

**Die Rolle Prolin-reicher
Sequenzmotive des Core-Proteins in
der Morphogenese des
Hepatitis-B Virus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sylvia Mann

geb. am 23.02.1977 in Mainz

Mainz, 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Abteilung Molekulare Genetik angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2007

In Gedenken an meinen Vater

Danksagung

Publikation

Rost M., Mann S., Lambert C., Döring T., Thome' N., Prange R. 2006.
 γ 2-Adaptin, a Novel Ubiquitin-interacting Adaptor, and Nedd4 Ubiquitin
Ligase Control Hepatitis B Virus Maturation. J. Biol. Chem. 281:
39,29297–29308. 2006

1. Einleitung	1
1.1 Aufbau des Hepatitis-B Virus	4
1.2 Das Hepatitis-B Virus-Genom	7
1.3 Replikation und Infektionszyklus des Hepatitis-B Virus	10
1.4 Das HBV-Kapsid	15
1.5 Der Ausschleusungsmechanismus	20
1.6 Zielsetzung	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Laborgeräte.....	28
2.1.2 Reagenzien/ Kits.....	29
2.1.3 Puffer und Lösungen	29
2.1.4 Medien.....	31
2.1.5 Enzyme	31
2.1.6 Molekulargewichtsmarker.....	32
2.1.7 Zelllinien.....	32
2.1.8 Antikörper.....	33
2.1.9 Vektoren und Oligonukleotide für die Mutagenese	34
2.3 Methoden	38
2.3.1 Mutagenese.....	38
2.3.2 Kultivierung von Huh7-Zellen	39
2.3.3 Überprüfung der Transfektions-Effizienz mittels HBsAg-ELISA.....	40
2.3.4 Immunfluoreszenz	41
2.3.5 Nachweis des Hepatitis-B Virus-Kapsids	42
2.3.6 Nachweis von Nukleokapsiden und Virionen des Hepatitis-B Virus	42
2.3.7 Interaktions-Assay.....	44
2.3.8 Membran-Flotations Assay	45
3. Ergebnisse	46
3.1 Transkomplementations-Assay	47
3.1 Untersuchungen des PPAY-Motivs von HBV-Core	49
3.1.2 Die Kapsid-Bildungsfähigkeit der PPAY-Mutanten.....	52
3.1.3 Die Rolle des PPAY-Motivs bei der Nukleokapsid- und Virus-Bildung	54
3.1.4 Die Beteiligung des PPAY-Motivs an der Interaktion mit Nedd4	56
3.2 Die Rolle des PPNAP-Motivs	59
3.2.2 Die Fähigkeit der PPNAP-Mutanten zur Kapsid-Bildung	61
3.2.3 Die Rolle des PPNAP-Motivs in der Nukleokapsid- und Virus-Bildung	62
3.2.4 Der Einfluss des PPNAP-Motivs auf Tsg101-Interaktion	64
3.3 Die Bedeutung der Lysine 7 und 96	66
3.3.1 Das Expressions-Niveau der Lysin-Mutanten	68
3.3.2 Die Kapsid-Bildung der Lysin-Mutanten.....	68
3.3.3 Auswirkungen der Lysin-Mutanten auf die Nukleokapsid- und Virus-Bildung.....	69
3.4 Zusammenfassung der wichtigsten Mutanten	71
3.4 Die Lokalisation des Kapsid-Proteins in der Leberzelle	73
4. Diskussion	78
5. Zusammenfassung	94
6. Literaturverzeichnis	96
7. Abkürzungsverzeichnis	118

1. Einleitung

Das humane Hepatitis-B Virus (HBV) ist der Hauptvertreter der Hepadnaviren und Verursacher der gleichnamigen Infektion. Weltweit sind etwa 300 bis 420 Millionen Menschen Träger von HBV, was das Gefahrenpotential dieses Virus verdeutlicht. HBV wurde 1970 erstmals von Dane et al. beschrieben (Dane et al., 1970). In der Familie der Hepadnaviridae unterscheidet man Säuger-infizierende Orthohepadnaviren (Summers et al., 1978) und Vögel-infizierende Avihepadnaviren (Mason et al., 1980; Sprengel et al., 1988).

Die Übertragung von HBV erfolgt parenteral über Blut und Blutprodukte, durch Sexualkontakt und von der Mutter auf das ungeborene Kind (Hoofnagle, 1981; Ganem, 1982). HBV weist eine sehr hohe Infektiosität auf, verglichen mit der Infektiosität des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) ist die von HBV um etwa das 100fache erhöht. Es sind schon geringste Mengen infektiösen Materials für eine Infektion ausreichend, denn man kann bis zu 10^{11} Virionen pro Milliliter Blut bei HBV-Trägern detektieren, wobei es dem Virus möglich ist, etwa eine Woche außerhalb des Organismus zu überleben. Körpersekrete wie Speichel und Sperma sind jedoch weit weniger infektiös (Nassal, 1999; Ribeiro et al., 2002; Hollinger, 1991). Aufgrund dieser Begebenheiten gilt die Hepatitis-B Infektion als eine der wichtigsten Infektionskrankheiten des Menschen. Nach WHO-Schätzungen haben 2 Milliarden Menschen eine HBV-Infektion erlitten. Während es bei 90-95 % der Patienten nach 3-4 Monaten zu einer völligen Ausheilung der Hepatitis kommt, geht bei etwa 5-10 % der Fälle die HBV-Infektion in eine chronische Verlaufsform über. Das Risiko der HBV-Chronifizierung ist altersabhängig, so entwickeln infizierte Neugeborene zu etwa 95 % eine chronische Hepatitis. Bei 1-5-jährigen Kindern halbiert sich der Prozentsatz und ab etwa dem 12. Lebensjahr entspricht der Chronifizierungsgrad dem bei Erwachsenen beobachteten Wert von 5-10 %.

Wie oben erwähnt, besteht bei etwa 300 - 420 Millionen Menschen eine chronische Hepatitis, an deren Spätfolgen jährlich 250.000 Infizierte

sterben (Hollinger, 1996; Blumberg, 1997; WHO, 2002), da ein deutlich erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Leberzirrhose und zur Entwicklung eines primären hepatozellulären Karzinoms (HCC) besteht. Die chronische Hepatitis B unterscheidet sich von der akuten HBV-Infektion durch signifikante Unterschiede in der Immunantwort. Da HBV selbst nicht zytotoxisch für die infizierten Leberzellen ist, beruht die Zytotoxizität hauptsächlich auf der Immunantwort des Wirtsorganismus, welche gegen die viralen Antigene und die infizierten Zellen gerichtet ist (Chisari, 1997). Das wirtseigene Immunsystem nutzt sowohl den humoralen, als auch den zellulären Weg, um die Infektion zu kontrollieren. So richtet sich die Immunantwort bei einer akuten Hepatitis polyklonal gegen alle viralen Proteine, mit Ausnahme des HbxAg, und es kommt zur völligen Genesung des Patienten. Hier sind vor allem HBV-spezifische T-Lymphozyten an der Kontrolle der Infektion beteiligt. Einerseits sind sie in der Lage, virusinfizierte Zellen zu erkennen und durch direkte Wechselwirkung abzutöten, andererseits sezernieren sie antivirale Zytokine, welche die virale Genexpression in diesen Zellen unterdrücken, ohne sie weiter zu schädigen (Chisari, 1997). Demgegenüber steht die Immunantwort bei chronischen Virusträgern, die sehr viel schwächer ausfällt und nur gegen einzelne Proteine gerichtet ist, so dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer chronischen Verlaufsform der Infektion und einer Störung der zellulären Immunabwehr vermutet wird. Dadurch erklärt sich auch die hohe Chronifizierungsrate bei Neugeborenen, bei welchen die neonatale Immuntoleranz gegenüber viralen Antigenen zu einer Persistenz des Virus und somit meist zu einer Chronifizierung der Infektion führt (Chisari et al., 1997).

So ist die Hepatitis-B nach AIDS die häufigste tödliche Infektionskrankheit und zählt zu den zehn häufigsten Todesursachen. Das Virus ist global anzutreffen, jedoch bestehen länderabhängige Unterschiede in der Prävalenz. Die geschätzte jährliche Inzidenz in Europa beträgt etwa 1 Million (Hoofnagle, 1981; Thefeld et al., 1994; Hollinger, 1996). Nach WHO-Einschätzungen kann die Welt in drei Zonen eingeteilt werden: in Zonen mit hoher ($> 8\%$), mittlerer ($2-8\%$) und niedriger ($< 2\%$) Prävalenz chronischer HBV-Träger. Wie Abb.1 zeigt, sind große Teile der

Bevölkerung, unter anderem in Süd-Ost-Asien, Zentralasien, dem Pazifischen Becken, dem südlichen Afrika, dem Amazonas-Becken und in Teilen des mittleren Ostens chronisch infiziert. 70-90 % der Bevölkerung in diesen Ländern infizieren sich vor ihrem 40. Lebensjahr mit HBV, und 8-20 % der Bevölkerung sind Träger von HBV. In Ländern mit niedriger Prävalenz, wie Nord-Amerika, Australien und West-Europa, sind weniger als 2 % der Bevölkerung chronisch infiziert.

Das Hauptproblem der HBV-Infektion besteht in dem Fehlen einer effizienten Therapieform zur Behandlung der Erkrankung. Zugelassene Therapeutika für eine chronische HBV-Infektion sind derzeit Interferon- α , seit kurzem auch das Nukleosidanalogen Lamivudin, sowie das Nukleotidanalogen Adefovir (Weizsäcker, 2005). Obwohl seit 1984 ein Impfstoff zur Verfügung steht, ist dieser aus finanziellen und logistischen Gründen für eine Massenimpfung in allen betroffenen Gebieten nur unzureichend nutzbar (WHO, 2002). Dieses Vakzin ist ein gentechnisch in Hefen hergestelltes HBV-Protein, das HBsAg, mittels welchem sich bei 97 % der geimpften Personen durch Anti-HBs-Antikörper-Bildung ein sicherer Schutz einstellt (McAleer et al., 1984).

Neben dem Hepatitis-B Virus gibt es noch weitere Virushepatitiden-auslösende Arten. Diese sind alphabetisch von A bis E klassifiziert und verursachen, ähnlich wie HBV, Entzündung und Schädigung der Leber. Aufgrund ihres milden Verlaufs und erfolgreicher Prävention sind Infektionen mit Hepatitis-A und -E weitgehend beherrschbar. Die chronisch verlaufenden Hepatitiden des Typs B, C oder D haben hingegen größere medizinische Bedeutung, da sie dazu führen, dass es aufgrund der Persistenz der Erreger zu kontinuierlichen Leberschädigungen kommt, die die Entwicklung von Leberzirrhose und Leberzellkarzinomen begünstigen (Übersicht in Gerken, 1996; WHO, 2002). So ist das HCC-Risiko für Langzeit-HBV-Träger um den Faktor 200 gegenüber Nichtinfizierten erhöht (Beasley et al., 1981; Beasley, 1988; WHO, 2002).

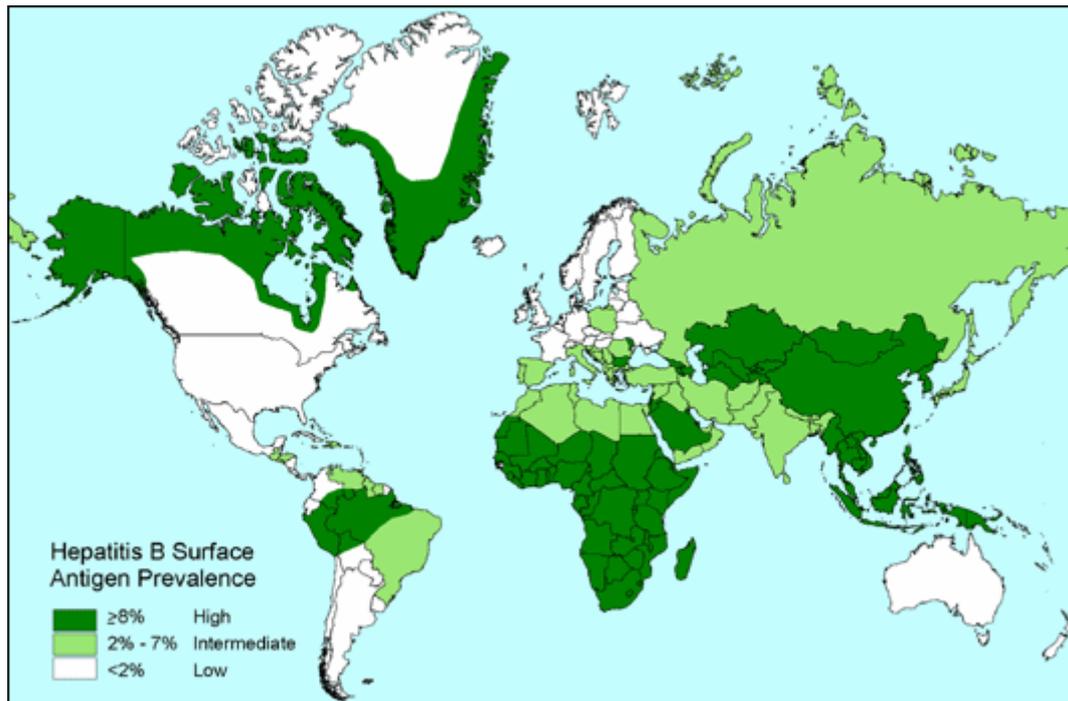


Abb. 1: Die geographische Ausbreitung der HBV-Prävalenz

Hier dargestellt ist die weltweite Verbreitung von chronisch HBV-infizierten Menschen und basiert auf dem Nachweis des HBs-Antigens im Serum der Untersuchten. (Centers for Disease Control and Prevention, 2005).

1.1 Aufbau des Hepatitis-B Virus

Das infektiöse Viruspartikel ist von sphärischer Gestalt und hat einen Durchmesser von 42 nm. Es wird nach seinem Entdecker auch als Dane-Partikel bezeichnet. Das Virion besteht aus einer äußeren Lipoproteinmembran, in die drei virale Hüllproteine eingelagert sind: das kleine S- (small), das mittlere M- (middle) und das große L-(large) Protein. Die HBV-Hüllproteine stimmen aufgrund ihres gemeinsamen Stopp-Codons im C-Terminus überein, so dass C-terminal bei allen drei Hüllproteinen die Sequenz des S-Proteins mit 226 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 24 kDa zu finden ist. Das M-Protein (30 kDa) ist N-terminal um 55 Aminosäuren verlängert, wobei diese Domäne als PreS2

bezeichnet wird. Das L-Protein besitzt gegenüber M eine zusätzliche N-terminale Domäne von 108 (beziehungsweise 119, da genotyp-spezifisch) Aminosäuren, die als PreS1-Region bezeichnet wird. PreS1 und PreS2 werden als PreS-Region des L-Proteins (39kDa) zusammengefasst (Heermann et al., 1984). Die Hüllproteine können in glykosylierter (am Asparagin-146 der S-Region) und unglykosylierter Form auftreten. Das M-Protein ist zusätzlich am Asparagin-4 der PreS2-Region N-glykosyliert (Heermann et al., 1984), so dass sich bei den glykosylierten Formen das Molekulargewicht um etwa 3 kDa pro Glykan-Einheit erhöht. Eine zusätzliche charakteristische Modifikation des L-Proteins ist die Anlagerung einer N-terminalen Myristinsäure (Persing et al., 1987).

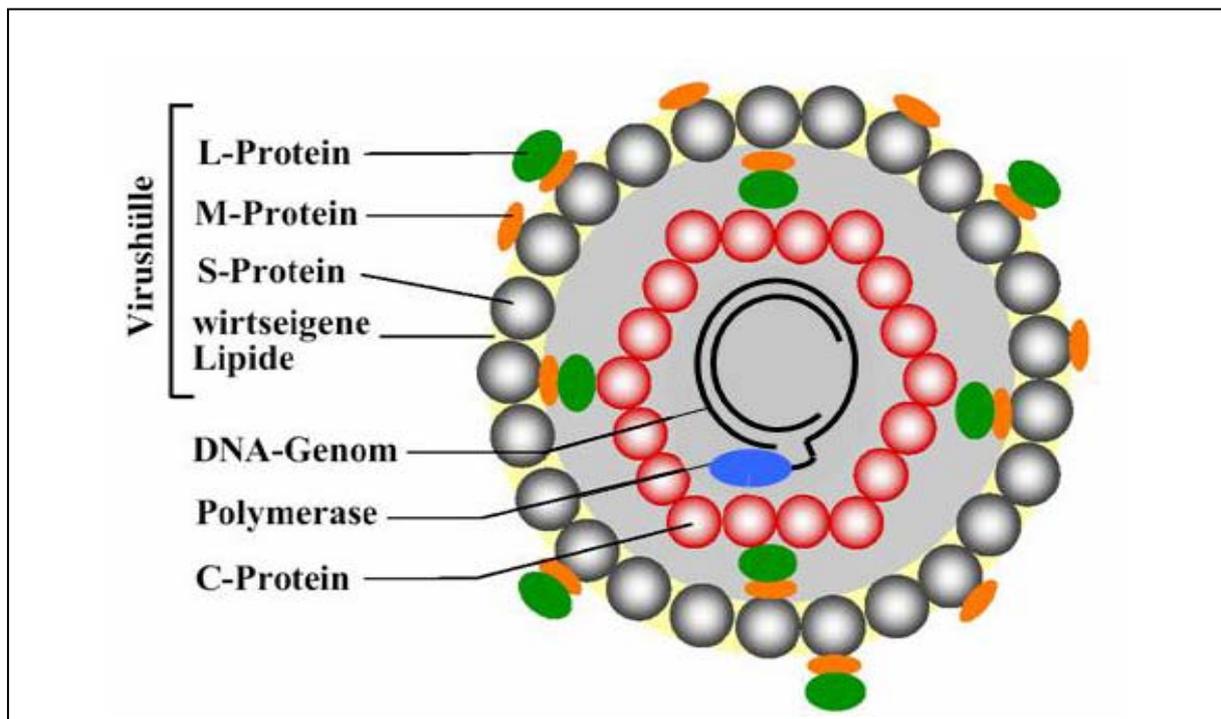


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Hepatitis-B Virus

Die Virushülle setzt sich aus zellulären Lipiden, dem S-, dem M- und dem L-Protein zusammen. Die S-Polypeptidsequenz (grau) findet sich in M und L wieder. M beinhaltet PreS2 (orange) und L zusätzlich PreS1 (grün) und PreS2, wobei PreS1 und PreS2 zusammen als PreS-Domäne bezeichnet werden, die sowohl im Inneren als auch auf der Außenseite des Virus lokalisiert ist. Das Kapsid wird durch das C-Protein (rot) aufgebaut und umschließt das partiell-doppelsträngige, zirkuläre DNA-Genom. Die virale Polymerase (blau) bindet kovalent an das 5'-Ende des vollständigen DNA-Minusstrangs. Abbildung modifiziert nach Nassal (1999) und Lambert (2001).

Die Hüllproteine werden an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert (Eble et al., 1986; Eble et al., 1990) und kotranslational mit Hilfe hydrophober Transmembran-Domänen (TM-Domänen) innerhalb der S-Protein-Sequenz in der ER-Membran verankert. Die N- und C-Termini des S- und M-Proteins weisen direkt nach der Translation in das ER-Lumen, wohingegen der N-Terminus des L-Proteins zytosolisch ausgerichtet ist. Erst nach Vollendung der Translation (posttranslational) wird bei etwa der Hälfte der L-Moleküle der N-Terminus in das ER-Lumen transloziert, so dass das L-Protein eine duale Topologie einnimmt; dieser für das L-Protein charakteristische Vorgang wird als posttranslationale Translokation bezeichnet (Lambert und Prange, 2001).

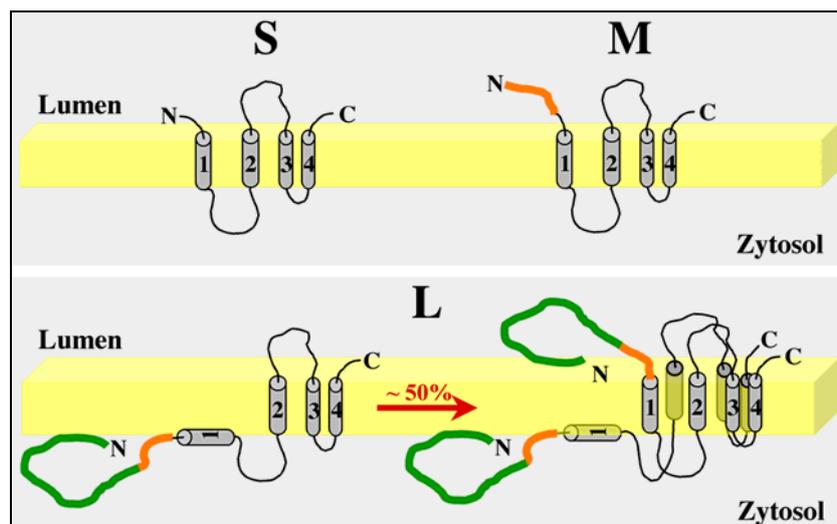


Abb. 3: Die transmembrane Topologie der HBV-Hüllproteine in der ER-Membran

Der obere Teil der Abbildung zeigt Modelle der S- und M-Protein-Topologie. Die Proteine werden durch die vier Transmembrandomänen der S-Region in der Membran verankert. N- und C-Termini weisen in das ER-Lumen, wobei der N-Terminus des M-Proteins (PreS2 = orange) kotranslational in das Lumen transloziert wird.

