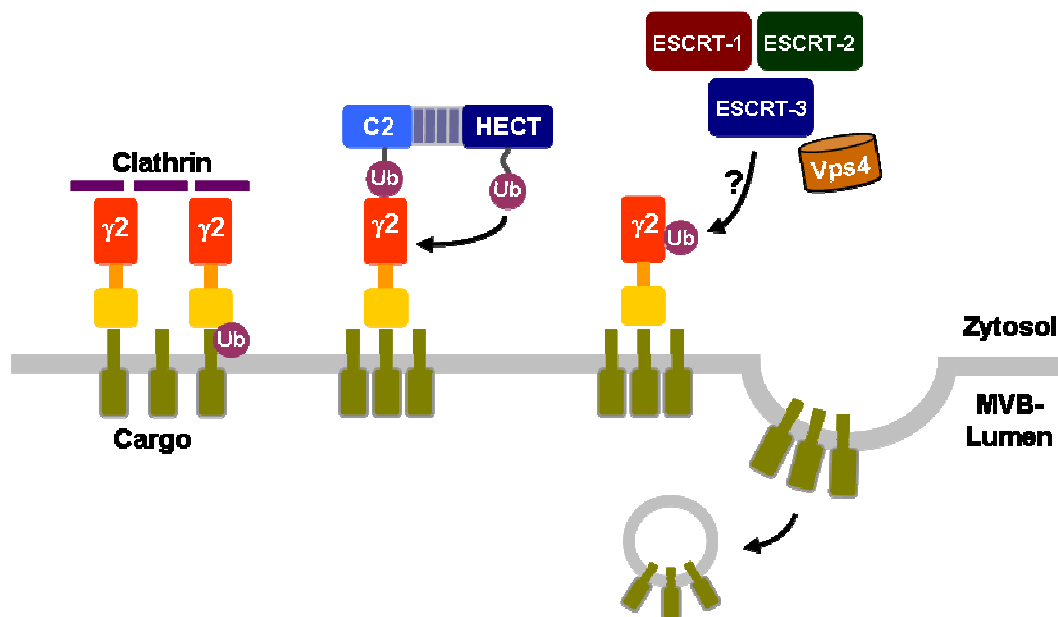
### **Die Kolokalisation von HBV mit LBPA-positiven Vesikeln**

Die hier gezeigten Daten weisen auf eine funktionelle Beteiligung von  $\gamma$ 2-Adaptin bei der Entstehung intraluminaler Vesikel an den MVBs hin und bestätigen damit die Ergebnisse unserer vorangegangenen Studien, bei denen eine Beeinflussung der MVB-Kaskade durch  $\gamma$ 2-Adaptin beobachtet werden konnte (Lambert *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass durch Störungen der MVB-Kaskade auch die Morphogenese von HBV beeinflusst wird, da die viralen Proteine unter diesen Umständen in den vergrößerten endosomalen Strukturen angereichert werden. In ähnlicher Weise führt auch die Überexpression von  $\gamma$ 2-Adaptin zu einer Akkumulation der HBV-Kapsidproteine in späten endosomalen Strukturen, wo sie mit  $\gamma$ 2-Adaptin kolokalisieren (Rost *et al.*, 2006). Dies führte zu der Annahme, dass die Umhüllung der HBV-Partikel direkt an den Membranen der späten Endosomen/MVBs erfolgt. Bislang fehlte jedoch der Nachweis, dass auch bei physiologisch intakten MVBs eine Verbindung zu den Viruskomponenten besteht. Die hier durchgeführten Immunfluoreszenzstudien zeigen nun, dass es in HBV-produzierenden Leberzellen tatsächlich zu einer Kolokalisation von Virusproteinen mit den MVBs kommt. Dabei konnte das Core-Protein in vesikulären Strukturen nachgewiesen werden, die den MVB-Marker LBPA tragen. Auffällig ist hierbei, dass die typische Verteilung von LBPA in der Zelle offenbar durch HBV beeinflusst wird. Im Vergleich zur Wildtyp-Verteilung sind die LBPA-positiven Vesikel hier deutlich kleiner und sie sind in den Randbereichen der Zelle angereichert. Dies könnte darauf hin deuten, dass HBV auf unbekannte Weise den Transport der MVBs zur Plasmamembran und möglicherweise auch deren Fusion fördert, wodurch die HBV-Partikel aus der Zelle freigesetzt werden könnten. Die Beobachtungen bestätigen somit, dass die Umhüllung der HBV-Nukleokapside vermutlich an den Membranen der MVBs erfolgt, wo möglicherweise  $\gamma$ 2-Adaptin den Kontakt zu den ESCRT-Komponenten herstellt, welche die Abschnürung der HBV-Partikel in das MVB-Lumen bewirken.

### **Modell zur physiologischen Wirkungsweise von $\gamma$ 2-Adaptin**

Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin genauer zu charakterisieren, wobei auch neue Erkenntnisse gewonnen werden sollten, wie  $\gamma$ 2-Adaptin die HBV-Morphogenese steuert. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu  $\gamma$ 1-Adaptin wurde bislang vermutet, dass  $\gamma$ 2-Adaptin als Adaptorprotein in der Zelle agiert. Eine genaue Analyse der Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin fehlte bisher allerdings. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen liefern nun zahlreiche neue Hinweise, die tatsächlich auf eine Adaptorfunktion von  $\gamma$ 2-Adaptin schließen lassen. Hierbei konnten ähnliche Eigenschaften nachgewiesen werden, wie sie die Adaptorproteine der GGA-Familie und Hrs besitzen (Babst, 2004), so dass eine vergleichbare Funktionsweise auch für  $\gamma$ 2-Adaptin anzunehmen ist. Demnach könnte  $\gamma$ 2-Adaptin ebenfalls an der Sortierung von Membranproteinen in die

Vesikel der MVBs beteiligt sein. Ein mögliches Modell zur Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin an endosomalen Membranen ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Vermutlich bindet  $\gamma 2$ -Adaptin hier an die Frachtmoleküle in der MVB-Membran und bewirkt durch die Rekrutierung von Clathrin die lokale Anreicherung der Membranproteine. Diese müssen dabei nicht zwingend ubiquitiniert sein.  $\gamma 2$ -Adaptin könnte hier als ubiquitiniertes Adaptormolekül womöglich speziell die Sortierung nicht modifizierter Membranproteine vermitteln und den Kontakt zu den Ubiquitin-abhängigen Prozessen der Vesikelbildung herstellen.



**Abb. 5-2** Modell zur Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin bei der Entstehung intraluminaler Vesikel an der MVB-Membran.

Eine Besonderheit von  $\gamma 2$ -Adaptin ist seine Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4. Verschiedene Arbeiten deuten darauf hin, dass HECT Ubiquitin-Ligasen bei den Prozessen an der MVB-Membran eine Rolle spielt, wobei über eine Verbindung zum ESCRT-III-Komplex spekuliert wird. Ein direkter Kontakt zu diesen Komponenten konnte bislang allerdings nicht nachgewiesen werden, weshalb angenommen wird, dass ein noch unbekannter Adaptor die Verbindung zur ESCRT-Maschinerie vermittelt (Martin-Serrano, 2007; Chen & Lamb, 2008). Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse, könnte  $\gamma 2$ -Adaptin einen solchen Kontakt herstellen. Dabei wäre anzunehmen, dass ubiquitiniertes Nedd4 durch das UIM von  $\gamma 2$ -Adaptin zur MVB-Membran rekrutiert wird, woraufhin  $\gamma 2$ -Adaptin selbst mit Ubiquitin modifiziert wird. Durch diese Modifikation könnte dann eine Verbindung von  $\gamma 2$ -Adaptin zu Ubiquitin-Rezeptoren der ESCRT-Maschinerie ermöglicht werden.

### Modell zur Wirkungsweise von $\gamma$ 2-Adaptin bei der HBV-Morphogenese

Ähnlich seiner physiologischen Funktionsweise scheint  $\gamma$ 2-Adaptin auch an der Morphogenese von HBV beteiligt zu sein. Somit lässt sich ein vergleichbares Modell für die Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin bei der Umhüllung der HBV-Partikel ableiten, welches in Abbildung 5.3 dargestellt ist. Vermutlich läuft dieser Prozess an den Membranen der späten Endosomen/MVBs ab, wo  $\gamma$ 2-Adaptin in Ubiquitin-unabhängiger Weise mit dem L-Protein von HBV interagiert. Auch hier könnte daraufhin die Rekrutierung von Clathrin dazu führen, dass die HBV-Hüllproteine lokal in der Membran angereichert werden, wodurch eine Art Sprossungsplattform gebildet wird. Das Nukleokapsid wird vermutlich durch die Interaktion mit  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 ebenfalls zu dieser Membranregion geleitet. Dabei bilden diese drei Komponenten vermutlich einen Komplex, in dem das Kapsid durch die PPAY-Late-Domäne an Nedd4 bindet und Nedd4 über die Ubiquitin-Modifikation der C2-Domäne mit dem UIM von  $\gamma$ 2-Adaptin interagiert. Auch eine direkte Bindung von  $\gamma$ 2-Adaptin und Core ist hier möglich. Wahrscheinlich stellt Nedd4 dabei zunächst die Verbindung zu  $\gamma$ 2-Adaptin her, woraufhin Core auf  $\gamma$ 2-Adaptin übertragen wird und/oder direkt mit den Hüllproteinen in Kontakt tritt. Analog zu dem Modell für die zelluläre Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin wird dieses vermutlich auch im HBV-Kontext durch Nedd4 ubiquitiniert, wodurch die Komponenten der ESCRT-Maschinerie zum Ort der Viruszusammensetzung rekrutiert werden können. Diese vermitteln schließlich die Umhüllung der Nukleokapside und die Abschnürung der HBV-Partikel in das Lumen der MVBs. Die Freisetzung der Virionen aus der Zelle erfolgt dann möglicherweise durch die Fusion der MVBs mit der Plasmamembran.