Der untere Teil der Abbildung zeigt ein L-Protein-Modell. L wird ebenfalls durch die Transmembrandomänen der S-Region in der Membran verankert. Nach der Synthese ist seine PreS-Region (PreS1 = grün + PreS2 = orange) zunächst zytosolisch orientiert. In einem Reifungsprozess wird dann posttranslational die PreS-Region von etwa der Hälfte der L-Protein-Moleküle in das ER-Lumen transloziert. So besitzt das L-Protein im reifen Zustand eine duale Topologie. (Lambert, 2001).

Die HBV-Hüllmembran umschließt ein ikosaedrisches Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 22 - 25 nm. Das Nukleokapsid ist ein Homooligomer des Core-Proteins (C-Protein, Kapsid-Protein), einem 183 Aminosäuren großen Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Seine Bildung und Funktion wird in Kapitel 1.4 beschrieben. Innerhalb des Kapsids befindet sich das DNA-Genom des Hepatitis-B Virus, sowie die assoziierte virale Polymerase (Kaplan et al., 1973). Neben den viralen Komponenten findet sich im Inneren des Kapsids vermutlich eine zelluläre Proteinkinase C, die der Phosphorylierung des Core-Proteins dient (Schlicht und Schaller, 1998).

1.2 Das Hepatitis-B Virus-Genom

Das Genom der HBV-Partikel besteht aus einer nur teilweise doppelsträngigen, offen-ringförmigen DNA (rcDNA) (Robinson, 1977). Es setzt sich aus einem vollständigen Minusstrang (-Strang) und einem unvollständigen Plusstrang (+Strang) zusammen. Nur der Negativstrang wird im Replikationsverlauf in mRNA transkribiert. Er besteht je nach HBV-Subtyp aus 3100-3300 bp und enthält am Ende die kovalent-gebundene virale Polymerase. Diese beinhaltet verschiedene funktionelle Domänen: ein terminales Protein, eine reverse Transkriptase (RT), eine Spacer Region (SP) und eine C-terminale Ribonuklease H (RNaseH) (Toh et al., 1983; Bartenschlager und Schaller, 1988; Radziwill et al., 1990). Der Plusstrang, der etwa 1700-2800 bp umfasst, codiert nicht für virale Genprodukte und wird nicht transkribiert. Im Bereich des 5'-Endes beider Ketten findet sich je eine Sequenzwiederholung (DR = direct repeat) von 11 Nukleotiden, welche an der DNA-Replikation beteiligt ist (Will et al., 1987). Das Genom enthält insgesamt 4 offene Leseraster (ORF). Sie können in verschiedenen, teils überlappenden Leserastern transkribiert werden. Es handelt sich um die Leseraster für die drei Hüllproteine, die envelope-ORFs (env-ORF) für die S-, M- und L-Proteine, sowie für das

Kapsid-Protein (ORF-C), die Polymerase (P-ORF) und das X-Protein (X-ORF). Dem bisher noch nicht erwähnten X-Protein konnte bislang keine eindeutige Aufgabe zugeordnet werden; *In vitro*-Versuche bestätigten eine Funktion als Transkriptionsaktivator (Rossner, 1992; Kekule et al., 1993), jedoch ist seine Expression für die Virusproduktion in Zellkultur nicht essentiell (Blum et al., 1992).

Viele regulierende Elemente steuern die transkriptionelle Aktivität der HBV-Gene. Jedem Gen ist wenigstens ein Promotor vorgeschaltet, der durch Enhancer-Elemente beeinflusst wird (Shaul et al., 1985; Yee, 1989; Yuh und Ting, 1990). Leberspezifische Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise HNF-1 oder HNF-4 (HNF = hepatocyte nuclear factor) regulieren die Promotor- und Enhancer-Elemente (Courtois et al., 1988; Lopez-Cabrera et al., 1990; Schaller und Fischer, 1991). Weiterhin vermittelt ein glukokortikoidabhängiges Element (GRE = glucocorticoid-responsive element) bei ansteigendem Glukokortikoid-Spiegel eine Steigerung der Promotor-Aktivität über das Enhancer-Element I (Tur-Kaspa et al., 1986). Ein negativ-regulierendes Element ist dem Enhancer II vorgeschaltet. Wie diese Regulatoren im Einzelnen zusammen wirken, ist bisher nur unzureichend bekannt.

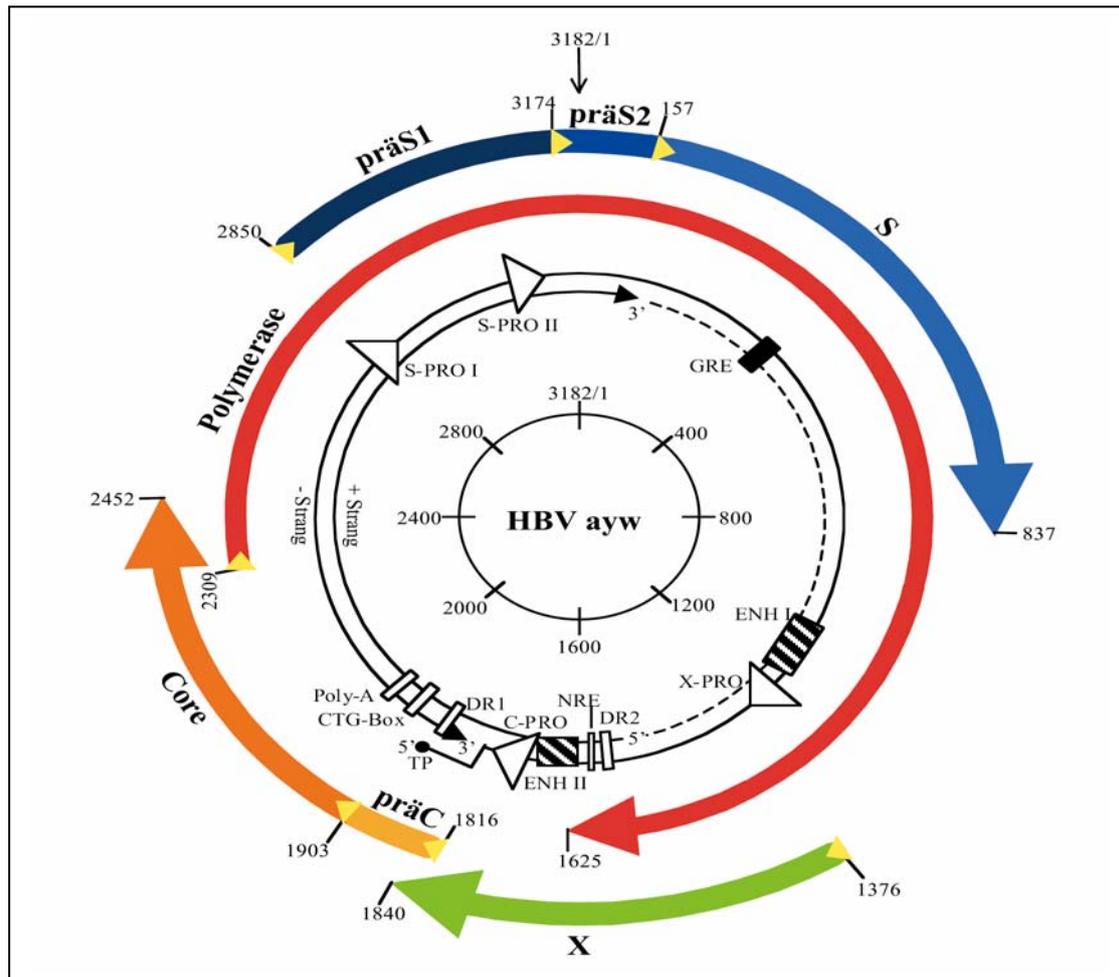


Abb. 5: Die Organisation des HBV-Genoms

Das HBV-Genom ist ein partiell-doppelsträngiges DNA-Genom (Innenkreis). Es besteht aus einem vollständigen Minusstrang (durchgezogene Linie) und einem unvollständigen Plusstrang (gestrichelte Linie). Die Dreiecke markieren Promotor-Elemente (PRO) und die Vierecke stehen für Enhancer-Elemente (ENH). Im Zentrum ist eine Nukleotid-Skala des HBV-Genoms (Subtyp ayw) dargestellt, wobei als Startpunkt der Nummerierung eine singuläre EcoRI-Schnittstelle steht. Außen sind die vier offenen Leserahmen dargestellt (blau = Hüllproteine, rot = Polymerase, orange = C- und PreC-Proteine, grün = X-Protein). Die gelben Pfeile zeigen Translationsstartstellen. Weitere Abkürzungen: DR = Sequenzwiederholung (direct repeat), GRE = glucocorticoid response element, NRE = negativ-regulierendes Element, Poly-A = Polyadenylierungssignal, CTG-Box = Verpackungssignal, TP = Terminales Protein (Lambert, 2001).

1.3 Replikation und Infektionszyklus des Hepatitis-B Virus

HBV ist ein gewebsspezifisches Virus und repliziert in Hepatozyten. Die frühe Phase der Virus-Infektion, bei der das Virus in die Zelle gelangt, kann in drei Schritte unterteilt werden: Anheftung, Fusion und Eindringen. Ausschlaggebend für die Anheftung von HBV an die Leberzelle ist die PreS1-Domäne des L-Hüllproteins und dort von besonderer Bedeutung das QLDPAF-Motiv (Paran et al., 2001; Neurath et al., 1986; Pontisso et al., 1989; Petit et al., 1991; Dash et al., 1992; Engelke et al., 2006). Allerdings ist dieses Motiv nicht das einzige Signal zur Anheftung, denn Mutationsanalysen zeigten, dass die Anheftung von HBV bei Anwesenheit aller drei Hüllproteine stark gesteigert werden kann, was auf das Vorhandensein multipler Anheftungs-Motive hindeutet (Lu und Block, 2004; Cooper et al., 2003). Was den zugehörigen Rezeptor betrifft, konnte für das Enten-Hepatitis-B Virus (DHBV) ein Glykoprotein von 180 kDa (gp180) beschrieben werden (Kuroki et al., 1995), welches als Enten Carboxy-Peptidase D (DCPD) charakterisiert wurde (Li et al., 1996; Tong und Wards, 1999). Die Identifikation des Rezeptors für das humane HBV war weniger erfolgreich (Lu und Block, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass die Bindung von HBV an Hepatozyten primär über die PreS1-Domäne erfolgt, konnten Falco et al. in HepG2-Zellen, einer humanen Leberzelllinie, ein Membranprotein mit der Bezeichnung Hep-BP identifizieren, dessen Rolle als HBV-Rezeptor diskutiert wird (Falco et al., 2001; Lu und Block, 2004). Da es an effizienten *in-vivo*-Infektionssystemen für HBV mangelt, wurden die sich an die Anheftung anschließenden Schritte im viralen Replikationszyklus vornehmlich an DHBV untersucht.

Der spezifischen Anheftung von HBV an die Leberzelle folgt die Fusion der Virusproteine mit der Plasmamembran. Sie ist von einer speziellen Sequenz innerhalb der viralen Hüllproteine abhängig, dem so genannten Fusions-Motiv, das sich aus mehreren hydrophoben Aminosäuren zusammensetzt (Gerlich et al., 1993; Hughson, 1995). Das Fusions-Motiv ist rezeptorunabhängig, wenig zellspezifisch und scheint im N-terminalen

Bereich des S-Proteins zu liegen (Gerlich et al., 1993). Anschließend kommt es zur Internalisierung und Aufnahme des viralen Genoms in den Zellkern. Über den Weg des Nukleokapsids in der Zelle und den Transport des viralen Genoms in den Kern ist noch wenig bekannt (Cooper et al., 2003), jedoch scheint das Virus über eine zelluläre Kerntransport-Maschinerie in den Kern transportiert zu werden (Whittacker et al., 2000; Whittacker und Helenius, 1998). Hierbei ist eine Beteiligung des Core-Proteins möglich, denn es besitzt zwei C-terminale Kernlokalisations-Signale (NLS) (Yeh et al., 1990; Eckhardt et al., 1991), die eine Rolle bei der Interaktion mit der Kernpore und bei der Freisetzung des viralen Genoms spielen (Cooper et al., 2003). Nach Transport des Genoms in den Kern wird der unvollständige DNA-Plusstrang durch zelleigene Enzyme vervollständigt und die Minusstrang-Lücke geschlossen (Kock und Schlicht, 1993). Es entsteht ein kovalent-geschlossenes, ringförmiges DNA-Molekül (cccDNA = covalently closed circular DNA). In infizierten Zellen finden sich jeweils bis zu 50 Kopien dieser cccDNA im Kern. Die cccDNA dient als Matrize zur Transkription der viralen RNA-Moleküle durch die wirtseigene RNA-Polymerase II. Es werden vier mRNAs mit unterschiedlichen Initiationsstellen, aber gleichem 3'-Ende gebildet, so dass verschieden lange mRNAs entstehen, die durch zelluläre Enzyme modifiziert werden und so ein „cap“ am 5'-Ende und ein Polyadenylierungssignal am 3'-Ende erhalten. Eine der vier gebildeten RNAs dient nicht nur der Translation des P- und C-Proteins, sondern auch als pgRNA und somit der Synthese des späteren HBV-Genoms. An den weiteren RNAs erfolgt die Synthese der restlichen HBV-Proteine.

Als spezifisches Signal für die Verpackung der pgRNA im Zytoplasma, zusammen mit der viralen Polymerase in das entstehende Nukleokapsid, dient eine stabile Haarnadelschleife am 5'-Ende der pgRNA (ϵ -Signal) (Junker-Niepmann et al., 1990). Auch zelleigene Chaperone (Hsp90, Hsp70, p23) sind daran beteiligt (Hu und Seeger, 1996; Hu et al., 1997). Es kommt durch die Assoziation der Kapsid-Proteine mit dem Polymerase- ϵ -Komplex zu einer kompletten Umhüllung des Pregenoms, wobei Einzelheiten dieses Ablaufs noch unbekannt sind und teilweise im Kapitel über das Kapsid-Protein (1.4) erörtert werden.

Im Inneren des Nukleokapsids findet die reverse Transkription der pgRNA durch die virale Polymerase statt. Bei diesem Prozess spielen die Sequenzwiederholungen DR1 und DR2 eine wichtige Rolle (Wang und Seeger, 1992). Als Initiator dient eine Tyrosinseitenkette innerhalb der Polymerase (Weber et al., 1994; Zoulim und Seeger, 1994). Das kovalent-assoziierte DNA-Fragment wird gemeinsam mit der Polymerase zur 3'-Kopie von DR1 transloziert, und die Elongation des Minusstrangs wird bis zum Matrizenende fortgeführt. Der so entstandene Minusstrang besitzt eine terminale Redundanz von etwa acht Nukleotiden (r). Gleichzeitig wird die pgRNA durch die RNaseH-Aktivität der viralen Polymerase abgebaut. Nur ein Oligomer, bestehend aus r und DR1, bleibt zurück (Summers und Mason, 1982, Radzwill et al., 1990), wird transloziert und bindet an DR2. Dort wird die Plusstrang-Synthese initiiert und läuft dann bis zum 5'-Ende der Minusstrang-Matrize (Seegers et al., 1986). Der so entstandene Bereich des Plusstrangs lagert sich an den r-Bereich des Minusstrangs und bewirkt dadurch dessen Zirkularisierung. Die sich fortsetzende Elongation des Plusstrangs bricht vor Erreichen des Endes ab, wodurch die partielle Doppelsträngigkeit des HBV-Genoms zu erklären ist. Diese Reifung der Nukleokapside ist eine grundsätzliche Voraussetzung für die Virus-Bildung. Es wurde gezeigt, dass die unreifen, noch RNA-enthaltenden Nukleokapside vom Knospungs-Prozess ausgeschlossen werden. Es scheint, dass die virale DNA-Synthese mit einer Änderung innerhalb der Kapsid-Struktur einhergeht, dadurch die fertige DNA-Synthese signalisiert und so gewährleistet, dass nur reife Nukleokapside zur Umhüllung zugelassen werden (Summers and Mason, 1982). Diese Annahme wird durch Untersuchungen mit DHBV unterstützt. Dabei wurden innerhalb des Core-Gens verschiedene C-terminale Verkürzungen vorgenommen, mit der Auswirkung, dass die DNA-Synthese noch vor Erreichen der zirkulären partiell-doppelsträngigen DNA blockiert wird und es nicht mehr zur Umhüllung von Kapsiden kommt (Yu and Summers, 1991).

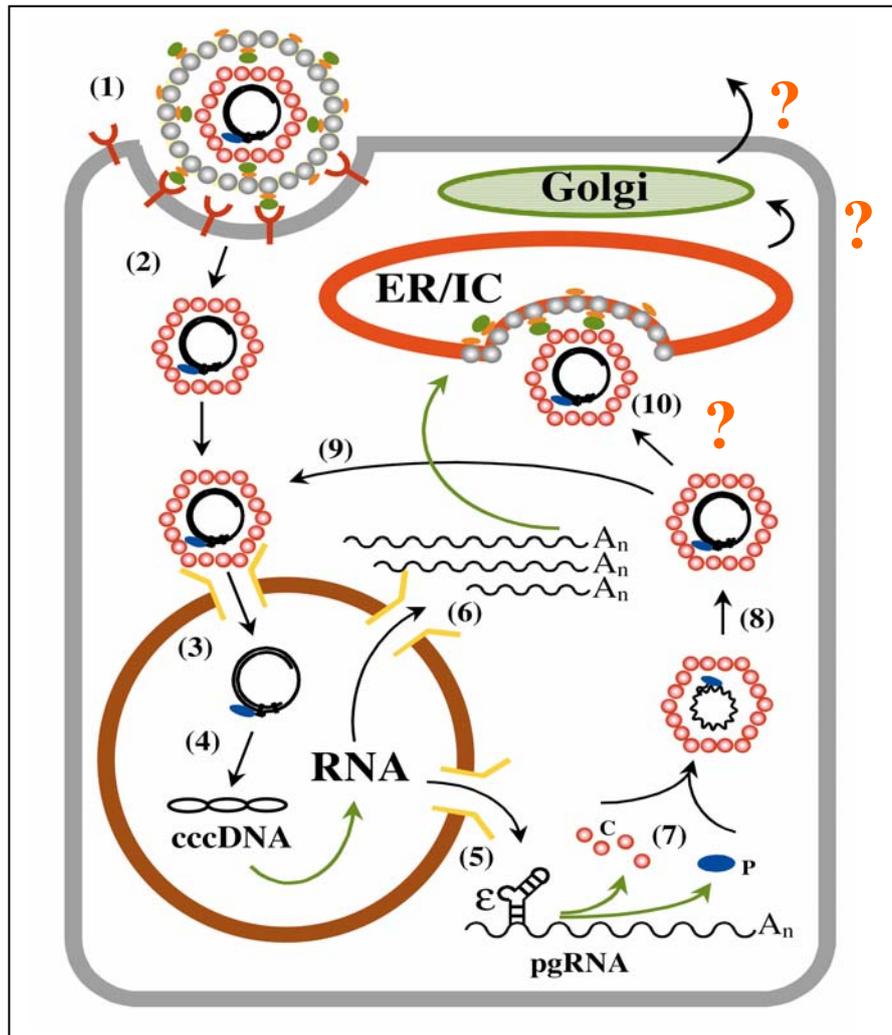


Abb. 6: Schematische Darstellung des Infektions- und Replikationszyklus von HBV

Das Virus bindet an einen Rezeptor auf der Hepatozyten-Zellmembran (1) und penetriert die Zielzelle (2). Das virale Kapsid wird frei, interagiert mit der Kernpore und entlässt die virale DNA in das Nucleoplasma (3). Hier wird der unvollständige Plusstrang durch zelluläre Enzyme komplettiert und die Minusstranglücke geschlossen (4). Ein kovalent geschlossenes DNA-Genom (cccDNA) entsteht. Die cccDNA dient als Matrize für die Synthese von mRNA-Molekülen, die in das Zytoplasma transportiert werden (5, 6). Die pregenomische RNA (pgRNA) dient als Schablone für die Translation des C- und P-Proteins (7). Das spezifische Verpackungssignal (ϵ) der pgRNA vermittelt die Umhüllung des Pregenoms. Innerhalb des Nucleokapsids erfolgt die reverse Transkription der pgRNA durch die virale Polymerase (8) und die Virus-DNA kann entweder nochmals in den Kern geschleust werden (9) oder von den Hüllproteinen verpackt werden (10). Die Viren verlassen die Zelle über den sekretorischen Weg. Schwarze Pfeile markieren Transportwege, grüne Pfeile stehen für Syntheseschritte. Die orangenen Fragezeichen symbolisieren den Ausschleusungsmechanismus, der wenig charakterisiert ist, und mit dem sich diese Arbeit beschäftigt (Lambert, 2001).

Diesen späten Schritten der HBV-Morphogenese und der Freisetzung des Virus soll die hier vorliegende Arbeit besondere Aufmerksamkeit widmen. Bisher geht man davon aus, dass das reife Nukleokapsid mit den zytosolisch gelegenen Teilen der Hüllproteine interagiert. Diese Hüllproteine, das S-, M- und L-Protein, werden bei ihrer Synthese in die ER-Membran integriert (Eble et al., 1987). Alle drei besitzen die Transmembran-Region von S, wobei sich M und L von S hinsichtlich ihres N-Terminus, der sogenannten PreS-Regionen, unterscheiden. Diese PreS-Regionen sind für die funktionellen Unterschiede der Hüllproteine verantwortlich. Es ist bekannt, dass der Zusammenbau von HBV entscheidend von dem L-Protein abhängig ist, während S hilfreich, aber nicht notwendig ist. Mutationsanalysen zeigten, dass für die Formation von Virionen zwei kurze Regionen innerhalb von L und S benötigt werden (Bruss und Ganem, 1991; Ueda et al. 1991; Bruss, 1997, Löffler-Mary et al., 2000). Außerdem scheint das L-Protein auch Interaktionen mit dem Kapsid einzugehen und wird so für die Virusmorphogenese essentiell. Mittels Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass eine C-terminale Sequenz innerhalb der PreS1-Region (AS 92-108) und ein N-terminaler Bereich in der PreS2-Region (AS 1-5) für die Kapsid-Verpackung notwendig ist (Bruss und Thomssen, 1994; Bruss und Vieluf, 1995; Bruss, 1997; Le Seyec et al., 1998). Die Funktion des M-Proteins ist noch unbekannt, da dieses Protein für die Virus-Bildung nicht essentiell ist (Bruss, 2004).

Für den Zusammenbau und die Freisetzung von HBV werden sowohl die Hüllproteine als auch Core benötigt. Da die Hüllproteine an intrazellulären Membranen detektierbar sind (Bruss, V., 2004), und nicht, wie bei vielen anderen umhüllten Viren, an der Plasmamembran (Huovila et al., 1992; Patzer et al., 1986; Eble et al., 1986; Simon et al., 1988), muss die Umhüllung der Nukleokapside zu Virionen im Zellinneren stattfinden. Auch dieser Frage soll im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen werden.

1.4 Das HBV-Kapsid

Der Leserahmen für das Core-Protein (ORF-C) besitzt zwei Initiationsstellen. Die erste codiert für das Prekapsid-Protein (Precore, HBeAg), welches N-terminal eine ER-Signalsequenz trägt, über die es in den Sekretionsweg der Zelle eingeschleust wird. Es wird dort an beiden Enden prozessiert und gelangt als HBeAg in das Serum (Ou et al., 1986; Garcia et al., 1988). Die zweite Startstelle des ORF-C codiert das Kapsid-Protein (Core-Protein, HBcAg), welches, verglichen mit dem Precore, N-terminal um 29 Aminosäuren verkürzt ist und ein Molekulargewicht von 21,5 kDa aufweist (Yeh et al., 1990). Das Kapsid von HBV besteht aus Monomeren des Core-Proteins, welches aus 183 Aminosäuren aufgebaut ist. Die Monomere lagern sich zu einer ikosaedrischen Form zusammen. Der Zusammenbau beginnt mit der Verbindung von zwei Core-Proteinen über den Cysteinrest 61, so dass ein Core-Homodimer entsteht (Zhou und Standring, 1992; Nassal et al., 1992; Zheng et al., 1992). Diese Homodimere lagern sich dann zu Kapsiden zusammen, wobei sie die virale pgRNA einschließen und dann als Nukleokapside bezeichnet werden. Es gibt zudem Kapside, die als leere Partikel *in vitro* von Leberzellen, auch in Abwesenheit aller anderen HBV-Proteine, sezerniert werden. Nukleokapside dagegen beinhalten immer das HBV-spezifische Genom. Die Kapside werden von schwachen Interaktionen zwischen den Dimeren zusammengehalten (Ceres und Zlotnick, 2002) und sie existieren in zwei verschiedene Formen: Kapside mit einer T=3 Symmetrie, die einen Durchmesser von 30 nm haben und sich aus 90 Core-Dimeren zusammensetzen, und Kapside aus 120 Dimeren mit einem Durchmesser von 34 nm und einer T=4 Symmetrie (Crowther et al., 1994). Beide Arten sind in infiziertem Lebergewebe detektierbar (Kenney et al., 1995).

Betrachtet man das monomere Core-Protein, zeigt sich, dass die N-terminalen 144 Aminosäuren vorwiegend hydrophob sind. Sie werden als Assemblierungsdomäne angesehen (Gallina et al., 1989; Birnbaum und Nassal, 1990), da es keine Auswirkung auf die Bildung von Kapsiden hat, wenn man Core C-terminal bis auf die Aminosäuren 1-149 verkürzt

(Zlotnik et al., 1997). Der basische C-Terminus ist hydrophil, argininreich und besitzt eine Nukleinsäure-Bindungsaktivität, denn mittels Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass bei Verkürzung des Proteins um die argininreiche Region die Zusammenlagerung der Kapside ohne die Verpackung des viralen Genoms erfolgte (Nassal, 1992; Melegari et al., 2005).

Die Struktur des HBV-Kapsids konnte hauptsächlich durch die Kryoelektronen-Mikroskopie von Crowther et al. (1994), sowie durch Kristallstruktur-Analysen von Wynne et al. (1999a, b) aufgeklärt werden. Böttcher et al. (1997) und Conway et al. (1997) war es gelungen, die Faltung des Core-Proteins genauer darzustellen: die Struktur des Core-Protein-Monomers wird dominiert von einer langen α -helikalen Haarnadelstruktur, die aus den Aminosäure-Resten 50 - 73 (Helix α 3) und 79 - 110 (Helix α 4) besteht, wobei durch Abknicken der Helix α 4 an Position 90 – 92 ein oberer (α 4a) und ein unterer Bereich (α 4b) entsteht. Auch die N-terminale Region des Core-Proteins wird in zwei helikale Bereiche α 1 (AS 13 – AS 27) sowie α 2 (AS 27 – AS 43), eingeteilt. Sie umschließt die Haarnadelstruktur, die im Dimer die Hälfte eines charakteristischen Spikes bildet, welche aus den Kapsiden herausragen. Die C-terminale Region besteht aus einer weiteren Helix α 5 (AS 112 – AS 127), der sich eine prolinreiche Schleife (AS 128 – AS 136) und ein erweiterter Strang (ab AS 137) anschließen (Wynne et al., 1999). Zur Dimerisierung bilden die beiden helikalen Haarnadelschleifen ein kompaktes 4-Helixbündel (Conway et al., 1997) und formen so den Spike auf der Oberfläche des Kapsids (Abb. 7).

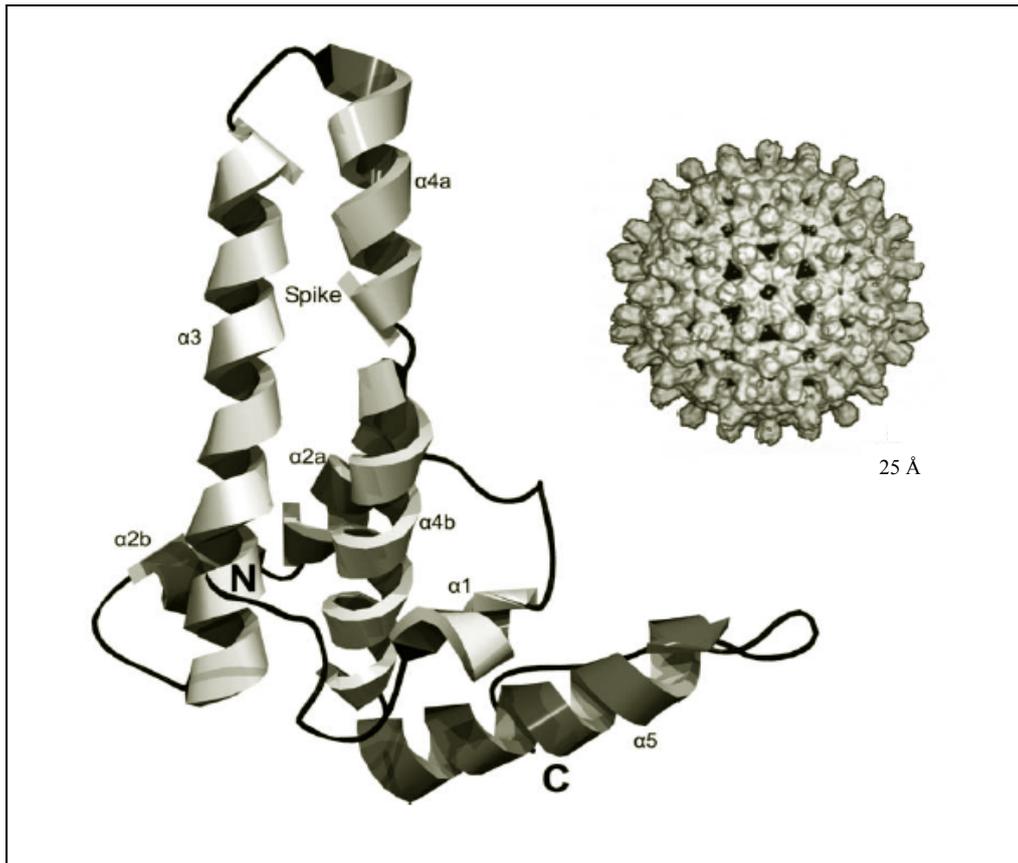


Abb. 7: Modell des Core-Proteins und Core-Partikels

Links: Core-Protein-Faltung als Monomer (Daten aus der Kristallstrukturanalyse von Wynne et al., 1999). Rechts: Kryoelektronenmikroskop-Bild eines Kapsids mit T = 4 Symmetrie, 9 Å Auflösung (Conway et al., 1997, modifiziert).

Interdimerkontakte der C-terminalen Domänen vermitteln die Kapsid-Formation vorwiegend unter Beteiligung der Seitenketten der Helix $\alpha 5$ und der prolinreichen Schleife. Durch Anlagerungen der C-Termini können 5-fach und 6-fach Symmetrien ausgebildet werden, und meist im Zentrum von 6-fach Symmetrien finden sich Poren mit einem Durchmesser von etwa 14 Å (Wynne et al., 1999), durch die kleine Moleküle, beispielsweise Desoxynukleotide, in das Kapsid-Lumen eindringen können. Der Zusammenbau der ikosaedrischen Kapside erfolgt um einen Polymerase-RNA-Komplex herum (Seeger et al., 2000), wobei die Umhüllung der pgRNA und die Initiation der DNA-Synthese durch eine Interaktion mit der Reversen Transkriptase vermittelt wird (Bartenschlager et al., 1990; Hirsch et al., 1990). Die Reverse Transkriptase reagiert mit dem

sogenannten ϵ -Packungssignal, das am 5'-Ende der pgRNA liegt (Beck and Nassal, 2003) und steuert dadurch die Umhüllung des viralen Genoms mit dem Kapsid-Protein. Auch zelluläre Faktoren, wie beispielsweise das Chaperone Hsp 90, das für die Aktivität der Reversen Transkriptase notwendig ist (Hu und Seeger, 1996), und einige phosphorylierbare Serinreste in der argininreichen Core-Region (Daub et al., 2002; Kann and Gerlich, 1994; Kau and Ting, 1998) spielen bei der Verpackung wichtige Rollen. Verschiedene Kinasen, wie die cdc2 Kinase, sind für die Phosphorylierung des Core-Proteins verantwortlich, jedoch werden auch die Kinasen PKA (protein kinase A), PKC (protein kinase C), SRPK1 (serine/arginine protein-specific kinase 1), SRPK2 und eine 46 kDa Serine-Kinase mit der Core-Phosphorylierung in Verbindung gebracht (Kann und Gerlich, 1994; Kau und Ting, 1998; Liao und Ou, 1995; Daub et al., 2002). Innerhalb von Core werden hauptsächlich die Aminosäuren Ser 157, Ser 164 und Ser 172 phosphoryliert (Liao und Ou, 1995) und sind demnach obligatorisch für die Verpackung der pgRNA. Die Nukleokapsid-Bildung findet im Zytoplasma und zu geringen Teilen im Zellkern statt (Zhou et al., 1991). Innerhalb des Kapsids reift dann die pgRNA mit Hilfe der viralen Polymerase zu reifer DNA heran. Das besondere ist, dass nur Kapside mit reifem Genom effizient in die Virushülle verpackt werden (Wei et al., 1996), da die frühen Stadien der viralen DNA-Synthese nur in Nukleokapsiden und nicht in Virionen zu finden sind (Mason et al., 1982; Weiser et al., 1983). Dies wurde ebenfalls durch verschiedene C-terminale Verkürzungen des Core-Proteins bestätigt, die durch ihr Unvermögen in Nukleinsäure-Bindung die Kapsid-Umhüllung verhindern (Yu and Summers, 1991). Bei DHBV wurde gezeigt, dass durch Blockierung des aktiven Zentrums der Reversen Transkriptase die Kapside in einem unreifen Stadium verbleiben (Gerelsaikhon et al., 1996, Wei et al., 1996). Unklar ist allerdings, wie die Reifung des viralen Genoms vermittelt und die Verpackung der Nukleokapside signalisiert wird. Gewiss ist, dass die argininreiche Domäne notwendig ist (Yu und Summers, 1994 a, b), aber auch, dass die phosphorylierbaren Seitenketten des Core-Proteins eine Rolle bei der Verpackung der pgRNA und auch bei Reifung der DNA

spielen und so die Umhüllungswürdigkeit der Nukleokapside anzeigen (Gazina et al., 2000).

Weiterhin hat auch das Isoleucin an Position 97 der Core-Sequenz einen bedeutenden Einfluss auf die Umhüllung des Nukleokapsids. Wird I97 zu Leucin (I97L) mutiert, resultiert diese Sequenzänderung in der Verpackung unreifer Kapside (Yuan et al., 1999). Da die Seitenkette des Isoleucins 97 nicht auf der Außenseite des Kapsids lokalisiert ist, scheint diese Mutation eine Änderung der Protein-Konformation hervorzurufen, welche dann die Reifung des viralen Genoms signalisiert. Allerdings unterliegt das Reifungssignal einer ausgeprägten Komplexität. Diese kommt zum Ausdruck, wenn man zusätzlich zu der Mutation I97L das Prolin 130 zu Threonin mutiert (I97L, P130T); dadurch wird erreicht, dass wieder ausschließlich reife Kapside verpackt werden (Yuan und Shih, 2000). Eine weitere Rolle in der Vermittlung des Genom-Reifegrades scheint auch die Konformation des Kapsid-Spikes zu spielen, denn Aminosäure-Substitutionen in dieser Region führten zu Veränderungen der Virus-Sekretion (Roseman et al., 2005).

Letztendlich funktioniert dieser Selektions-Mechanismus, der nur reife Nukleokapside für die Verpackung zulässt, als Qualitätskontrolle, so dass ausschließlich kompetente Kapside zu Virionen umhüllt und aus den Leberzellen ausgeschleust werden können.

Dem steht ein Mechanismus in der frühen Infektions-Phase gegenüber, der es reifen Nukleokapsiden erlaubt, die Signalisierung für die Umhüllung zu umgehen und zum Kern zurück transportiert zu werden. Dies führt zur Steigerung der Virus-Replikation, denn, wie bei DHBV gezeigt, steigt entsprechend die Anzahl der cccDNAs im Kern auf etwa 20 bis 50 Moleküle (Tuttelman et al., 1986; Seeger und Mason, 2000). Lenhoff et al. präsentierten 1994, dass dieser Schritt von der Konzentration des L-Hüllproteins reguliert wird: Bei blockierter L-Protein-Synthese konnte ein signifikanter Anstieg nukleärer cccDNAs beobachtet werden. Genauere Mechanismen und die Lokalisation dieser Prozesse sind noch wenig geklärt; einige sollen in der hier vorliegenden Arbeit jedoch besonders beleuchtet werden.

1.5 Der Ausschleusungsmechanismus

Für viele umhüllte Viren, wie Retroviren (Gottlinger et al., 1991; Le Blanc et al., 2002; Puffer et al., 1997; Wills et al., 1994; Yasuda und Hunter, 1998; Yuan et al., 1999), Rhabdoviren (Craven et al., 1999), Filoviren (Harty et al., 2000; Martin-Serrano et al., 2001; Strack et al., 2000) und Arenaviren (Perez et al., 2003; Strecker et al., 2003) wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass sie das wirtszelleigene endosomale System nutzen, um die Zelle zu verlassen (Pornillos et al., 2002; Martindale, 2003; Morita und Sundquist, 2004). Dieses zytosolische System funktioniert als zentraler Drehpunkt der Protein-Sortierung, sowohl für den endozytotischen als auch den Biosynthese-Pathway. Es übernimmt die führende organisatorische Rolle in der Zelle, dabei dirigiert es den Protein-Transport zwischen dem trans-Golgi Netzwerk (TGN), der Plasmamembran und den Lysosomen (Gruenberg et al., 1995). Abb. 8 zeigt einige Funktionen, die über das Drehkreuz des endosomalen Systems laufen (Raiborg et al., 2003). Endozytierte Proteine der Plasmamembran werden hier entweder recycelt, also von frühen Endosomen wieder der Plasmamembran zugeführt, oder spezifisch in späte Endosomen und schließlich in Lysosomen transportiert und dort abgebaut (Felder et al., 1990; van Deurs et al., 1993; Futter et al., 1996; Raiborg et al., 2003). Das Sortieren und der Transport dieser Cargo-Proteine zu frühen und späten Endosomen laufen über Multivesikuläre Bodies (MVB), welche durch Invagination und Abschnürung von Vesikeln in das Lumen von Endosomen entstehen. Das System des Sortierens der Proteine in MVBs ist ein sehr komplexer Vorgang, der einer speziellen Regulierung unterliegen muss. Viele Studien zeigten, dass die Anheftung von Ubiquitin an einen Lysinrest des zu sortierenden Proteins das Signal zur Einschleusung in das System der MVBs darstellt (Hicke et al., 2001; Rocca et al., 2001; Marchese et al., 2001; Shenoy et al., 2001; Rotin et al., 2000), obwohl auch Ub-unabhängige Mechanismen zur Protein-Sortierung gefunden wurden (Reggiori und Pelham, 2001).

Bei Ubiquitin (Ub) handelt es sich um ein weit verbreitetes, hoch konserviertes Protein von 8 kDa, das ähnlich einer Phosphorylierung der

Markierung anderer Proteine dient. Die kovalente Anheftung einzelner Ub-Reste (Mono-Ub) oder kettenartig aneinander gereihter Ubiquitine (Poly-Ub) an Lysinreste der Zielproteine reguliert beispielsweise die Gen-Transkription, die DNA-Replikation und -Reparatur sowie den intrazellulären Transport (Haglund und Dikic, 2005).