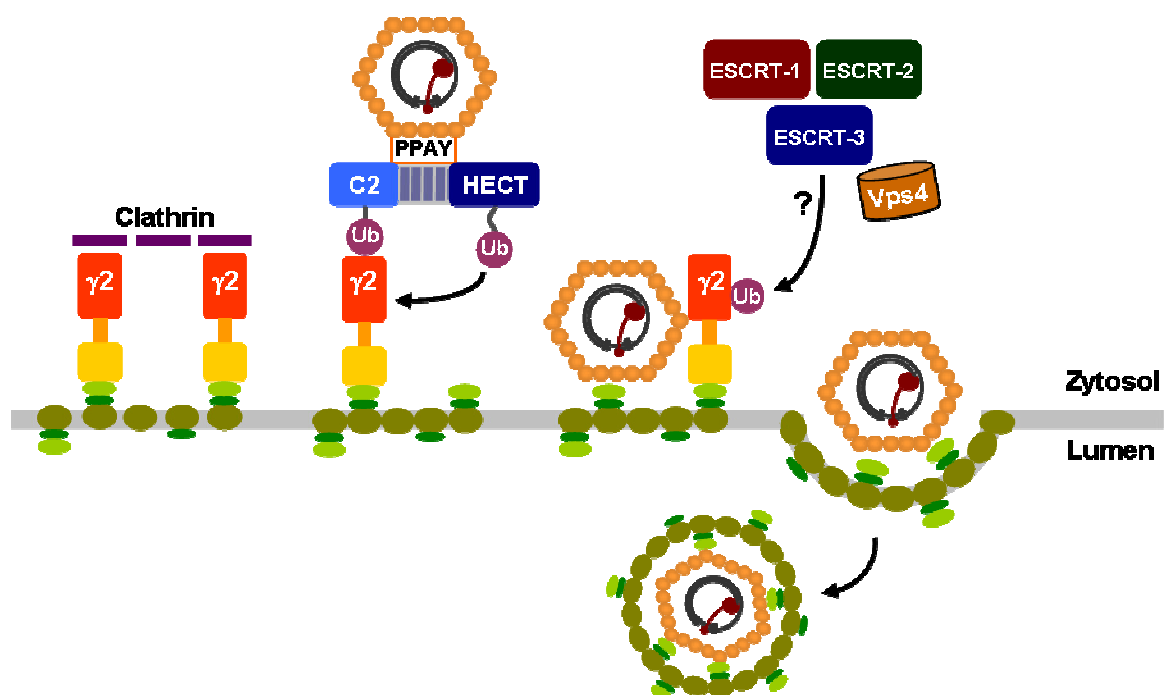


Abb. 5-3 Modell zur Funktion von  $\gamma$ 2-Adaptin bei der Morphogenese von HBV.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Replikationszyklus umhüllter Viren entstehen neue Viruspartikel durch die Knospung an Membranen der Wirtszelle. An diesem Prozess sind verschiedene zelluläre Faktoren und Mechanismen beteiligt, speziell die ESCRT-Proteinkomplexe, welche die Vesikelbildung an den MVBs steuern (Welsch *et al.*, 2007). Auch bei HBV ist davon auszugehen, dass Komponenten der Wirtszelle an der Umhüllung und Freisetzung der Virionen beteiligt sind, allerdings sind diese noch weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die zellulären Faktoren genauer zu charakterisieren und ihre Funktion bei der Virusumhüllung aufzuklären.

Den Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Untersuchungen bildeten vorangegangene Arbeiten, in denen die spezifische Interaktion des L-Hüllproteins von HBV mit  $\gamma 2$ -Adaptin nachgewiesen werden konnte (Hartmann-Stuhler & Prange, 2001). Diese ist für die Morphogenese von HBV essentiell (Dissertation Thome, 2007; Rost *et al.*, 2006), allerdings ist die zelluläre ebenso wie die virusspezifische Funktion von  $\gamma 2$ -Adaptin bislang unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, wo und wie  $\gamma 2$ -Adaptin in der Zelle funktionell ist, um daraus Rückschlüsse auf die Vorgänge bei der Morphogenese von HBV ziehen zu können.

Die Grundlage für die Charakterisierung von  $\gamma 2$ -Adaptin bildete seine Ähnlichkeit zu zellulären Clathrin-Adaptorproteinen (Takatsu *et al.*, 1998; Lewin *et al.*, 1998). So konnte hier gezeigt werden, dass auch  $\gamma 2$ -Adaptin ein Clathrin-Bindungsmotiv besitzt, welches eine Interaktion mit Clathrin ermöglicht. Außerdem konnte ein Ubiquitin-Interaktions-Motiv (UIM) identifiziert werden, das die Bindung an ubiquitinierte Proteine vermittelt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass  $\gamma 2$ -Adaptin zu einer Gruppe monomerer Adaptorproteine zählen könnte, welche als Ubiquitin-Rezeptoren in der Zelle funktionell sind. Die folgenden Analysen zeigten eine weitere Gemeinsamkeit, da auch  $\gamma 2$ -Adaptin selbst durch Ubiquitin modifiziert wird, wobei die Ubiquitinierung von einem intakten UIM abhängt. Dieser als *Coupled Monoubiquitination* bezeichnete Prozess (Haglund & Stenmark, 2006) wird hierbei durch die Ubiquitin-Ligase Nedd4 vermittelt, die direkt mit  $\gamma 2$ -Adaptin interagiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die C2-Domäne von Nedd4 ebenfalls mit Ubiquitin modifiziert ist, wodurch der Kontakt zum UIM von  $\gamma 2$ -Adaptin erfolgt.

Die meisten der bislang bekannten Ubiquitin-bindenden Adaptorproteine, spielen bei der Vesikelentstehung an verschiedenen zellulären Membranen eine Rolle, wo sie an der Sortierung der vorwiegend ubiquitinierten Membranproteine beteiligt sind und zelluläre Komponenten rekrutieren, welche die Vesikelabschnürung vermitteln (Hicke & Dunn, 2003). Die Adaptorproteine sind dabei meist mit der jeweiligen Membran assoziiert, was auch für  $\gamma 2$ -Adaptin nachgewiesen werden konnte. Diese Membranbindung wird durch den N-terminalen Proteinbereich von  $\gamma 2$ -Adaptin vermittelt und erfolgt unabhängig von den Ubiquitin-bindenden

Eigenschaften und von Nedd4. Allerdings scheint die Ubiquitin-Modifikation von  $\gamma$ 2-Adaptin ausschließlich in membrangebundener Form zu erfolgen. An welchen Membranen  $\gamma$ 2-Adaptin lokalisiert ist, wurde in Immunfluoreszenzstudien untersucht, wobei eine enge Assoziation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit späten Endosomen bzw. MVBs zu beobachten war. Bei weiteren Analysen konnte auch ein funktioneller Einfluss auf die Vesikelentstehung an den MVBs nachgewiesen werden, da durch die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin stark vergrößerte, defekte MVBs induziert wurden. Dies deutet darauf hin, dass  $\gamma$ 2-Adaptin als Ubiquitin-Rezeptor an diesen Prozessen beteiligt sein könnte. Ebenso wie andere Adaptorproteine könnte es hier an die *Cargo*-Proteine binden, diese durch den Kontakt zu Clathrin lokal konzentrieren und die Vesikelabschnürung durch die Rekrutierung der MVB-Maschinerie vermitteln. Möglicherweise stellt  $\gamma$ 2-Adaptin hierbei den bislang nicht identifizierten Adaptor dar, der die Verbindung zwischen Nedd4 und der MVB-Kaskade herstellt.

Eine ähnliche Funktion für  $\gamma$ 2-Adaptin ist auch bei der Morphogenese von HBV denkbar. Aufgrund der durchgeführten Lokalisationsstudien ist anzunehmen, dass die Umhüllung der HBV-Partikel direkt an den MVBs erfolgt. Vermutlich bindet  $\gamma$ 2-Adaptin hier an das L-Hüllprotein, wobei es durch die Rekrutierung von Clathrin zu einer lokalen Anreicherung der Hüllproteine kommt.  $\gamma$ 2-Adaptin interagiert zudem in UIM-abhängiger Weise mit dem Nukleokapsid, wobei der Kontakt direkt erfolgen könnte oder durch die Ubiquitin-Ligase Nedd4 vermittelt wird, welche über eine Late-Domäne ebenfalls mit dem Nukleokapsid verbunden ist. Anscheinend gelangt das Nukleokapsid durch den Einfluss von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 zum Ort der Virusmorphogenese, wo die eigentliche Umhüllung und die Abschnürung der Viruspartikel erfolgen. Vermutlich sind auch hier Komponenten der MVB-Maschinerie beteiligt, die womöglich durch  $\gamma$ 2-Adaptin rekrutiert werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ausubel (1994).** Current protocols in molecular biology: John Wiley & Sons.
- Babst, M. (2004).** GGAing ubiquitin to the endosome. *Nat Cell Biol* **6**, 175-177.
- Babst, M. (2005).** A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9.
- Beck, J. & Nassal, M. (2007).** Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* **13**, 48-64.
- Bieniasz, P. D. (2006).** Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**, 55-63.
- Bishop, N., Horman, A. & Woodman, P. (2002).** Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* **157**, 91-9101.
- Blot, V., Perugi, F., Gay, B. & other authors (2004).** Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *J Cell Sci* **117**, 2357-2367.
- Boehm, M. & Bonifacino, J. S. (2001).** Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**, 2907-2920.
- Bouamr, F., Melillo, J. A., Wang, M. Q., Nagashima, K., de Los Santos, M., Rein, A. & Goff, S. P. (2003).** PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]. *J Virol* **77**, 11882-11895.
- Bruss, V. & Ganem, D. (1991).** The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1059-1063.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R. & Gerlich, W. H. (1994).** Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* **13**, 2273-2279.
- Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E. & Galle, P. R. (1996).** Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* **218**, 396-399.
- 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. (2004).** Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* **106**, 199-209.
- Bruss, V. (2007).** Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* **13**, 65-73.
- Chen, B. J. & Lamb, R. A. (2008).** Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* **372**, 221-232.
- Clague, M. J. (2002).** Membrane transport: a coat for ubiquitin. *Curr Biol* **12**, 529-531.
- Doray, B. & Kornfeld, S. (2001).** Gamma subunit of the AP-1 adaptor complex binds clathrin: implications for cooperative binding in coated vesicle assembly. *Mol Biol Cell* **12**, 1925-1935.