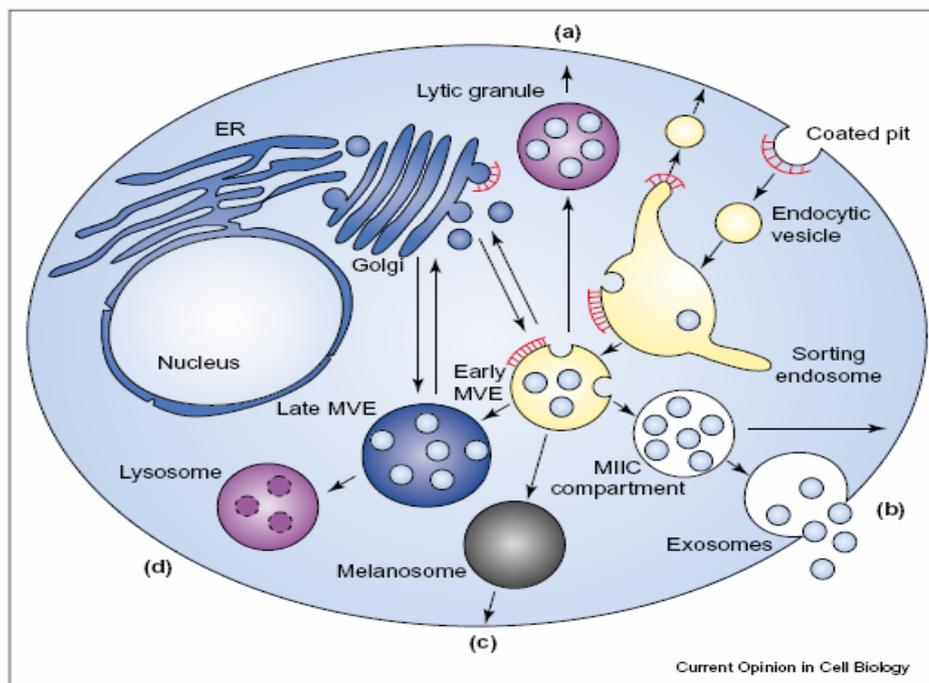


Abb. 8: Bildung und Funktion von MVBs

Multivesikuläre Körperchen bilden sich durch das Einstülpeln der Membran, die das frühe Endosom umgibt. Sie erfüllen eine Vielzahl von Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen: als lytische Granulae in T-Lymphozyten (a), MHC-Klasse II-Exosomen in Antigen-präsentierenden Zellen (b), Melanosomen in Melanozyten (c) und Lysosomen in den meisten kernhaltigen Zellen (d). Clathrin (rot) ist an der Vesikel-Bildung beteiligt (Raiborg et al., 2003).

Dabei wird die Poly-Ubiquitinierung von dem 26S-Proteasom erkannt und dient so als spezifisches Signal zur Degradierung von Proteinen (Passmore und Barford, 2004). Die Konjugation von nur einem Ub (Mono-Ub) vermittelt dagegen eine mehr regulatorische Modifikation, die bei der Transkription, der Endozytose und bei dem Membran-Trafficking genutzt wird (Hicke, 2001; Katzmann et al., 2002; Hicke und Dunn, 2003; Muratani und Tansey, 2003).

Die Ubiquitinierung von Proteinen wird induziert durch eine Vielzahl von vorangehenden Signalprozessen. Beispielsweise werden Zelloberflächen-Rezeptoren über die Stimulation mit extrazellulären Liganden ubiquitiniert (Hicke und Dunn, 2003). Viele zytosolische Proteine werden auch in Folge einer Phosphorylierung kovalent mit Ub verknüpft (Di Fiore et al., 2003; Muratani und Tansey, 2003). An dieser Stelle ist erwähnenswert, dass das HBV-Core-Protein innerhalb seines argininreichen C-terminalen Bereichs drei Serinreste besitzt, die spezifisch phosphoryliert werden (Liao, et al, 1995).

Die kovalente Anheftung des Ubiquitins an einen Lysinrest innerhalb des zu kennzeichnenden Proteins benötigt die Unterstützung von spezifischen Ubiquitin-Ligasen (Hicke et al., 2001): E1 (Ub-Aktivierungs-Enzym), E2 (Ub-Konjugations-Enzym) und E3 (Ub-Ligase). Sie sind kaskadenartig in einem dreistufigen Mechanismus angeordnet (Hershko, 1998; Pickart, 2001; Glickman und Ciechanover, 2002) und sorgen für die Kennzeichnung von Proteinen zur Einschleusung in MVBs. So sorgt E1 für die Aktivierung des Ubs, indem es zwischen seiner katalytischen Domäne und dem Ub eine Thioester-Bindung knüpft, es folgt die Übertragung des aktivierten Ubs auf E2, und die E3-Ligase übernimmt dann die Bindung des Ubs an das Zielprotein (Passmore und Barford, 2004). So markiert, ist es dem Zielprotein möglich, in das endosomale System einzutreten.

Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass bei Einschleusung der Proteine in dieses System die intraluminalen Vesikel durch Einstülpung und Abschnürung der endosomalen Membran gebildet werden (Katzmann et al., 2002). Die Suche nach beteiligten Komponenten in Hefen ergab eine Fülle von so genannten Klasse E Vps-Faktoren (vacuolar protein sorting), die an der MVB-Maschinerie beteiligt sind (Katzmann et al., 2002). Wobei gezeigt wurde, dass die beteiligten Proteine in Säugern konserviert sind. Zu den Vps-Proteinen zählen mindestens 17 verschiedene Komponenten, die in Komplexen lokalisiert sind, dem sogenannten ESCRT-System (endosomal sorting complex required for transport), bestehend aus ESCRT-I, -II und -III (Bilodeau et al., 2002). ESCRT-I besteht aus drei Untereinheiten und bindet ubiquitinierte Proteine über Tsg101. ESCRT-II

scheint ESCRT-I nachgeschaltet zu sein; seine Überexpression resultiert in Unterdrückung der ESCRT-I-Funktion (Katzmann et al., 2002). ESCRT-II gelangt zu endosomalen Membranen und ist notwendig für die Rekrutierung von ESCRT-III, der aus zwei Subkomplexen besteht. Notwendig für das Abschnüren der Vesikel ist, dass das ESCRT-Komplex-System mit Hilfe der AAA-typ ATPase wieder von der Membran abdissoziiert (Bishop et al., 2002).

Eines der charakterisierten Klasse E Vps-Proteine ist nicht in das ESCRT-System eingegliedert: Hrs (hepatocyte growth factor receptor substrate). Es bindet ubiquitinierte Proteine, vermittelt ihre Sortierung in MVBs (Bilodeau et al., 2002; Raiborg et al., 2002; Shih et al., 2002) und scheint zwischen die zu sortierenden Proteine und die ESCRT-Maschinerie geschaltet zu sein. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass Hrs mit Tsg101 interagiert, welches als Untereinheit von ESCRT-I für die Bindung ubiquitinerter Proteine zuständig ist (Raiborg et al., 2003).

Da Hrs ein PSAP-Motiv trägt, welches bei Viren als Late-Domäne (L-Domäne) und Bindungspartner der ESCRT-Komponente Tsg101 bekannt ist (Carter 2002; Pornillos et al., 2002c), könnte man zu der Annahme gelangen, dass virale Proteine eventuell die Stelle von Hrs innerhalb des MVB-Systems einnehmen könnten, und so die MVB-Maschinerie für ihre eigene Reproduktion rekrutieren. Diese Hypothese wird davon unterstützt, dass viele Retroviren (Gottlinger et al., 1991; Le Blanc et al., 2002; Puffer et al., 1997; Wills et al., 1994; Yasuda und Hunter, 1998; Yuan et al., 1999), Rhabdoviren (Craven et al., 1999), Filoviren (Harty et al., 2000; Martin-Serrano et al., 2001; Strack et al., 2000) und Arenaviren (Perez et al., 2003; Strecker et al., 2003) L-Domänen zur Rekrutierung von Faktoren der MVB-Biogenese tragen (Morita und Sundquist, 2004). Sie erhielten die Bezeichnung Late-Domäne aufgrund ihrer Funktion in späten Phasen der Virusmorphogenese.

L-Domänen sind hoch konservierte Motive, die als Vermittler bei Protein-Protein-Interaktionen zelleigener Proteine bekannt sind. Es sind bisher drei Motiv-Klassen charakterisiert: PS/TAP, PPxY und YxxL (x steht für eine beliebige Aminosäure), welche spezifisch mit zytosolischen Proteinen interagieren. Wo Tsg101 für PT/SAP gefunden wurde, charakterisierte

man für PPxY die E3-Ub-Ligase Nedd4 (Freed, 2002). Wie oben erwähnt, geht die L-Domäne PS/TAP eine Interaktion mit Tsg101 ein und beteiligt sich damit an der Sprossung von HIV-1 (Goff et al., 2003).

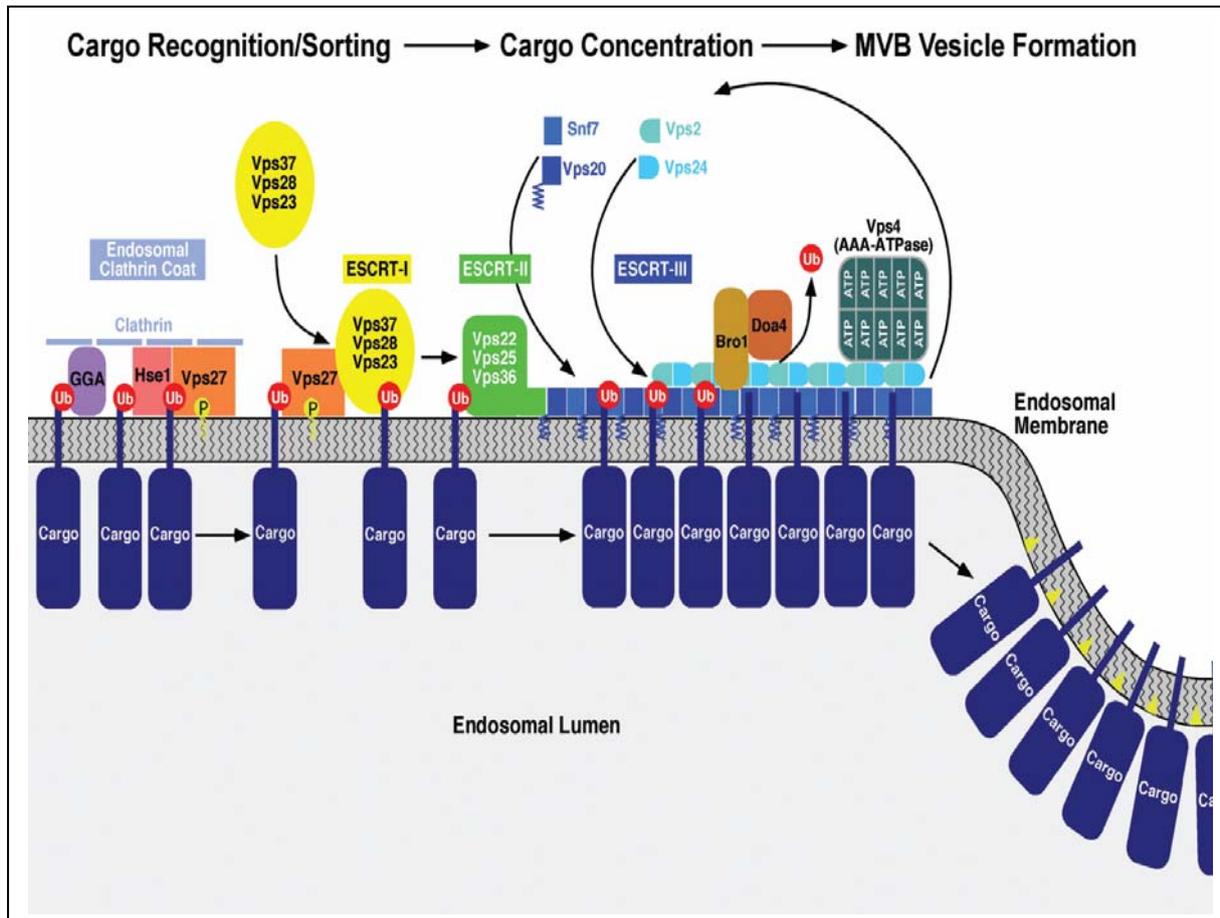


Abb. 9: Modell für die Ubiquitin-abhängige Sortierung von Transmembranproteinen in das Endosom

Ub-bindende Proteine (GGAs, Vps27/Hse1-Komplex) formen zusammen mit Clathrin einen Clathrin-Coat zur Konzentrierung der von der ESCRT-Maschinerie zu endozytierenden Proteinen. Vps27 rekrutiert ESCRT-I aus dem Zytosol an das Endosom, wo ESCRT-I mit monoubiquitinierten Cargo-Proteinen interagiert und ESCRT-II aktiviert. ESCRT-II bewerkstelligt die Zusammenlagerung der Komponenten von ESCRT-III (Vps2, Vps24, Vps20, Snf7). Dieser konzentriert die Cargo-Proteine und rekrutiert zusätzliche Faktoren wie Bro1 und Vps4. Bro1 rekrutiert Doa4, welches das Ubiquitin der Cargo-Proteine abspaltet. Vps4 deassoziert ESCRT-III. Die Einstülpung der Endosomen und die Bildung der MVB-Vesikel scheint über eine lokale Asymmetrie der Lipid-Zusammensetzung der beiden Membran-Doppelschichten zustande zu kommen (gelbe Dreiecke) (Babst, 2005).

Das zelluläre Protein Tsg101, das Produkt des „Mammalian Tumor Susceptibility-Gens“ (Li und Cohen, 1996), ist eine Variante des Ub-Konjugations Enzyms E2 (UEV) und an der Regulation des intrazellulären Transports, der Transkription und des Zellzyklus beteiligt (Babst et al., 2000; Lemmon und Traub., 2000; Xie et al., 1998; Zhong et al., 1998; Koonin et al., 1997; Ponting et al., 1997; Durfee et al., 1993). Es ist notwendig für die Interaktion von ESCRT-I mit ubiquitinierten Proteinen und mit ubiquitinierten MVB-Cargo-Proteinen (Katzmann et al., 2001). Gegenüber den E2-Enzymen fehlt den UEV-Proteinen der Cysteinrest, der essentiell für die Konjugation und den Transfer von Ub auf das Zielprotein ist (Koonin et al., 1997; Ponting et al., 1997). So scheint aber gerade diese veränderte Ub-Bindungs-Domäne in der UEV-Domäne von Tsg101 für die Interaktion mit Gag bei dem Sprossen von HIV wichtig zu sein (VerPlank et al., 2001).

Innerhalb der HBV-Core-Sequenz gibt es eine dem PS/TAP-Motiv ähnliche Domäne (PPNAP, AS134-137). Dies lässt die Frage aufkommen, ob es sich dabei um eine, am HBV-Ausschleusungsprozess beteiligte, Tsg101-bindende Domäne handelt. Zudem findet man noch die Sequenz PPAY an Position 129-132, die der L-Domäne PPxY entspricht. Diese Domäne findet sich auch in Ebola Viren, Rous Sarkoma Viren und Epstein-Barr Viren und ist am Ausschleusungsprozess dieser Viren beteiligt (Vana et al., 2004, Yasuda et al., 2003, Winberget al., 2000).

Für das PPxY-Motiv ist bekannt, dass es mit der WW-Domäne von Nedd4, einer E3-Ubiquitin-Ligase interagiert (Yasuda et al., 2003, Sudol, 1996). Wie oben erwähnt, sind E3-Ub-Ligasen an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt. Es gibt zwei Hauptklassen von E3-Ligasen: Proteine mit einer katalytischen HECT-Domäne (homologous to E6-AP carboxyl terminus) (Huibregtseet al., 1995) und Proteine mit einer RING-Adapter-Domäne (really interesting novel gene) (Joazeiro und Weissman, 2000). Zusätzlich enthalten E3-Ligasen eine U-Box (Hatakeyama et al., 2001; Jiang et al., 2001), eine PHD- (Boname and Stevenson, 2001; Coscoy et al., 2001; Lu et al., 2002) und eine HUL-1-Sequenz (Van Sant et al., 2001). N-terminal findet sich eine C2-Domäne und zahlreiche WW-Domänen (Ingham et al., 2004). Diese Proteine sind bei allen Eukaryonten zu finden

und regulieren diverse biologische Prozesse von Proteinen mit PPxY-Motiv, welches sie über ihre WW-Domänen erkennen. Nedd4 gehört zu den E3-Ub-Ligasen mit einer N-terminalen HECT-Domäne und zwei bis vier WW-Domänen (Huibregtse et al., 1995, Harvey and Kumar, 1999; Rotin et al., 2000). Die HECT-Domäne hat mindestens vier verschiedene Eigenschaften: sie kann direkt an E2 binden, kann über einen nicht variablen Cysteinrest eine Thioesterbindung zu Ub an E2 aufbauen, kann Ub an das Lysin des Substratproteins binden und kann weitere Ub-Reste auf das wachsende Ende einer Ub-Kette übertragen (Scheffner et al., 1995, Huibregtse et al., 1995, Huang et al., 1999). Die C2-Domäne bindet kalziumabhängig an Phospholipide und Membranen (Nalefski et al., 1996) und man geht davon aus, dass sie an Transport und Lokalisierung von Proteinen beteiligt ist. WW-Domänen sind kleine Module zur Protein-Protein-Interaktion, die bevorzugt prolinreiche Motive binden und für die zelluläre Lokalisation und die Substrat-Erkennung verantwortlich sind (Macias et al., 1996, Ranganathan et al., 1997, Ingham et al., 2004). Man findet sie unter anderem bei Proteinen, die an der Signalgebung beteiligt sind (Hofmann et al., 1995, Andre et al., 1994, Brok et al., 1994). Da sie meist wiederholt in einem Protein vorkommen, stellt man sich vor, dass sie kompetent sind, eine simultane Komplex-Bildung mit vielen Proteinen zu vermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wollen wir untersuchen, ob es sich bei den beiden in Core lokalisierten Motiven um potenzielle L-Domänen handelt, welche Rolle sie in der HBV-Morphogenese spielen und ob sie mit einigen der oben genannten zellulären Faktoren interagieren.

1.6 Zielsetzung

Diese Arbeit soll dazu beitragen, den bisher unbekanntem Ausschleusungsprozess des Hepatitis-B Virus besser zu verstehen. Bei einigen umhüllten Viren, wie beispielsweise bei HIV-1, Ebola-Virus, Equine Infectious Anemia Virus oder dem Humanen T-Zell Leukämie Virus Type 1 (HTLV-1), hat man so genannte Late-Domänen identifiziert (Martin-Serrano et al., 2001; Puffer et al., 1997; Heidecker et al., 2004). Sie sind maßgeblich daran beteiligt, einen zellulären Mechanismus für die Virus-Ausschleusung nutzbar zu machen, der normalerweise der Bildung von intrazellulären Vesikeln dient, welche in späte endosomale Kompartimente sprossen. Dabei rekrutieren sie wirtszelleigene Faktoren, wie beispielsweise Tsg101 und Nedd4. Innerhalb des HBV-Core-Proteins wurden zwei prolinreiche Sequenzabschnitte identifiziert, der Aminosäurenbereich 129-132 (PPAY) und 134-138 (PPNAP). Ob diese Motive den oben beschriebenen Late-Domänen entsprechen, und ob sie für die Morphogenese des Hepatitis-B Virus notwendig sind, ist eine der zentralen Fragen der hier vorliegenden Arbeit. Dazu wurden unterschiedliche Mutanten konstruiert und auf den Erhalt der Fähigkeit von Kapsid-, Nukleokapsid- und Virus-Bildung untersucht. Des Weiteren galt es zu überprüfen, ob die Motive PPAY und PPNAP auch innerhalb des HBV-Core-Proteins als Interaktionspartner von Faktoren des MVB-Signalwegs, vorwiegend Nedd4 und Tsg101, dienen. Über die Beleuchtung der Lokalisation des Kapsid-Proteins in der Leberzelle soll erörtert werden, ob Core in den endosomalen Transportweg eingeschleust wird und ob es an vesikuläre Membranen bindet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage (Mettler AE 100)

Autoklav (CertoClav)

Cell-Porator (GibcoBRL)

DNA-Syntheseegerät, T-Gradient (Biometra)

Dounce-Homogenisator, Duall 20 (Kontes Glass CO.)

Deckgläschen (Roth)

Geigerzähler, LB 1310 B (Berthold)

Gel-Apparatur, horizontal (LMS)

Gel-Apparatur, vertikal (BRL)

Gewebekulturflaschen (Greiner)

Hamilton-Pipette, Microliter Syringes (Hamilton)

Heizblock, Thermomixer comfort (Eppendorf)

Inkubationsschrank (Heraeus)

Kühlzentrifuge, Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments)

Minifuge RF (Heareus Christ)

Laborwaage (Mettler PM 2000)

Magnetrührer, Ikamag REC-G (Janke/Kunkel)

Mikrowelle (Alaska)

Netzgeräte (Pharmacia)

pH-Meter (inoLab)

Phosphorimager, Storm 840 (Molecular Dynamics)

Photometer, Ultrospec 1000 (Pharmacia)

Pipettierhilfen, Pipetboy (IBS)

Mikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss)

Multipette (Eppendorf)

2.1.2 Reagenzien/ Kits

Diese Kits wurden nach den Protokollen der Hersteller durchgeführt.