- Doyotte, A., Russell, M. R. G., Hopkins, C. R. & Woodman, P. G. (2005).** Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* **118**, 3003-3017.
- Eble, B. E., MacRae, D. R., Lingappa, V. R. & Ganem, D. (1987).** Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**, 3591-3601.
- Eble, B. E., Lingappa, V. R. & Ganem, D. (1990).** The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* **64**, 1414-1419.
- Fernholz, D., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. & Will, H. (1991).** Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. *J Hepatol* **13 Suppl 4**, 102-104.
- Fisher, R. D., Wang, B., Alam, S. L., Higginson, D. S., Robinson, H., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. (2003).** Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem* **278**, 28976-28984.
- Futter, C. E., Collinson, L. M., Backer, J. M. & Hopkins, C. R. (2001).** Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J Cell Biol* **155**, 1251-1264.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. & Charnay, P. (1979).** Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* **281**, 646-650.
- Ganem, D. & Varmus, H. E. (1987).** The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* **56**, 651-693.
- Gerlich, W. H. & Robinson, W. S. (1980).** Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**, 801-809.
- Ghosh, P. & Kornfeld, S. (2004).** The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol* **83**, 257-262.
- Gibson, T. J. (1984).** Studies on the Epstein-Barr virus genome. *PhD thesis, University of Cambridge, UK*.
- Glebe, D. & Urban, S. (2007).** Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* **13**, 22-38.
- Gripon, P., Cannie, I. & Urban, S. (2005).** Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* **79**, 1613-1622.
- Gruenberg, J. & Stenmark, H. (2004).** The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 317-323.
- Haglund, K. & Dikic, I. (2005).** Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* **24**, 3353-3359.
- Haglund, K. & Stenmark, H. (2006).** Working out coupled monoubiquitination. *Nat Cell Biol* **8**, 1218-1219.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harrisson, S. C. (2007).** Principles of Virus Structure. In *Fields' Virology Fifth Edition*, pp. 59-98. Edited by D. K. M & P. H. M. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

- Hartmann-Stuhler, C. & Prange, R. (2001).** Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* **75**, 5343-5351.
- Hawley-Nelson, P. & Ciccarone, V. (2001).** Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents. *Curr Protoc Neurosci Appendix* **1**.
- Heermann, K. H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. & Gerlich, W. H. (1984).** Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* **52**, 396-402.
- Hicke, L. (2001).** Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195-201.
- Hicke, L. & Dunn, R. (2003).** Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-172.
- Hicke, L., Schubert, H. L. & Hill, C. P. (2005).** Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 610-621.
- Hirano, S., Kawasaki, M., Ura, H., Kato, R., Raiborg, C., Stenmark, H. & Wakatsuki, S. (2006).** Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 272-277.
- Hoeller, D., Crosetto, N., Blagoev, B. & other authors (2006).** Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol* **8**, 163-169.
- Hof, H., Dörries, R. (2002).** Virologie. In *Medizinische Mikrobiologie*. Edited by H. Hof & R. Dörries. Stuttgart: Georg Thieme Verlag GmbH.
- Hofmann, K. & Falquet, L. (2001).** A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 347-350.
- Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M. & Miller, K. (1990).** Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* **346**, 335-339.
- Horvath, C. A. J., Vanden Broeck, D., Boulet, G. A. V., Bogers, J. & De Wolf, M. J. S. (2007).** Epsin: inducing membrane curvature. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1765-1770.
- Hu, J., Toft, D. O. & Seeger, C. (1997).** Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J* **16**, 59-68.
- Hunter, E. (2007).** Virus Assembly. In *Fields' Virology*, pp. 141-168. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley: Lippincott Williams and Wilkins.
- Hurley, J. H., Lee, S. & Prag, G. (2006).** Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* **399**, 361-372.
- Hurley, J. H. (2008).** ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 4-11.
- Ingham, R. J., Gish, G. & Pawson, T. (2004).** The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* **23**, 1972-1984.
- Kann, M., Schmitz, A. & Rabe, B. (2007).** Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* **13**, 39-47.
- Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H. & Robinson, W. S. (1973).** DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* **12**, 995-991005.