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Anwendung</u>
Jetsorb	Genomed	DNA-Extraktion aus Agarosegelen
Perfectprep Plasmid Maxi	Eppendorf	Plasmid-Isolation (maxi)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab	Plasmid- Isolation (mini)
Lipofectamine TM Reagent/ Transfektionsreagenz PLUS-Regent	Invitrogen	
Quik Change [®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Mutagenese
ECL TM Western Blotting Detection Reagenz	Amersham Biosciences	WB-Detektion
Fluoprep Einbettmedium	bioMérieux	

2.1.3 Puffer und Lösungen

Acryl/Bisacryl-Lösung (SDS-PAGE)	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N'Methylenbisacrylamid
Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml
Auftragspuffer (Agarosegele)	25 % (v/v) Ficoll (400) 0.25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % Xylene Cyanol
Auftragspuffer (SDS-PAGE)	50 mM Tris-Cl pH 6,8 2 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 10 % Glycerin 5 % β -Mercaptoethanol

Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml
Lysepuffer (Standard-Zellyse)	10 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 1 % NP-40
PBS (10 x)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 11,5 mM H_2PO_4 65 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Ponceau S-Lösung	2 % (w/v) Ponceau S-Konzentrat 30 % (w/v) Trichloressigsäure 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure
SDS-PAGE-Puffer	0,7 M Glycin 0,1 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
TAE-Elektrophorese- Puffer pH 8,5 (10 x)	0,4 M Tris 0,2 M Natriumacetat 0,01 M EDTA
TBS-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl
TE-Puffer pH 8	10 mM Tris 1 mM EDTA
Westernblot-Transfer-Puffer	20 mM Tris 150 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

DNA-Gewichtsmarker:

Lambda-DNA (New England Biolabs), mit Eco RI und HIND III restringiert

100 bp Marker (Fermentas)

50 bp Marker (Fermentas)

Protein-Gewichtsmarker:

High Molecular Weight-Marker (Amersham Pharmacia Biotech):

Myosin	220 kDa
α -2-Makroglobulin	170 kDa
β -Galaktosidase	116 kDa
Transferrin	76 kDa
Glutamat Dehydrogenase	53 kDa

Low Molecular Weight-Marker (Fermentas):

β -Galaktosidase	116 kDa
Bovine Serum Albumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Laktat Dehydrogenase	35 kDa
RFase Bsp98I	25 kDa
β -Lactoglobulin	18,4 kDa
Lysozym	14,4 kDa

2.1.7 Zelllinien

Huh7-Zellen: humane Hepatomazellen

2.1.8 Antikörper

primäre AK:

- α -HA: monoklonaler Maus-Ak gegen die Sequenz YPYDVPDYA innerhalb des Hämagglutininproteins (Babco)
- polyklonales Kaninchenantiserum gegen das HBV S-Hüllprotein
- polyklonales Kaninchenantiserum gegen das HBV L-Hüllprotein
- polyklonales Kaninchenantiserum gegen natives HBV Kapsid-Protein
- polyklonales Kaninchenantiserum gegen denaturiertes HBV Kapsid-Protein
- α -CD63: monoklonaler Maus-Ak gegen das endosomale Tetraspaninprotein CD63
- α -myc: monoklonaler Maus-Ak gegen das myc-Epitop mit der Sequenz EQKLISEEDL (Clontech)
- α -FLAG: monoklonaler Maus-Ak gegen das Flag-Epitop mit der Sequenz DYKDDDDK (Sigma)

sekundäre Ak:

- Alexa Flour[®]594-gekoppelter polyklonaler Ziegen-AK gegen Maus-Antigene (Molecular Probes)
- Alexa Flour[®]488-gekoppelter polyklonaler Ziegen-AK gegen Kaninchen-Antigene (Molecular Probes)
- Peroxidase-gekoppelter polyklonaler Ziegen-AK gegen Maus-Antigene (Dianova)
- Peroxidase-gekoppelter polyklonaler Ziegen-AK gegen Kaninchen-Antigene (Dianova)

2.1.9 Vektoren und Oligonukleotide für die Mutagenese

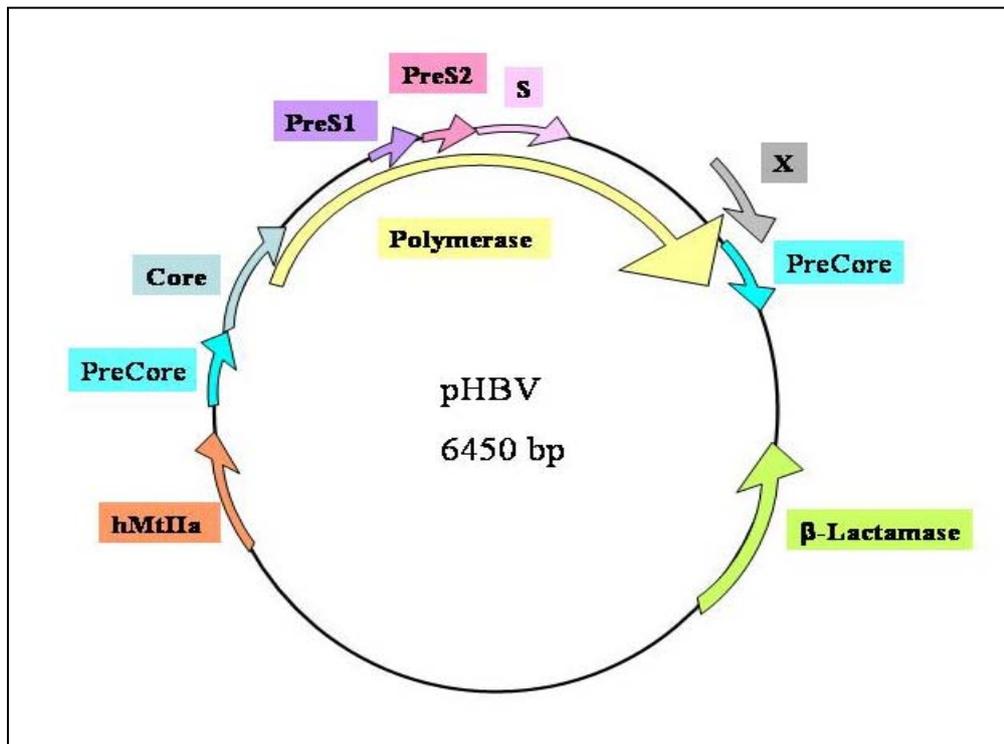


Abb. 10 Darstellung des HBV-Genoms innerhalb des pHBV-Vektors

Das Plasmid pHBV enthält eine 1,1 fache Kopie des HBV-Genoms des Subtyps ayw, wobei die Transkription des Core-Proteins und der Polymerase unter Kontrolle des humanen Metallothionin-IIa-Promotors (hMtIIa) (rot) stehen. Die Transkription der Hüllproteine und des X-Proteins werden durch virale Promotoren reguliert. Farblich dargestellt sind das PreCore-Protein (türkis), das Core-Protein (blau), das kleine (S-) Hüllprotein (rosa), das mittlere (M-) Hüllprotein, das sich aus PreS2 (pink) und S (rosa) zusammensetzt und das große (L-) Hüllprotein, das sich aus PreS1 (lila), PreS2 (pink) und S (rosa) aufbaut. Grün abgebildet ist das Gen der β -Lactamase. Exprimiert vermittelt β -Lactamase Bakterien, die mit pHBV transformiert werden, eine Resistenz gegen Ampicillin, so dass dieses Antibiotikum zur Selektion von pHBV-replizierenden Bakterien dienlich sein kann.

Zur transienten Expression des HBV-Genoms verwendeten wir das Plasmid pUC13.HBV (pHBV) (Bartenschlager und Schaller, 1992; siehe Abb.10). Mittels Punktmutation wurde ein Stopp-Codon in das Core-Gen eingeführt, so dass eine Core-defiziente Mutante (pHBV. Δ C) entstand. Das dazu verwendete Oligonukleotid hat die Sequenz:

5'-GATACCGCCTCAGCTCTTTAAAGGGAAGCCTTAGAG-3'

Als Matrize diente der Vektor pHBV. Zur Ermittlung positiver Mutanten wurde eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym DraI eingeführt.

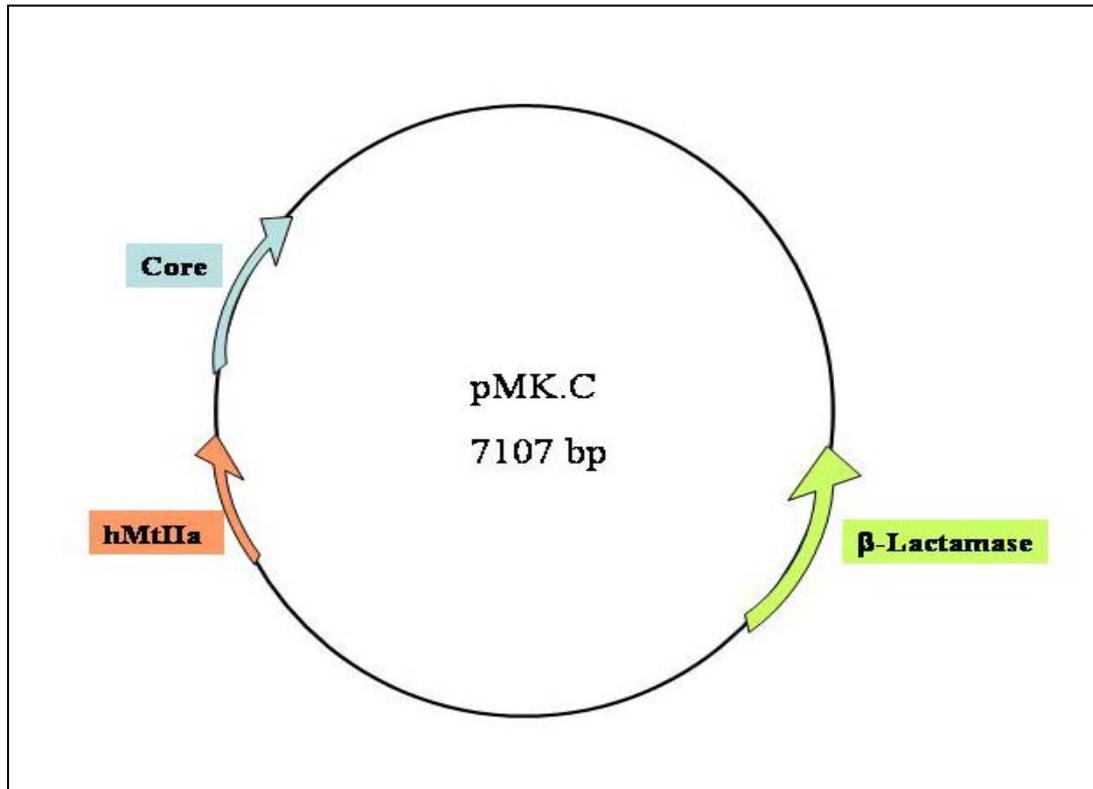


Abb.11 Der Expressionsvektor des Kapsid-Proteins

Dargestellt ist das Plasmid pMK.C. Es enthält das Gen des Core-Proteins, dem der humane Metallothionin-IIa-Promotor (hMtIIa) (rot) vorgeschaltet ist. Zusätzlich beinhaltet pMK.C noch das Gen der β -Lactamase (grün) zur Resistenzvermittlung gegen Ampicillin.

Zur transienten Proteinexpression des Kapsid-Proteins in humanen Leberzellen wurde das Core-Gen in den Vektor pNI2 (Israel et al., 1989) kloniert (pMK.C) (siehe Abb.11). Dieses Konstrukt diente als Matrize zur Herstellung verschiedener Core-Mutanten mit dem Quik Change[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), wobei die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide (Primer), bei welchen die ausgetauschten Nukleotide rot hervorgehoben sind, verwendet wurden. Zur Selektionierung positiver Mutanten führten wir diagnostische Restriktionsschnittstellen ein, die gelb unterlegt sind.

1. pMK.C-P129A: Austausch des Prolins 129 innerhalb des Core-Gens zu Alanin

Primer: 5'-GAGTGTGGATTCGCAC**GGCGCC**AGCTTATAGACCAC-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **BanI**

2. pMK.C-PP134,135AA: Austausch der Proline 134 und 135 innerhalb des Core-Gens gegen Alanine

Primer: 5'-GCACTCCTCCAGCTTATAGA**GCAGCAAATGC**CCCTA-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **BstAPI**

3. pMK.C-A137G: Austausch des Alanins 137 des Core-Gens gegen Glycin

Primer: 5'-CAGCTTATAGACCACCAAAT**GGGCC**ATCCTATCA-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **BanII**

4. pMK.C-N136T: Austausch des Asparagins 136 des Core-Gens gegen Threonin

Primer: 5'-CCAGCTTATAGACCACCAAC**GGCAC**CTATCCTATCAACACTTCC-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **BanI**

5. pMK.C-K7A: Austausch des Lysins 7 innerhalb des Core-Gens gegen Alanin

Primer: 5'-CATGGACATCGACC**CATATGCG**GAATTTGGAGCTACTGTGGA-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **NdeI**

6. pMK.C-K96A: Austausch des Lysins 96 des Core-Gens zu Alanin

Primer: 5'-TCAACACTAATATGGG**GCTAGC**GTTCAGGCAACTCTT
GTG-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **NheI**

7. pMK.C-PPAY 25-28: zusätzlicher Einbau eines PPAY-Motivs an AS-
Positionen 129-132 des Core-Gens

Primer: 5'-TGCCTTCTGACTTCTTTCCT**CCAGCATATG**ATCTTCTA
GATACCGCCTCAGC-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **NdeI**

8. pMK.C-APAY 25-28: Austausch der Proline 25 und 129 gegen Alanine

Primer: 5'-GAGTGTGGATTTCGCAC**GGCGCC**AGCTTATAGACCAC-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **BanI**

9. pMK.C-Δ PPAY: Deletion des PPAY-Motivs des Core-Gens

Primer: 5'-GGAGTGTGGATTTCGCACT(4 Triplets deletiert)**AGGCCTC**
CAAATGCC-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **StuI**

10. pMK.C-Y132A: Austausch des Tyrosins 132 des Core-Gens zu Alanin

Primer: 5'-CGCACTCCTC**CAGCTG**CTAGACCACCAAATGCC-3'

Matrize: pMK.C

Restriktionsschnittstelle für **PvuII**

11. pMK.C-KK7,96AA: Austausch der Lysine 7 und 96 innerhalb des
Core-Gens zu Alanine

Primer: 5'-TCAACACTAATATGGG**GCTAGC**GTTCAGGCAACTCTT
GTG-3'

Matrize: pMK.C-K7A

Restriktionsschnittstelle für **NheI**

Nedd4-Expressionsvektor:

Der Hefevektor pGADNOT enthält das Gen der humanen E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4 und wurde uns von F. Bourmr (Howard Huges Medical Institute New York, USA) zur Verfügung gestellt. Zur Expression dieser Ligase in Säugerzellen und ihrer N-terminalen Markierung mit dem FLAG-Epitop klonierten wir das Gen für Nedd4 in das Plasmid p3xFLAG, das wir von E. Gottwein (Universität Heidelberg) erhielten.

Tsg101-Expressionsvektor:

Der Expressionsvektor pBJ-myc beinhaltet an der Restriktionsschnittstelle für BamH1 das Gen für Tsg101 und stammt von Takabe und Mitarbeitern (Department of Viral Oncology, Cancer Institute, Tokyo, Japan).

2.3 Methoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) oder Ausubel et al. (1994) durchgeführt:

- Anlegen von Bakterienkulturen
- Fragmentierung von DNA
- Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese
- Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen
- Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE
- Protein-Transfer auf Nitrocellulose-Membran – Western-Blot
- Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)

2.3.1 Mutagenese

Zur Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese wurde das Quik Change[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet (Abb.11). Anstelle der Bakterien des Kits verwendeten wir One Shot[®] MAX Efficiency[®] DH5 α TM-T1^R Competent Cells (Invitrogen). Das Prinzip des

hier verwendeten Kits beruht darauf, dass die Matrizen-DNA in Bakterien vermehrt wurde, die ihre replizierten Plasmide spezifisch methylieren. Da dies bei DNA-Amplifikation mittels PCR nicht der Fall ist, können die Ausgangsplasmide nach der PCR mit dem Restriktionsenzym DpnI, das ausschließlich methylierte DNA schneidet, fragmentiert werden. Bei Transformation der so behandelten PCR-Reaktionen in Bakterien, werden nur noch die neuen, also die Mutation-tragenden Plasmide, repliziert. Zur Überprüfung der Mutagenese wurden DNA-Sequenzierungen von der Firma GENterprise (Mainz) durchgeführt.

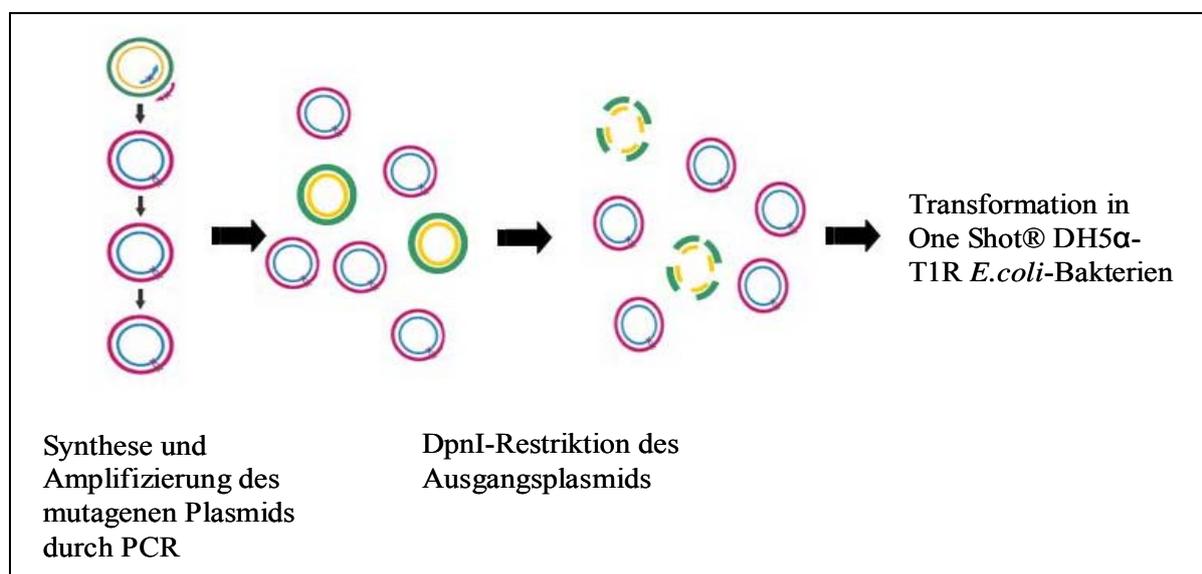


Abb. 12: Schematische Darstellung der Mutagenese

Dargestellt ist das Prinzip der Mutagenese nach dem Quik Change® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene. Der ursprüngliche Vektor ist in grün-gelb, die neu synthetisierten Plasmide in pink-blau dargestellt. Die Restriktionsendonuklease DpnI erkennt spezifisch methylierte DNA (gelb-grün) und baut so nur Matrizen-DNA ab, die durch ihre Amplifikation in Bakterien methyliert vorliegt. Es verbleibt also die neu-synthetisierte, nicht-methylierte Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation. Diese wird in One Shot® DH5α - T1R *E.coli* transformiert und von diesen Bakterien spezifisch vermehrt.

2.3.2 Kultivierung von Huh7-Zellen

Da HBV ein leberspezifisches Virus ist, führten wir die transiente Expression von Proteinen und von Virionen in Zellkultur mit Huh7-Zellen durch. Diese wurden in Zellkulturmedium (Dulbecco's modified Eagle

Medium, DMEM, Gibco BRL) unter Zugabe von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden sie für eine Minute mit PBS / 2,5 mM EDTA / 0,05 % Trypsin inkubiert, der Überstand abgenommen und für weitere fünf Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen, mit frischem Medium verdünnt und in eine Gewebekulturflasche überführt, beziehungsweise zur Transfektion in Zellkulturschalen bestimmter Größe so ausgesät, dass sie am folgenden Tag eine etwa 90 %ige Konfluenz zeigen. Bei der Durchführung der Transfektion der Zellen kam das Lipofectamine-Reagenz/Plus-Reagenz (Invitrogene) zur Anwendung. Dieses positiv-geladene Lipid-Reagenz interagiert spontan mit der negativ-geladenen, einzubringenden Plasmid-DNA und formt Komplexe, welche wiederum mit der negativ-geladenen Plasmamembran der Zellen interagieren, was zur Aufnahme der Lipid-DNA-Komplexe in die Zellen führt.

2.3.3 Überprüfung der Transfektions-Effizienz mittels HBsAg-ELISA

Zur allgemeinen Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die Konzentration des kleinen HBV-Hüllproteins (HBsAg) gemessen. Wir verwendeten zu diesem Zweck einen speziellen ELISA-Kit: das AUSZYME Monoclonal enzyme immunoassay (Abbott Diagnostics). Dieser Kit beruht auf Beads, die mit monoklonalem Antikörper gegen das S-Protein beschichtet sind. Diese Beads werden zusammen mit Peroxidasegekoppelten Antikörpern gegen das HbsAg zu den Proben gegeben. Als Proben wurden sowohl Zellkultur-Überstände als auch Zelllysate verwendet. Eine Positiv- und eine Negativ-Kontrollprobe sind in dem Kit enthalten und wurden als Referenz mitgeführt. Nach zweistündiger Inkubation im Wasserbad bei 40°C wurden die Beads gewaschen und mit o-Phenylenediamine-Lösung (OPD) überschichtet. Nach einer

Einwirkdauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur und dunkler Umgebung konnte der durch die Peroxidase-OPD-Reaktion hervorgerufene Farbumschlag mit Schwefelsäure gestoppt und mit einem Spektrometer (Abbott) bei Wellenlänge 492 nm gemessen werden. Die Proben galten als reaktiv, wenn die Messwerte über denen der Positiv-Kontrolle lagen und standen dann den weiterführenden Versuchen zur Verfügung.

2.3.4 Immunfluoreszenz

Huh7-Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und in Zellkulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ 24 Stunden kultiviert. Die Kotransfektion der konfluenten Zellen erfolgte mit gleichen Mengen (je 2 µg) des Genoms der Core-Mutanten und der Core-defizienten HBV-DNA. Die darauf folgende Kultivierung der Zellen dauerte etwa 48 Stunden. Danach wurde das Medium der Zellen durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt und die Zellen mit 1 ml Methanol bei -20°C 15 Minuten fixiert. Zur Entfernung des Methanols wurde mit PBS-Puffer gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit Ziegen-Serum (1:20 in PBS) 30 Minuten bei 37°C blockiert. Nach Beseitigung des Ziegen-Serums mit PBS inkubierten wir mit primärem Antikörper eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Behandlung der Zellen mit sekundärem Antikörper (1:100 in PBS; 1 Stunde, 37°C, feuchte Bedingungen). Daraufhin wurde wieder gewaschen, die Proben kurz getrocknet und mit Einbettmedium eingedeckt. Die so spezifisch markierten Strukturen der Huh7-Zellen konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss) mit der Software Axiovision Release 4.4 identifiziert werden.

2.3.5 Nachweis des Hepatitis-B Virus-Kapsids

Die Core-Protein-Dimere lagern sich kugelförmig zusammen (Kapside, Core-Partikel). Sie können virale RNA beinhalten und werden dann als Nukleokapside bezeichnet. Der hier dargestellte Aufschluss weist zusammengelagerte Core-Proteine nach, ohne jedoch zwischen Kapsiden und Nukleokapsiden zu unterscheiden.

Dazu wurden Huh7-Zellen in 10 cm Schalen mit dem Core-defizienten Plasmid pHBV Δ C (5 μ g) und der DNA der jeweiligen Core-Mutante (5 μ g) kotransfiziert. Nach 48 Stunden kam es zur Aufarbeitung der Zellen mit Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 % NP-40), und durch Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, 4°C) wurde das Lysat von Nukleus und unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Durch die Zentrifugation (21 Stunden, 50.000 rpm, 20°C) des Lysats auf einem Sacchause-Gradienten (1,5 ml 20 % Succrose in PBS, 1 ml 40 % Saccharose in PBS) entstand ein Pellet, das die HBV-Kapside enthielt. Es wurde in 150 μ l PBS gelöst und 40 μ l der Probe auf einem Agarosegel (1 %) aufgetrennt. Man überführte nun die Kapside aus dem Agarosegel auf eine Nitrocellulose-Membran und detektierte sie immunochemisch mit Antikörpern gegen natives Core-Protein.

2.3.6 Nachweis von Nukleokapsiden und Virionen des Hepatitis-B Virus

Die Bildung von Hepatitis-B Viren wurde mit der Endogenen Polymerase Reaktion (EPR) überprüft. Dieser Nachweis basiert darauf, dass das partiell einzelsträngige HBV-DNA-Genom im Verlauf des Replikations-Zyklus durch die virale Polymerase im Inneren des Nukleokapsids komplettiert werden kann. Immunpräzipitierte Virionen aus dem Zellkulturüberstand werden mit Desoxyribonukleotiden inkubiert, wobei eines der vier Nukleotide zur späteren Detektion radioaktiv markiert ist. Durch sanftes Destabilisieren der Hülle und Poren im Nukleokapsid (Mest et al., 1998)

können die Nukleotide in das Kapsid eindringen. Nach Isolierung der DNA und Auftrennung im Agarosegel kann mittels Autoradiographie eine Aussage über das Vorliegen von HBV-DNA, das heißt von Virionen, getroffen werden. Das gleiche Verfahren kann auch zum Nachweis von Nukleokapsiden genutzt werden, wobei diese mit einem Core-Antikörper aus dem Zelllysat immunpräzipitiert und dann genauso der EPR ausgesetzt werden.

Zur Prüfung der Mutanten auf Virusbildung wurden Huh7-Zellen (10 cm Schalen) mit dem Core-defizienten Plasmid pHBV. Δ C (5 μ g) und der DNA der jeweiligen Core-Mutante (5 μ g) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Kultivierung arbeiteten wir die Zellen mit Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 % NP-40) auf und trennten durch Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, 4°C) das Lysat von unlöslichen Zellresten. Mittels Immunpräzipitation konnten aus den Lysaten hüllenlose Nukleokapside und aus den Zellkulturüberständen Virionen isoliert werden. Zu Beginn erfolgte die Beschichtung von 10 %iger Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences) über Nacht bei 4°C im Eppendorf-Karussell mit Core-Protein-spezifischen Antikörpern für die Präzipitierung der Nukleokapside (Lysatproben) und mit polyklonalem, HBsAg- und HBcAg-spezifischen Antikörpern für die Fällung der Virionen (Zellkulturüberstände). Darauf folgend wurde die Sepharose zweimal mit TBS gewaschen, so dass nur noch an Sepharose gebundene Antikörper vorlagen. Die Zellkulturüberstände wurden zuerst mit 75 μ l der beschichteten Sepharose (HBsAg-Ak und HBcAg-Ak) vier Stunden bei Raumtemperatur im Karussell inkubiert, und die Sepharose wurde dann abzentrifugiert (1 Minute, 2500 rpm). Man inkubierte die Zellkulturüberstände ein weiteres Mal mit 75 μ l der Sepharose-AK-Suspension (über Nacht, 4°C, Karussell) und gab beide Sepharoseansätze zusammen. Mit Waschpuffer (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 75 mM NH₄Cl, 1 mM EDTA, pH 8) wurden die Proben mehrfach gewaschen.

Zur Immunpräzipitation der Nukleokapside wurden 750 μ l der Lysate einmal mit 75 μ l der beschichteten Sepharose (HBcAg-Ak) über Nacht bei 4°C im Karussell inkubiert und darauf folgend gewaschen. Die Virionen

beziehungsweise die hüllenlosen Nukleokapside lagen als Immunpräzipitate an Sepharose gebunden vor.

Zur Markierung der HBV-DNA erfolgte die Inkubation der Immunpräzipitate mit je 50 µl Reaktionspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 75 mM NH₄Cl, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM MgCl₂, 0,1 % β-Mercaptoethanol, 0,5 % NP-40, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dGTP, 0,4 mM dTTP) und 1 µl [α -³²P] dCTP (10 µCi, Amersham) bei 37°C über Nacht. Durch einstündige Behandlung mit 1 µg Proteinase K (Sigma) und 2,5 µl 10 %igem SDS und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion (Maniatis et al., 1989) wurde die DNA isoliert. Mittels Sepharosesäulen (NICKTM G-50 Sephadex Column, Amersham Biosciences) konnten nicht- eingebaute Nukleotide von der DNA abgetrennt und danach die DNA mit Hilfe von 20 µg Hefe-tRNA und Ethanol gefällt werden. Versetzt mit 10 µl TNE-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 % SDS) und 2 µl Ficoll-Blaupuffer kam es zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA auf einem 1 % Agarose / 0,1 % SDS-Gel. Nach Trocknung des Gels konnte die radioaktive virale DNA mit Hilfe des Phosphorimagers (Molecular Dynamics) detektiert werden.

2.3.7 Interaktions-Assay

Der Nachweis der Interaktion von Core mit der E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4 beziehungsweise mit Tsg101 erfolgte durch Kotransfektion von Huh7-Zellen (6 cm-Schalen) mit der DNA der jeweiligen Core-Mutante (4 µg) und mit FLAG-markiertem Nedd4 (4 µg) beziehungsweise myc-markiertem Tsg101 (4 µg). Der 48 stündigen Zell-Kultivierung folgte die Zellyse mit einem hypotonischen Puffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 1 mM MgCl₂, Proteaseinhibitoren (Serva)) und 30-maligem Pottern. Mit NaCl wurden wieder isotonische Bedingungen eingestellt, und durch zweimaliges Zentrifugieren (10 min, 2000 rpm 4°C; 10 min 10000 rpm, 4°C) wurde das Lysat für die Immunpräzipitation gewonnen. Die Lysate wurden mit Protein A-Sepharose (Amersham Biosciences) oder Protein A-

Agarose (Calbiochem) vorgereinigt (1 Stunde, 4°C, Eppendorf-Karussell), wonach die Sepharose/Agarose abzentrifugiert (20 Sekunden, 13,000 rpm) und verworfen wurde. Die darauf folgende Inkubation der Lysate mit Core-spezifischen Antikörpern (jeweils 10 µl gegen natives und 10 µl gegen denaturiertes Core-Protein) dauerte drei Stunden bei 4°C. Danach wurden die Ansätze je mit 50 µl Protein A Sepharose/Agarose versetzt und zwei Stunden bei 4°C im Eppendorf-Karussell gedreht. Nach dem Waschen der Proben mit Waschpuffer (200 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7,5, 0,5 % Chaps (Sigma)) und mit 125 mM Tris/Cl pH 6,8 trennten wir die Proben auf einem SDS-Gel auf und führten mittels Western-Blot Analyse die weitere Detektion durch.

2.3.8 Membran-Flotations Assay

Dieser Versuch sollte die intrazelluläre Lokalisation der HBV-Kapside aufdecken und zeigte, ob sie im Zytosol oder gebunden an intrazellulären Membranen vorliegen. Huh7-Zellen (10 cm-Schalen) wurden zu gleichen Teilen (5 µg) mit Core-DNA und mit pHBV.ΔC kotransfiziert. Nach 48 Stunden Kultivierung kam es zum Aufschluss der Zellen mit 1 ml Puffer (10 % Saccharose, 10 mM Tris/Cl pH 7,5, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren) und 50-maligem Pottern. Es wurde zentrifugiert (4 Minuten, 2000 rpm, 4°C), das Pellet verworfen, der Überstand auf 60 % Saccharose eingestellt und in einem SW60-Zentrifugenröhrchen mit 1,6 ml 48 %iger Saccharose-Lösung und 0,8 ml 10 %iger Saccharose-Lösung überschichtet. Nach dreistündiger Zentrifugation bei 40.000 rpm und 20°C unterteilte man die Proben in 500 µl-Fraktionen und trennte 70 µl davon auf einem SDS-Gel auf. Mittels Western-Blot konnten dann die Kapside-enthaltenden Fraktionen ermittelt werden. Da sich die zellulären Membranen nach Zentrifugation in den 10-48 %-Saccharose-Fraktionen (1-3) befinden, sollten dort auch membrangebundene Kapside identifiziert werden. Zytosolische Proteine dagegen finden sich in höher konzentrierten Saccharose-Lösungen, so dass die frei im Zytoplasma vorkommenden Kapside in den 60 %-Fraktionen (4-7) zu detektieren sind.

3. Ergebnisse

Für viele umhüllte RNA-Viren wurde gezeigt, dass sie sogenannte Late-Domänen besitzen. Diese Sequenz-Motive können mit Wirtszellfaktoren interagieren, deren physiologische Aufgabe die Protein-Sortierung in MVBs ist. Solche Interaktionen vermitteln Viren Zugang zu wirtszell-eigenen Vesikel-Bildungs- und Transport-Prozessen, an denen unter anderem die Ubiquitin-Ligase Nedd4 und die ESCRT-I-Komponente Tsg101 maßgeblich beteiligt sind (Freed, 2002).

Das Core-Protein von HBV besitzt ähnliche Sequenzen: einerseits die Sequenz PPAY (AS 129-132), die mit dem als Late-Domäne bekannten Motiv PPxY übereinstimmt, und andererseits die Sequenz PPNAP (AS 134-138), die Ähnlichkeiten mit der L-Domäne PS/TAP aufweist. Beide Motive befinden sich in einer Schleife, die aus dem Kapsid herausragt (Conway et al., 1997). Dies deutet an, dass sie auf der Oberfläche der Kapsid-Partikel lokalisiert sind, so dass eine Bindung an Wirtszellfaktoren sterisch möglich wäre. Als Ziel dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob und welche Funktionen diese Domänen während der HBV-Morphogenese haben. Dazu wurden zahlreiche Mutanten der beiden Motive konstruiert und auf ihre Rolle hinsichtlich Kapsid-, Nukleokapsid- und Virus-Bildung untersucht. Zusätzlich zu den Mutationen innerhalb der beiden angenommenen Late-Domänen wurden noch Punktmutanten zweier Lysine konstruiert, denn Lysine können als spezifische Ubiquitinylierungsstellen von Proteinen dienen, und eine Konjugation mit Ub stellt das Signal zur Einschleusung in MVBs dar.

3.1 Transkomplementations-Assay

Da die Gene von HBV in überlappenden Leserahmen innerhalb des Virus-Genoms angeordnet sind, konnten die Mutationen nicht direkt in das Genom eingefügt werden, denn dies hätte gleichzeitig zu Veränderungen des viralen Polymerase-Gens geführt. Aus diesem Grund wurden die Mutationen in ein Plasmid eingebaut, das nur die Core-Gensequenz trägt (pMK.C, WT-Core). Um allerdings Versuche zur Virus-Morphogenese durchzuführen, musste zunächst eine Core-defiziente Mutante (pHBV Δ C) konstruiert werden, die alle HBV-Proteine synthetisiert, jedoch nicht das Core-Protein. Wird diese Core-defiziente HBV-Mutante dann zusammen mit dem WT-Core (pMK.C) in Leberzellen (Huh7-Zellen) kotransfiziert, kann es zur Synthese aller HBV-Proteine und somit auch zur Virus-Bildung kommen (siehe Abb. 13). Alternativ zu dem Wildtyp-Vektor pMK.C konnte mit der jeweiligen Mutante des Core-Proteins transfiziert und so deren Einfluss auf die HBV-Morphogenese überprüft werden.

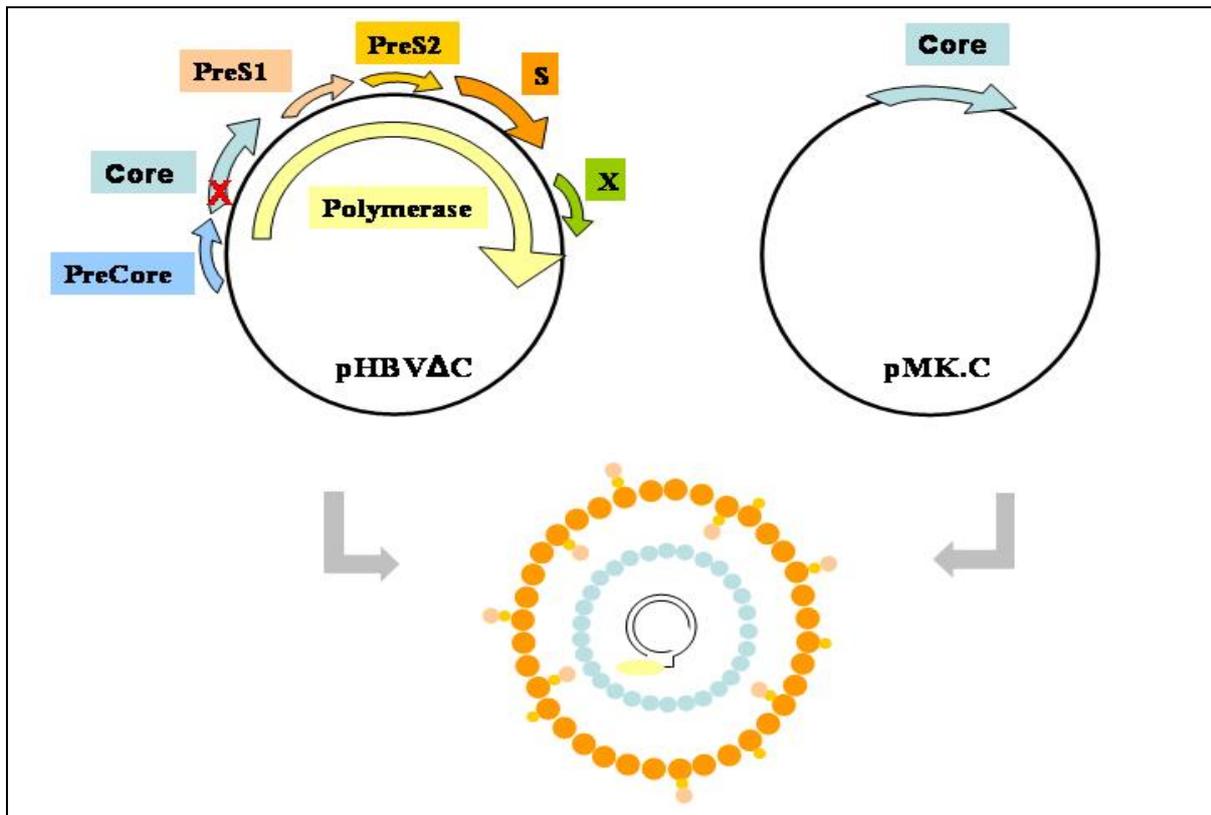


Abb.13 Transkomplementation von pHBVΔC mit dem Core-Gen

Zur Einführung von Mutationen in das HBV-Core-Protein ohne Beeinflussung der restlichen HBV-Proteine wurde ein Stopp-Codon (rotes X) innerhalb des Core-Gens des Vektors pHBV konstruiert. Es entstand das Plasmid pHBVΔC (links oben). Wurde letzteres zusammen mit pMK.C (rechts oben), beziehungsweise der jeweiligen Mutante, im gleichen Konzentrationsverhältnis in humane Leberzellen (Huh7) kotransfiziert, werden von jedem Plasmid die von ihm kodierten Proteine synthetisiert, so dass pMK.C den Core-defizienten Vektor pHBVΔC komplementiert. Nach etwa 48 Stunden Kultivierung ist die Synthese vollständiger Virionen durch spezielle Untersuchungsmethoden nachweisbar.

Die Konstruktion von pHBVΔC erfolgte durch Austausch der Aminosäure 38 des Core-Proteins innerhalb des Plasmids pHBV, so dass ein Stopp-Codon (TAA) entstand. Zur Kontrolle der Core-defizienten Mutante wurde ihr Expressionsverhalten in Huh7-Zellen überprüft. Da es sich in allen Versuchen um Kotransfektionen handelt, wurde hier das Plasmid pHBVΔC zu gleichen Teilen mit einer unspezifischen Kontroll-DNA (Mock)

verwendet. Diese Zellen wurden nach 48 Stunden aufgearbeitet, und das Zelllysate im Western-Blot hinsichtlich einer Core-Expression überprüft. Der Vergleich erfolgte mit Zellen, die mit dem Wildtyp HBV-Replikon (pHBV) + Mock, sowie mit pHBV Δ C + pMK.C kotransfiziert waren. Wie Abb.14 zeigt, ist die Expression von Core bei der Core-defizienten Mutante aufgehoben, was auch die Spezifität des hier eingesetzten Core-Antikörpers verdeutlicht, der in der Spur des Core-defizienten Vektors keine Bande hervorbringt. In den Kontrollspuren mit WT-Core und dem WT-HBV-Replikon färbt der Antikörper jedoch ganz deutlich die Core-Banden bei ihrem Molekulargewicht von 21 kDa.