- Katz, M., Shtiegman, K., Tal-Or, P. & other authors (2002).** Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* **3**, 740-751.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G. & Emr, S. D. (2002).** Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.
- Kikonyogo, A., Bouamr, F., Vana, M. L., Xiang, Y., Aiyar, A., Carter, C. & Leis, J. (2001).** Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11199-11204.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G. & Gruenberg, J. (1998).** A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-197.
- Koeck, J. & Schlicht, H. J. (1993).** Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol* **67**, 4867-4874.
- Koschel, M., Oed, D., Gerelsaikhan, T., Thomssen, R. & Bruss, V. (2000).** Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J Virol* **74**, 1-7.
- Lambert, C. & 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. & Prange, R. (2003).** Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5199-5204.
- Lambert, C., Doring, T. & Prange, R. (2007).** Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* **81**, 9050-9060.
- Le Pogam, S. & Shih, C. (2002).** Influence of a putative intermolecular interaction between core and the pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus secretion. *J Virol* **76**, 6510-6517.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C. & Gripon, P. (1998).** Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* **72**, 5573-5578.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C. & Gripon, P. (1999).** Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* **73**, 2052-2057.
- Lee, S., Joshi, A., Nagashima, K., Freed, E. O. & Hurley, J. H. (2007).** Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 194-199.
- Lewin, D. A., Sheff, D., Ooi, C. E., Whitney, J. A., Yamamoto, E., Chicione, L. M., Webster, P., Bonifacino, J. S. & Mellman, I. (1998).** Cloning, expression, and localization of a novel gamma-adaptin-like molecule. *FEBS Lett* **435**, 263-268.
- Loffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C. & Prange, R. (2000).** Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* **270**, 358-367.
- Mabit, H. & Schaller, H. (2000).** Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding. *J Virol* **74**, 11472-11478.

- Mann, S. (2007).** Die Rolle Prolin-reicher Sequenzmotive des Core-Proteins in der Morphogenese des Hepatitis-B Virus. *Dissertation, Universität Mainz.*
- Marmor, M. D. & Yarden, Y. (2004).** Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* **23**, 2057-2070.
- Martin-Serrano, J., Perez-Caballero, D. & Bieniasz, P. D. (2004).** Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol* **78**, 5554-5563.
- Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W. & Bieniasz, P. D. (2005).** HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* **168**, 89-8101.
- Martin-Serrano, J. (2007).** The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traffic* **8**, 1297-1303.
- Mason, W. S., Aldrich, C., Summers, J. & Taylor, J. M. (1982).** Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3997-4001.
- Mattera, R., Ritter, B., Sidhu, S. S., McPherson, P. S. & Bonifacino, J. S. (2004).** Definition of the consensus motif recognized by gamma-adaptin ear domains. *J Biol Chem* **279**, 8018-8028.
- Modrow, S. & Falke, D.** Molekulare Virologie: Spektrum, Akad. Verlag.
- Nickerson, D. P., Russell, M. R. G. & Odorizzi, G. (2007).** A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep* **8**, 644-650.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Chertova, E. N., Gagliardi, T. D. & Schubert, U. (2000).** Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* **278**, 111-121.
- Pe'ery, T. & Mathews, M. B. (2007).** Viral Conquest of the Host Cell. In *Fields Virology Fifth Edition*. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Perlman, D. H., Berg, E. A., O'Connor, P. B., Costello, C. E. & Hu, J. (2005).** Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9020-9025.
- Persing, D. H., Varmus, H. E. & Ganem, D. (1987).** The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol* **61**, 1672-1677.
- Peterson, D. L., Nath, N. & Gavilanes, F. (1982).** Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J Biol Chem* **257**, 10414-10420.
- Piper, R. C. & Katzmann, D. J. (2007).** Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 519-547.
- Poisson, F., Severac, A., Hourieux, C., Goudeau, A. & Roingeard, P. (1997).** Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* **228**, 115-120.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P. & Di Fiore, P. P. (2002).** A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* **416**, 451-455.
- Ponsel, D. & Bruss, V. (2003).** Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol* **77**, 416-422.

- Pornillos, O., Alam, S. L., Rich, R. L., Myszka, D. G., Davis, D. R. & Sundquist, W. I. (2002).** Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *EMBO J* **21**, 2397-2406.
- Prange, R. & Streeck, R. E. (1995).** Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J* **14**, 247-256.
- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A. & Kann, M. (2003).** Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9849-9854.
- Radziwill, G., Tucker, W. & Schaller, H. (1990).** Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* **64**, 613-620.
- Raiborg, C. & Stenmark, H. (2002).** Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct* **27**, 403-408.
- Raiborg, C., Wesche, J., Malerod, L. & Stenmark, H. (2006).** Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *J Cell Sci* **119**, 2414-2424.
- Rizo, J. & Sudhof, T. C. (1998).** C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem* **273**, 15879-15882.
- Robinson, M. S. (2004).** Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**, 167-174.
- Robinson, W. S. (1977).** The genome of hepatitis B virus. *Annu Rev Microbiol* **31**, 357-377.
- Roseman, A. M., Berriman, J. A., Wynne, S. A., Butler, P. J. G. & Crowther, R. A. (2005).** A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15821-15826.
- Rost, M., Mann, S., Lambert, C., Doring, T., Thome, N. & Prange, R. (2006).** Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J Biol Chem* **281**, 29297-29308.
- Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H. & Erlich, H. A. (1988).** Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* **319**, 537-541.
- Sambrook (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattler, F. & Robinson, W. S. (1979).** Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* **32**, 226-233.
- Schaller, H. & Fischer, M. (1991).** Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **168**, 21-39.
- Schlicht, H. J. & Schaller, H. (1989).** Analysis of hepatitis B virus gene functions in tissue culture and in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* **144**, 253-263.
- Schnell, J. D. & Hicke, L. (2003).** Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**, 35857-35860.
- Segura-Morales, C., Pescia, C., Chatellard-Cause, C., Sadoul, R., Bertrand, E. & Basyuk, E. (2005).** Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol Chem* **280**, 27004-27012.

- Shearwin-Whyatt, L., Dalton, H. E., Foot, N. & Kumar, S. (2006).** Regulation of functional diversity within the Nedd4 family by accessory and adaptor proteins. *Bioessays* **28**, 617-628.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. & Gottlinger, H. G. (2003).** AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**, 689-699.
- Summers, J. & Mason, W. S. (1982).** Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**, 403-415.
- Szymkiewicz, I., Shupliakov, O. & Dikic, I. (2004).** Cargo- and compartment-selective endocytic scaffold proteins. *Biochem J* **383**, 1-11.
- Takatsu, H., Sakurai, M., Shin, H. W., Murakami, K. & Nakayama, K. (1998).** Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. *J Biol Chem* **273**, 24693-24700.
- Thome, N. (2007).** Virus/Wirt-Interaktionen bei Hepatitis-B-Virus Infektionen: Die Rolle von 2-Adaptin. *Dissertation, Universität Mainz*.
- Tiollais, P., Pourcel, C. & Dejean, A. (1985).** The hepatitis B virus. *Nature* **317**, 489-495.
- Traub, L. M. (2005).** Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 415-437.
- Treier, M., Staszewski, L. M. & Bohmann, D. (1994).** Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**, 787-798.
- Urban, S. & Gripon, P. (2002).** Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. *J Virol* **76**, 1986-1990.
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S. & Raposo, G. (2006).** Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* **140**, 13-21.
- von Zastrow, M. & Sorkin, A. (2007).** Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 436-445.
- Welsch, S., Muller, B. & Krausslich, H.-G. (2007).** More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett* **581**, 2089-2097.
- White, I. J., Bailey, L. M., Aghakhani, M. R., Moss, S. E. & Futter, C. E. (2006).** EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J* **25**, 1-12.
- Williams, R. L. & Urbe, S. (2007).** The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 355-368.
- Woelk, T., Oldrini, B., Maspero, E., Confalonieri, S., Cavallaro, E., Di Fiore, P. P. & Polo, S. (2006).** Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat Cell Biol* **8**, 1246-1254.
- Zhadina, M., McClure, M. O., Johnson, M. C. & Bieniasz, P. D. (2007).** Ubiquitin-dependent virus particle budding without viral protein ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20031-20036.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. & Schu, P. (1999).** Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* **274**, 5385-5390.

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1-1</b>	Schematischer Aufbau von HBV.	4
<b>Abb. 1-1</b>	Die Organisation des HBV-Genoms.	5
<b>Abb. 1-3</b>	Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HBV.	7
<b>Abb. 1-4</b>	Die Transmembran-Topologie der HBV-Hüllproteine.	8
<b>Abb. 1-5</b>	Modell zur Sortierung von Transmembranproteinen in intraluminale Vesikel der MVBs.	13
<b>Abb. 4-1</b>	Schematische Darstellung des Ubiquitin-Interaktionsmotivs von $\gamma$ 2-Adaptin und den hergestellten UIM-Mutanten.	47
<b>Abb. 4-2</b>	$\gamma$ 2-Adaptin interagiert in UIM-abhängiger Weise mit Ubiquitin.	48
<b>Abb. 4-3</b>	Ubiquitinierung von $\gamma$ 2-Adaptin.	49
<b>Abb. 4-4</b>	Die Ubiquitinierung von $\gamma$ 2-Adaptin ist abhängig vom UIM.	50
<b>Abb. 4-5</b>	UIM-abhängige Interaktion von $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4.	51
<b>Abb. 4-6</b>	$\gamma$ 2-Adaptin interagiert über einen Bereich zwischen AS193 und AS528 mit Nedd4.	52
<b>Abb. 4-7</b>	Die katalytische Domäne von Nedd4 ist nicht an der Bindung an $\gamma$ 2-Adaptin beteiligt.	54
<b>Abb. 4-8</b>	Die C2-Domäne von Nedd4 vermittelt die Bindung an $\gamma$ 2-Adaptin.	55
<b>Abb. 4-9</b>	Kolokalisation von $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4.	56
<b>Abb. 4-10</b>	Die C2-Domäne von Nedd4 wird mit Ubiquitin modifiziert.	58
<b>Abb. 4-11</b>	Die Mutante C2 $\Delta$ K wird nicht mehr ubiquitiniert.	59
<b>Abb. 4-12</b>	Die Ubiquitinierung von C2 vermittelt die Interaktion mit $\gamma$ 2-Adaptin.	60
<b>Abb. 4-13</b>	Dominant-negatives Nedd4 verhindert die Ubiquitinierung von $\gamma$ 2-Adaptin.	61
<b>Abb. 4-14</b>	$\gamma$ 2-Adaptin wird durch Nedd4 ubiquitiniert.	62
<b>Abb. 4-15</b>	Charakterisierung der Membranassoziation von $\gamma$ 2-Adaptin.	64
<b>Abb. 4-16</b>	Immunfluoreszenzanalyse der zellulären Lokalisation von $\gamma$ 2-Adaptin.	67
<b>Abb. 4-17</b>	$\gamma$ 2-Adaptin beeinflusst die Morphologie von MVBs.	69
<b>Abb. 4-18</b>	Depletion von $\gamma$ 2-Adaptin verhindert den Abbau von endozytiertem EGF.	70
<b>Abb. 4-19</b>	Einfluß verschiedener siRNAs auf den Transport von EGF zu den MVBs.	72
<b>Abb. 4-20</b>	Schematische Darstellung des Clathrin-Bindemotivs sowie der generierten Mutanten und GST-Konstrukte.	73
<b>Abb. 4-21</b>	Untersuchungen zur Interaktion von $\gamma$ 2-Adaptin und Clathrin.	74
<b>Abb. 4-22</b>	Die Interaktion von $\gamma$ 2-Adaptin und L erfolgt unabhängig vom UIM.	76
<b>Abb. 4-23</b>	Analyse der Interaktion von $\gamma$ 2-Adaptin und Core.	77
<b>Abb. 4-24</b>	HBV-Core kolokalisiert mit MVB-Vesikeln in den Randbereichen der Zelle.	79
<b>Abb. 5-1</b>	Modell der Coupled Monoubiquitination.	83
<b>Abb. 5-2</b>	Modell zur Funktion von $\gamma$ 2-Adaptin bei der Entstehung intraluminale Vesikel an der MVB-Membran.	90
<b>Abb. 5-3</b>	Modell zur Funktion von $\gamma$ 2-Adaptin bei der Morphogenese von HBV.	91