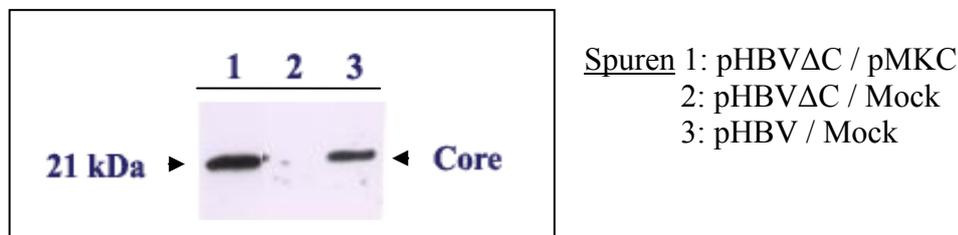


Abb. 14: Überprüfung der Core-defizienten Mutante

Zur Überprüfung der Core-defizienten Mutante wurde pHBV Δ C in Leberzellen transfiziert. Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE, Western-Blot und einem spezifischen Core-Antikörper auf Core-Expression getestet. Um einen direkten Vergleich mit Core-exprimierenden Zellen zu sehen, wurden Zelllysate von pHBV-transfizierten Zellen und von Zellen, die mit pHBV Δ C und dem WT-Core-Plasmid kotransfiziert waren, aufgetragen.

3.1 Untersuchungen des PPAY-Motivs von HBV-Core

Das PPxY-Motiv spielt bei vielen RNA-Viren eine wichtige Rolle als Late-Domäne und fungiert als Interaktions-Partner von Nedd4 (Freed, 2003). Das HBV-Core-Protein trägt an Position 129-132 der Aminosäure-Sequenz ein identisches Motiv, weshalb mit Hilfe von Mutationen innerhalb dieser Sequenz überprüft werden sollte, ob es auch bei HBV eine Rolle in der Virus-Morphogenese übernimmt. Dazu wurden verschiedene Mutagenesen

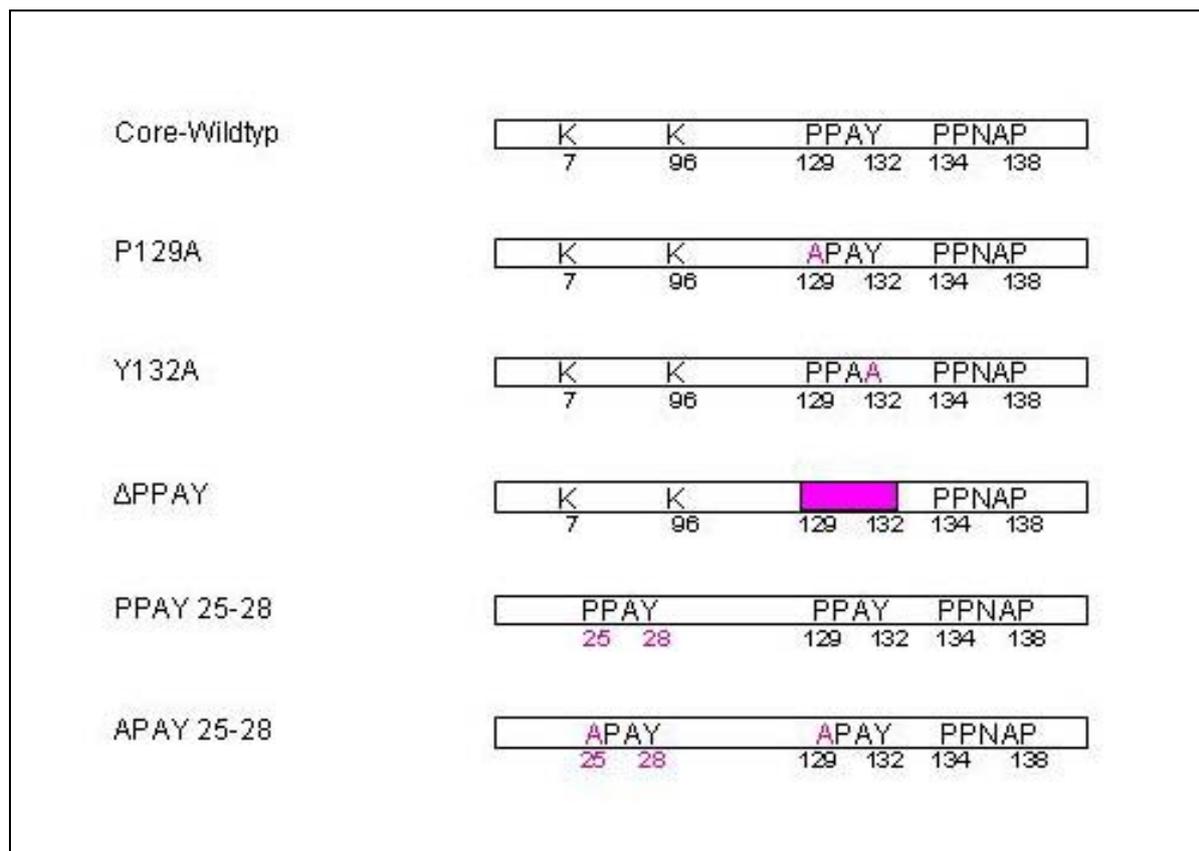


Abb. 15: Schematische Darstellung der Core-Mutanten

Die schematische Darstellung zeigt die Position des PPAY-Motivs im Wildtyp Core-Protein und in den generierten Mutanten. Rosa markiert ist die jeweils ausgetauschte Aminosäure. Die Ziffern bezeichnen die Position innerhalb der Aminosäuresequenz des Core-Proteins.

Bei den Mutanten PPAY 25-28 und APAY 25-28 wurde zur besseren Übersicht auf die Darstellung der Lysine an den Positionen 7 und 96 verzichtet.

durchgeführt: die unpolaren und aliphatischen Aminosäuren P129 (P129A) und Y132 (Y132A) wurden jeweils durch das ebenfalls unpolare, aliphatische Alanin substituiert. Es wurde Alanin als Substituent gewählt, da es mit seiner Methylgruppen-Seitenkette eine sehr neutrale Position hinsichtlich der Bindung zu anderen Aminosäuren einnehmen kann. Um die Auswirkung des Motivs in seiner Gesamtheit zu überprüfen, wurde es komplett deletiert (Δ PPAY). Zusätzliche konstruierten wir ein Motiv PPAY an Position 25-28 (PPAY 25-28). Diese Region liegt einerseits auf der Oberfläche des Kapsids, andererseits wurde von der Arbeitsgruppe um Volker Bruss gezeigt, dass es trotz Mutationen in dieser Region zu einer vollständigen Virus-Bildung kommen kann (Koschel et al., 1999, Ponsel und Bruss, 2002). Diese Mutante wurde dann als Ausgang für die Mutante

APAY 25-28 genutzt, die somit zweimal das veränderte Motiv trug, an der ursprünglichen Position 129-132 und an Position 25-28 (APAY 25-28). Schematisch sind die Mutanten in Abb.15 dargestellt. Das Motiv innerhalb des Core-Dimers wird in Abb.16 gezeigt. Es basiert auf den Strukturanalysen von Wynne und Crowther (Wynne et al., 1999) und wurde mit dem MMDB (Molecular Modeling DataBase)-Structure Summary von NCBI konzipiert.

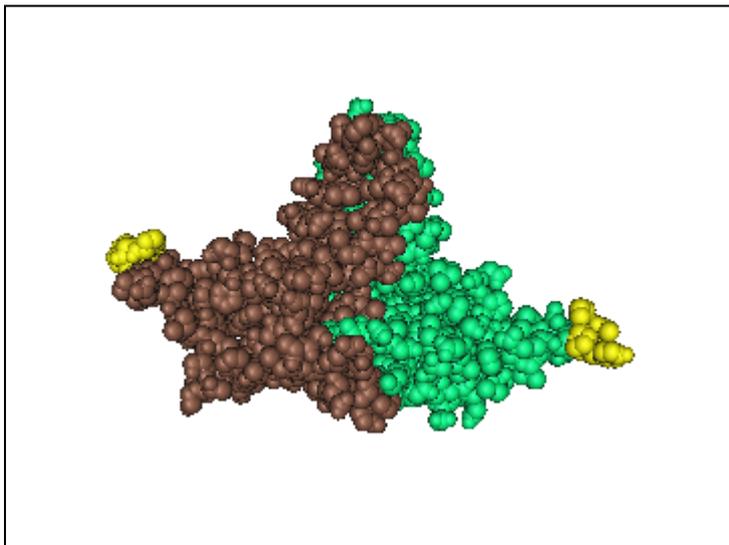


Abb. 16: Das PPAY-Motiv innerhalb eines Core-Dimers
Dargestellt sind zwei Core-Monomere (grün und braun), die sich zu einem Dimer zusammen lagern. Diese 3D-Ansicht beruht auf Kryo-elektronen-Mikroskopie und auf Kristallstruktur-Analysen von Wynne et al. (1999). Das PPAY-Motiv (gelb) kommt C-terminal auf einer Prolinreichen Schleife zu liegen.

3.1.1 Die Expression der Mutationen im PPAY-Motiv des Core-Proteins

Um die Auswirkung der Mutationen auf die Synthese des Core-Proteins und dessen Stabilität zu kontrollieren, wurden die Mutanten P129A, Y132A, Δ PPAY, PPAY 25-28 und APAY 25-28 und WT-Core in Huh7-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden Zelllysate gewonnen und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und einem Antikörper gegen das Core-Protein untersucht.

Die Detektion im Western-Blot (Abb. 17) zeigt bei allen Core-Protein-Mutanten eine Expression. Die P129A-Mutante weist eine dem Wildtyp vergleichbare Core-Synthese auf, wohingegen die Y132A-Mutante zwar eine Core-Expression zeigt, jedoch mit erhöhter Laufgeschwindigkeit. Dies deutet auf ein verringertes Molekulargewicht hin und lässt sich auch bei

der Mutante Δ PPAY beobachten. Diese hatte dazu noch eine geringere Synthese-Quantität, was eventuell durch verminderte Stabilität zu erklären wäre. Allerdings ließe sich bei Δ PPAY das verminderte Molekulargewicht durch die Deletion des gesamten Motivs erläutern, wobei die Ursachen bei der Mutante Y132A unklar sind. Die Mutanten, bei welchen eine zusätzliche PPAY-Domäne eingefügt wurde (PPAY 25-28, APAY 25-28) zeigen ein etwas verändertes Laufmuster, da auf Höhe der Core-Lauffront von 21 kDa eine Doppelbande zu sehen ist. Allerdings ist bei beiden Mutanten die Core-Expression vorhanden.

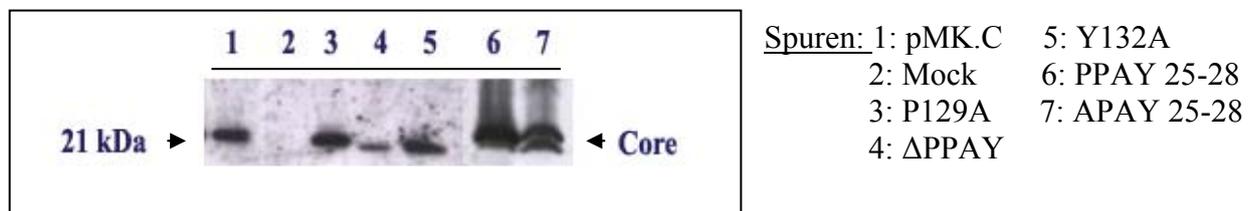


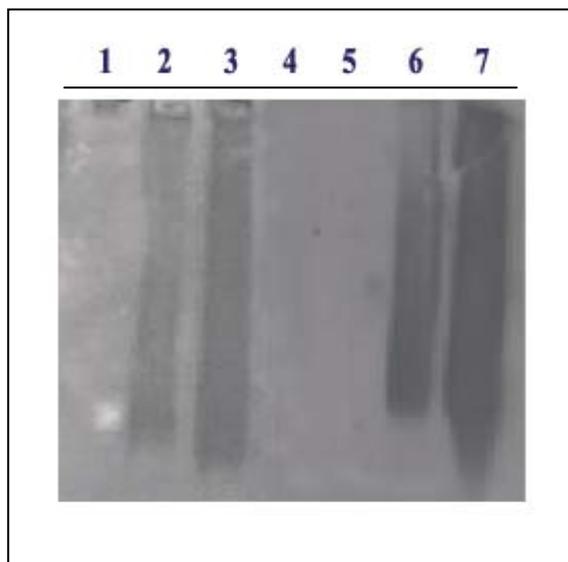
Abb. 17: Expression der Core- Mutanten des PPAY -Motivs

Zur Überprüfung der Mutanten auf die Stabilität von Core wurde das Gen des Core-Proteins (WT-Core), eine unspezifische DNA als Negativ-Kontrolle (Mock) und die Core-Mutanten P129A, Δ PPAY, Y132A, PPAY 25-28 und APAY 25-28 in Huh7-Zellen 48 Stunden exprimiert. Zellysate wurden durch ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western-Blot und einem Core-Antikörper auf Core-Synthese überprüft.

3.1.2 Die Kapsid-Bildungsfähigkeit der PPAY-Mutanten

Da der Core-Expressions-Nachweis bei allen Mutanten positiv war, wurde als weiterer Schritt die Kapsid-Bildungsfähigkeit überprüft. HBV-Kapside entstehen durch kugelförmige Polymerisierung des Core-Proteins. Zu Beginn lagern sich zwei Core-Monomere zu einem Dimer zusammen, wonach dann die Formation von 120 beziehungsweise 90 Dimeren zu den ikosaedrischen Kapsid-Strukturen erfolgt. Sie sind in der Lage, sich spontan und auch in Abwesenheit aller anderen HBV-Proteine zu bilden, können von Hepatozyten *in vitro* sezerniert werden und müssen nicht zwingend virus-spezifische Nukleinsäure beinhalten. Mit Hilfe des Kapsid-

Nachweises wurde die Fähigkeit der Mutanten des PPAY-Motivs auf Kapsid-Bildung getestet (Abb.18). Dazu wurden die Mutanten P129A, Δ PPAY, Y132A, PPAY 25-28 und APAY 25-28 mit pHBV Δ C in Huh7-Zellen kotransfiziert. Prinzipiell wäre dieser Assay auch durch alleinige Expression der Core-Proteine, d.h. auch außerhalb des Virus-Kontexts, möglich. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert, das Zelllysate auf einem Saccharose-Gradienten (20 % - 40 % Saccharose) ultrazentrifugiert und so die Kapside pelletiert. Dieses Pellet wurde gelöst und in einem nativen Agarosegel aufgetrennt. Das bedeutet, dass dem Gel kein denaturierendes SDS zugesetzt wurde, so dass auf diese Weise die Erhaltung der Kapsid-Struktur gewährleistet ist. Dadurch können die Proteine allerdings auch nicht mit einer negativen Ladung versehen werden. Diese Tatsache erklärt das etwas ungewöhnliche Laufverhalten der Proteine, die hier nicht mit einer deutlichen Front auf den Plus-Pol zulaufen, sondern unscharf aufgetrennt werden. Die Kapside wurden aus dem Gel mittels Western-Blot-Technik auf Nitrocellulose übertragen und mit einem Antikörper markiert, der speziell native Kapside erkennt.



pHBV Δ C +

Spuren: 1: Mock 5: Δ PPAY
 2: P129A 6: PPAY 25-28
 3: pMK.C 7: APAY 25-28
 4: Y132A

Abb. 18: Kapsid-Nachweis der PPAY-Mutanten

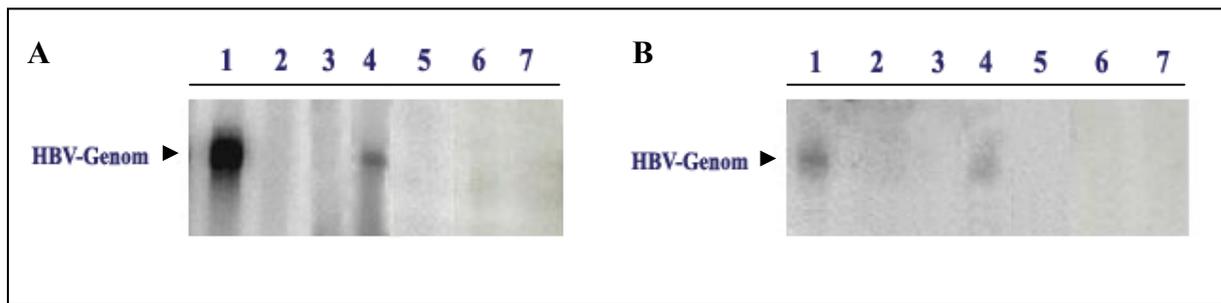
Zur Überprüfung der Kapsid-Bildung wurden Huh7-Zellen mit WT-Core, einer Negativ-Kontrolle und den Core-Mutanten P129A, Δ PPAY, Y132A, PPAY 25-28 und APAY 25-28 mit pHBV Δ C kotransfiziert. Lysate dieser Zellen wurden auf einem 20%-40%igem Saccharose-Gradienten zentrifugiert, so

dass sich die Kapside im Pellet absetzten. Dieses wurde gelöst und mit Hilfe eines nativen Agarose-Gels, Western-Blot und einem für natives Core-Protein spezifischen Antikörper untersucht.

Der Nachweis zur Überprüfung der Kapsid-Bildungsfähigkeit der Mutanten P129A, Δ PPAY, Y132A, PPAY 25-28 und APAY 25-28 zeigt, dass bei einer Deletion des kompletten PPAY-Motivs, Core nicht mehr in der Lage ist, Kapside zu formieren. Auch bei Substitution der Aminosäure Tyrosin 132 ist die Kapsid-Bildung vollständig blockiert. Die weiteren Veränderungen innerhalb des PPAY-Motivs, P129A, PPAY 25-28 und APAY 25-28 zeigen keine Auswirkungen auf die Kapsid-Bildung. So kann dem Motiv PPAY und speziell dem Tyrosinrest 132 eine Funktion bei der Bildung von Kapsiden zugeordnet werden.

3.1.3 Die Rolle des PPAY-Motivs bei der Nukleokapsid- und Virus-Bildung

Die Reifung der HBV-DNA, also die reverse Transkription der pgRNA zu DNA, vollzieht sich innerhalb der Nukleokapside. Diese werden dann von den Hüllproteinen umschlossen, so dass reife Virionen aus der Zelle ausgeschleust werden. Der Einfluss des PPAY-Motivs auf die Nukleokapsid- und Virus-Bildung wurde mit Hilfe der endogenen Polymerase-Reaktion (EPR) untersucht. Es wurden wiederum die Core-Mutanten P129A, Δ PPAY, Y132A, PPAY 25-28 und APAY 25-28 oder das WT-Core zusammen mit der Core-defizienten HBV-DNA kotransfiziert. 72 Stunden später wurden mit einem Core-Antikörper Nukleokapside aus dem Zelllysat und mit Antikörpern gegen die S- und L-Hüllproteine Virionen aus dem Zellkultur-Überstand immunpräzipitiert. Diesen Immunpräzipitaten setzte man dann die Nukleotide dATP, dGTP und dTTP sowie ein radioaktiv markiertes [α -³²P] dCTP zu. Während der endogenen Polymerase-Reaktion, bei der die virale Polymerase das nur teilweise doppelsträngige HBV-Genom komplettiert, wurde radioaktives dCTP in das Virus-Genom eingebaut. Nach erfolgter EPR wurde die virale DNA isoliert und auf einem SDS-Agarose-Gel aufgetrennt. In diesem Gel konnte autoradiographisch die Nukleinsäure aus den Nukleokapsiden (Abb.19 A) und den Virionen (Abb.19 B) nachgewiesen werden.



pHBV Δ +

Spuren: 1: pMK.C 2: Mock 3: P129A 4: PPAY 25-28 5: APAY 25-28 6: Y132A 7: ΔPPAY

Abb. 19: Nukleokapsid- und Virus-Nachweis der PPAY-Mutanten

Die Mutanten des PPAY-Motivs wurden mit pHBV Δ C in Huh7-Zellen kotransfiziert. Aus dem Zelllysat wurden mit Core-spezifischem Antikörper Nukleokapside immunpräzipitiert. Die Virionen wurden mit Antikörpern gegen die S- und L-Hüllproteine aus dem Zellkulturüberstand isoliert. Diesen Präzipitaten wurde radioaktives dCTP zugesetzt, das in der endogenen Polymerase-Reaktion von der viralen Polymerase in das nur teilweise doppelsträngige HBV-Genom eingebaut wurde. Die so komplettierte HBV-DNA wurde isoliert und auf einem 1%igen SDS-Agarosegel aufgetrennt. Mittels Autoradiographie konnten Nukleokapside (A) und Virionen (B) detektiert werden.