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arf	<i>ADP ribosylation factor</i>
AS	Aminosäure
BFA	Brefeldin A
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	Beziehungsweise
ccc	<i>covalently closed circular</i> , kovalent geschlossen zirkulär
CHAPS	3- [(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -I-Propansulfonsäure
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
DMP	Dimethyl Pimelimidate Dihydrochloride
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOC	Desoxycholsäure
ds	doppelsträngig
ECL	Enhanced Chemiluminiscense
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESCRT <i>et al.</i>	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i> und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
FLAG	synthetisches Epitop
g	Gramm
GST	Glutathione-S-transferase
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	Hämagglutinin
HBV	Hepatiti-B-Virus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Hsp / Hsc	Hitzeschock-Protein
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LBPA	<i>Lysobisphosphatic acid</i>
M	Molar
min	<i>minute</i> , Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MVB	<i>multivesicular body</i> , Multivesikuläre Endosomen
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleimid
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
NP-40	Nonidet-40
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pg	prägenomisch
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	<i>second</i> , Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris-HCl-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloresigsäure
TEMED	<i>N, N, N, N'</i> ,-Tetrametylendiamid
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Ub	Ubiquitin
UIM	Ubiquitin-Interaktionsmotiv
WB	Western-Blot
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

---



## Publikationen

### **Rost M., Döring T. und Prange R. (2008)**

$\gamma$ 2-Adaptin, a Ubiquitin-interacting Adaptor, Is a Substrate to Coupled Ubiquitination by the Ubiquitin Ligase Nedd4 and Functions in the Endosomal Pathway.

*Journal of Biological Chemistry, in press [Epub ahead of print]*

### **Rost M., Mann S., Lambert C., Döring T., Thomé N. und Prange R. (2006)**

$\gamma$ 2-Adaptin, a Novel Ubiquitin-interacting Adaptor, and Nedd4 Ubiquitin Ligase Control Hepatitis B Virus Maturation.

*Journal of Biological Chemistry, Volume 281, Number 39*

## Kongressbeiträge

### **Vorträge:**

Rost M., Lambert C., Döring T., Prange R. (2007)

Role of the cellular ESCRT machinery in hepatitis B virus assembly.

*Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Rome, Italy*

Rost M., Lambert C., Döring T., Prange R. (2007)

Host factors involved in hepatitis B virus maturation

*3<sup>rd</sup> European Congress of Virology, Nürnberg, Germany*

Rost M., Mann S., Lambert C., Döring T., Thome N., Prange R. (2006)

$\gamma$ 2-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation.

*Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Vancouver, Canada*

Rost M., Mann S., Lambert C., Döring T., Thome N., Prange R. (2005)

Functional involvement of  $\gamma$ 2-adaptin in HBV assembly and budding.

*Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Heidelberg, Germany*

### **Poster:**

Rost M., Döring T., Prange R. (2008)

$\gamma$ 2-Adaptin, a Ubiquitin-interacting Adaptor, Is a Substrate to Coupled Ubiquitination by the Ubiquitin Ligase Nedd4 and Functions in the Endosomal Pathway

*7<sup>th</sup> Annual ELSO Meeting, Nice, France*

Rost M., Döring T., Prange R. (2008)

$\gamma$ 2-Adaptin, a Ubiquitin-interacting Adaptor, Is a Substrate to Coupled Ubiquitination by the Ubiquitin Ligase Nedd4 and Functions in the Endosomal Pathway

*7<sup>th</sup> GfV-Workshop "Cell Biology of Virus Infections", Deidesheim, Germany*

---