Die endogene Polymerase-Reaktion der Zelllysate zeigt, dass das PPAY-Motiv auch bei der Nukleokapsid-Bildung eine entscheidende Rolle spielt. So resultieren fast alle Mutationen in Nukleokapsid-defizienten Phänotypen. Ausschließlich bei Zelllysaten der Mutante PPAY 25-28 sind Nukleokapside schwach detektierbar. Das fehlende Nukleokapsid-Bildungsvermögen der Mutanten P129A, ΔPPAY, Y132A und APAY 25-28 wirkt sich auch auf die Virus-Bildung aus, da die Synthese von Nukleokapsiden eine Voraussetzung der Virus-Bildung darstellt. Die EPR des Zellkultur-Überstands bestätigt diese Aussage (Abb. 19 B). Der Virus-Nachweis ist für die Mutanten P129A, ΔPPAY, Y132A und APAY 25-28 negativ. Nur die Mutante PPAY 25-28 zeigt, wie schon gemäß der Nukleokapsid-Bildung, auch für die Virus-Bildung ein positives Ergebnis. Somit ist sie die einzige PPAY-Mutante, die in ihrem morphologischen Verhalten dem Wildtyp vergleichbar ist, und Kapside, Nukleokapside und

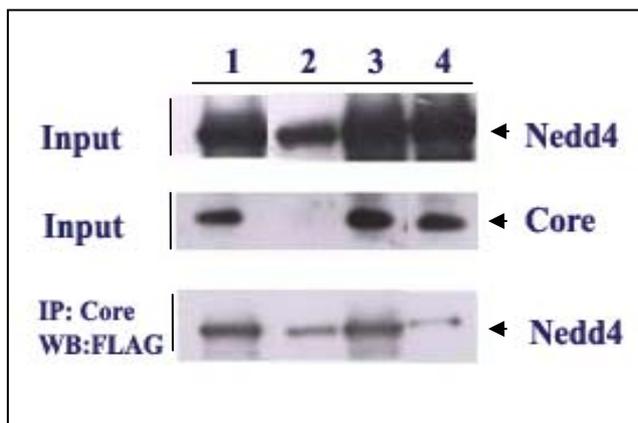
Virionen bildet. Die Mutanten Y132A und Δ PPAY sind schon für die Kapsid-Bildung defizient und somit nicht mehr in der Lage, die weiteren Schritte der Virus-Bildung zu vollziehen. Bei den beiden Mutanten P129A und APAY 25-28 war nach positiver Kapsid-Formation ein negativer Nachweis in Nukleokapsid-Bildung aufgetreten, so dass diese Mutationen eventuell die pgRNA-Bindung beeinflussen könnte.

3.1.4 Die Beteiligung des PPAY-Motivs an der Interaktion mit Nedd4

Nedd4 ist ein Mitglied der Familie der E3 Ubiquitin-Ligasen. Proteine der Nedd4-Familie findet man in Eukaryonten von der Hefe bis zu höher entwickelten Säugern. Sie sind an Prozessen beteiligt, die der Sortierung von Proteinen in den Endozytose-Signalweg dienlich sind, und dort speziell an der Markierung von Proteinen mit Ubiquitin. Bei vielen RNA-Viren konnten Interaktionen der am Ausschleusungsprozess beteiligten Virus-Proteine mit Nedd4 über das PPxY-Motiv beobachtet werden (Freed, 2002). So interagiert beispielsweise das gag-Protein des Rous Sarcoma Virus oder des T-Zell-Leukemia Virus Typ 1 mit Nedd4 (Kikonyogo et al., 2001, Bouamr et al., 2003). Die Frage, ob das PPAY-Motiv des Core-Proteins von HBV mit Nedd4 interagiert, wurde mit einem Interaktions-Assay untersucht. Dabei wurden WT-Core beziehungsweise die Mutanten P129A und Y132A in Huh7-Zellen transfiziert. Da uns kein Antikörper gegen das endogen in Huh7-Zellen vorkommende Nedd4 zur Verfügung stand, transfizierten wir zusätzlich mit humanem Nedd4, das N-terminal mit dem FLAG-Epitop markiert war. Die Markierung diente der Detektion dieses exogenen Nedd4 mit einem α -FLAG-Antikörper. Nach 48 Stunden Kultivierung wurden die Zellen lysiert, und mit Hilfe von Core-Antikörper-gekoppelten Protein A-Sepharose-Beads wurden die Core-Proteine zusammen mit möglicherweise assoziierten Proteinen immunpräzipitiert. Diese Präzipitate wurden mittels SDS-Gel, Western-

Blot und einem α -FLAG-Antikörper auf Nedd4-Interaktion geprüft (Abb. 20).

Hiermit konnte in der Tat eine Interaktion zwischen dem etwa 115 kDa großen Nedd4 und dem WT-Core-Protein nachgewiesen werden. Auch die Punktmutante P129A kann noch eine Verbindung zu Nedd4 herstellen. Ausschlaggebend für die Interaktion zwischen Nedd4 und Core scheint aber das Tyrosin an Position 132 zu sein. Nach dessen Austausch gegen Alanin ist die Interaktion mit Nedd4 deutlich verringert, beziehungsweise ist das Signal, bezogen auf das Niveau der Negativkontrolle, ganz aufgehoben. So scheint die Sequenz PPAY wichtig für die Wechselwirkungen zwischen Core und der Ub-Ligase Nedd4 zu sein.



Nedd4 +
 Spuren: 1: pMK.C 3: P129A
 2: Mock 4: Y132A

Abb. 20: Nedd4-Interaktion mit HBV-Core und den Mutanten des PPAY-Motivs

Die Beziehung zwischen Nedd4 und dem Core-Protein wurde mittels Interaktions-Assay untersucht. Die Mutanten P129A,

Y132A und WT-Core wurden mit FLAG-markiertem Nedd4 in Huh7-Zellen kotransfiziert. Core-Protein wurde mit Protein A-Sepharose-Beads gekoppeltem Core-Antikörper immunpräzipitiert und dieses Präzipitat mittels SDS-PAGE, Western-Blot und einem FLAG-Antikörper auf koimmunpräzipitiertes Nedd4 untersucht. Der jeweilige Input von Nedd4 beziehungsweise von Core zeigt die Menge der eingesetzten Proteine, mit welcher der Interaktions-Nachweis erbracht wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das PPAY-Motiv eine zentrale Rolle in der Morphogenese von Hepatitis-B Viren spielt. Sowohl die Deletion des gesamten Motivs, als auch der Austausch einzelner Aminosäuren, wie Prolin 129 und Tyrosin 132, wirken sich negativ auf die Reproduktion von HBV und die Interaktion seiner Komponenten mit Wirtszell-Faktoren aus. So ist das Ergebnis der Substitution von Prolin 129 mit Alanin eine Mutante, die zwar noch die Fähigkeit besitzt, Kapside zu bilden, jedoch

defizient in Nukleokapsid- und Virus-Bildung ist. Sie zeigt jedoch eine dem Wildtyp vergleichbare Interaktion mit der E3-Ub-Ligase Nedd4. Diese Interaktion ist bei der Mutante Y132A fast aufgehoben, allerdings ist diese Mutante auch in allen anderen Schritten der HBV-Morphogenese negativ, bildet also keine Kapside, Nukleokapside oder Virionen.

3.2 Die Rolle des PPNAP-Motivs

Die Domäne PPNAP, die in der AS-Sequenz des HBV-Core-Proteins an Position 134-138 liegt (Abb. 21), weist Ähnlichkeiten mit der im Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) charakterisierten Late-Domäne PSAP auf (Martin-Serrano, 2001). Durch Mutations-Analysen soll ihre Funktion im Core-Protein mit den gleichen Methoden untersucht werden, die auch zur Analyse der Funktion des PPAY-Motivs genutzt wurden.

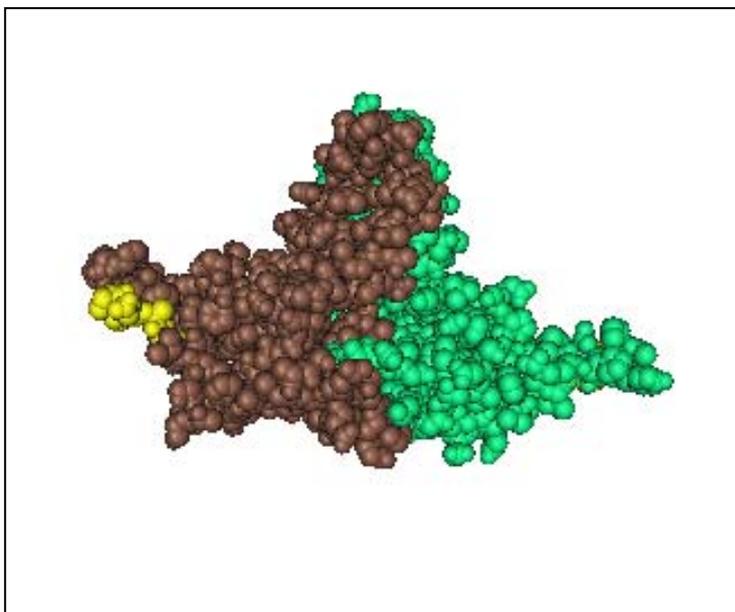


Abb. 21: Darstellung des PPNAP-Motivs in einem dreidimensionalen Core-Dimer

Die Monomere des Core-Proteins sind in braun und grün dargestellt, das PPNAP-Motiv ist gelb markiert (verdeckt auf dem grünen Monomer).

Es wurden folgende Mutanten konstruiert: die beiden Proline 134 und 135 wurden durch Alanin ersetzt (PP134,135AA) und das Alanin an Position 137 zu Glycin mutiert (A137G). Als Substituenten wurde Alanin beziehungsweise Glycin gewählt, also Aminosäuren, die gegenüber anderen Aminosäuren ein möglichst neutrales Bindungsverhalten aufweisen. Um eine eventuelle Optimierung des Motivs in die bei mehreren Retroviren beschriebene L-Domäne PS/TAP zu erzielen, wurde das Asparagin 136 zu Threonin (N136T) mutiert (Abb. 22).

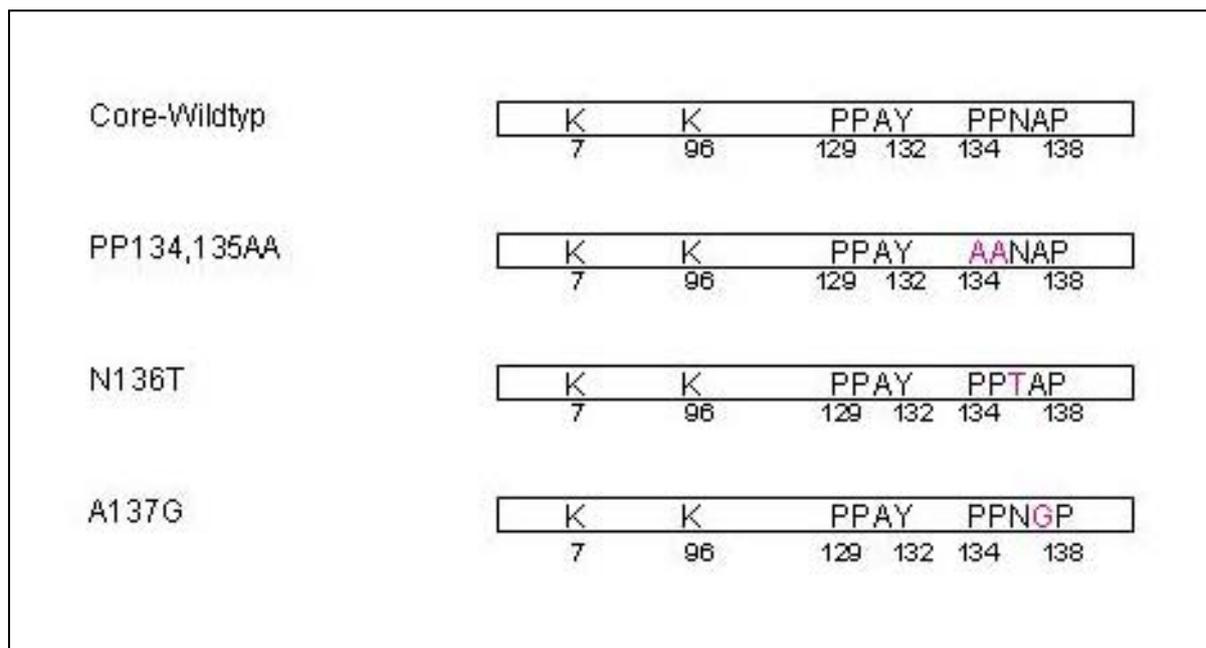


Abb. 22: Darstellung der Mutanten des PPNAP-Motivs

Diese Abbildung zeigt die Mutationen des PPNAP-Motivs. Die geänderten Aminosäuren sind rosa markiert und die jeweiligen Positionen beziffert.

3.2.1 Die Expression der PPANP-Mutanten

Wie bei den Mutanten zu dem PPAY-Motiv wurde auch hier die Auswirkungen der Mutagenese auf das Expressionsverhalten überprüft (Abb. 23) und es zeigte sich, dass die Mutanten N136T und A137G auf dem Niveau der Expression des WT-Core Proteins detektiert werden können. PP134,135AA läuft etwas schneller als Wildtyp-Core, zeigt aber eine vergleichbare Quantität. Da alle PPNAP-Mutanten effizient exprimiert wurden, können mit ihnen die weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

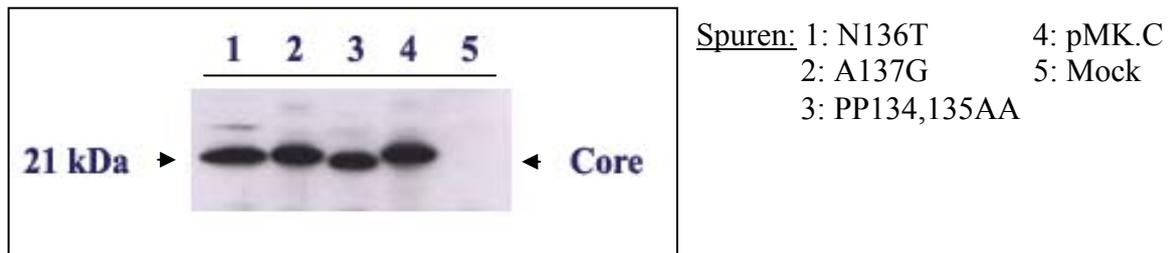


Abb. 23: Expression der Core-Mutanten des PPNAP-Motivs

Dargestellt ist das Expressions-Niveau der Mutanten PP134,135AA, N136T und A137G verglichen mit dem des Core-Wildtyps beziehungsweise einer Negativ-Kontrolle.

3.2.2 Die Fähigkeit der PPNAP-Mutanten zur Kapsid-Bildung

Welche Rolle das PPNAP-Motiv bei der Zusammenlagerung der Core-Proteine zu Kapsiden spielt, wurde mit Hilfe des Kapsid-Nachweises überprüft (Abb. 24). Die Durchführung dieses Nachweises erfolgte wie schon in 3.1.2 beschrieben.

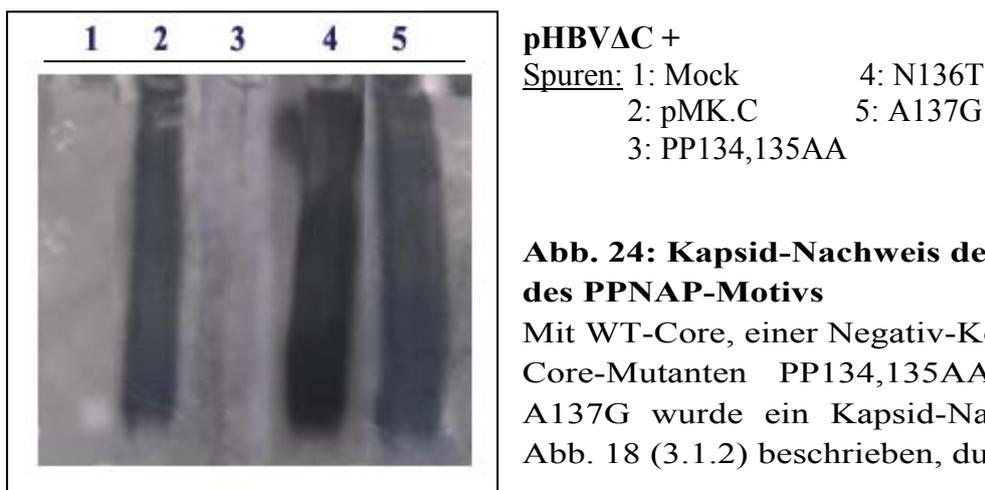


Abb. 24: Kapsid-Nachweis der Mutanten des PPNAP-Motivs

Mit WT-Core, einer Negativ-Kontrolle und den Core-Mutanten PP134,135AA, N136T und A137G wurde ein Kapsid-Nachweis, wie in Abb. 18 (3.1.2) beschrieben, durchgeführt.

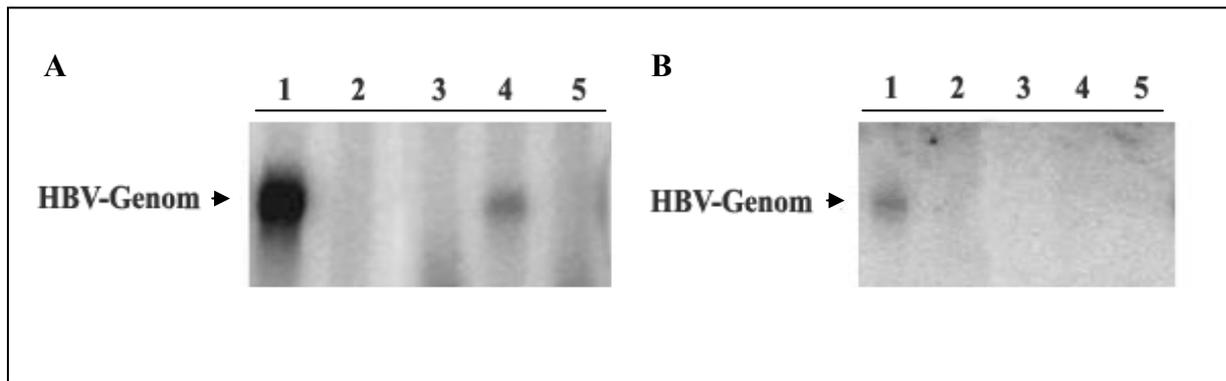
Auch bei diesem Motiv zeigt sich, dass es für die Kapsid-Formation notwendige Aminosäuren besitzt. So kommt es bei Mutation der Proline

134 und 135 zu einer nahezu aufgehobenen Kapsid-Bildung. Werden die Aminosäuren N136 beziehungsweise A137 verändert, ist die Kapsid-Bildung nicht beeinträchtigt. So scheinen die Proline 134 und 135 des PPNAP-Motivs für die Kapsid-Bildung essentiell zu sein, wohingegen die Substitution von Alanin 137 zu Glycin keinen derartigen Effekt bewirkt. Auch die mutmaßliche Optimierung des Motivs zu PTAP lässt in diesem Assay keine verändernde Wirkung erkennen. Da Core-Partikel eine Voraussetzung der Nukleokapsid-Bildung und diese wiederum notwendig für die Bildung des kompletten Virions sind, kann davon ausgegangen werden, dass nach Änderungen des PPNAP-Motivs auch Nukleokapsid- und Virus-Bildung besonders bei der Mutation PP134,135AA, nicht mehr dem Wildtyp entsprechen. Dies wurde mittels EPR untersucht (Abb. 25).

3.2.3 Die Rolle des PPNAP-Motivs in der Nukleokapsid- und Virus-Bildung

Die Abhängigkeit der Nukleokapsid- und Virus-Bildung von dem PPNAP-Motiv wurde mit Hilfe der EPR überprüft. Dieser spezifische Nachweis wurde wie in 3.1.3 beschrieben durchgeführt.

Wie in Abb. 25 dargestellt, zeigen die Ergebnisse der EPR, dass Veränderungen der Aminosäure-Sequenz innerhalb des PPNAP-Motivs sich sowohl auf die Nukleokapsid- (A) als auch auf die Virus-Bildung (B) negativ auswirken. Da der Austausch der Proline 134 und 135 schon die Kapsid-Bildung blockierte, war es voraussehbar, dass die Nukleokapsid- und Virus-Bildung bei dieser Mutante negativ ist, was sich nun mittels EPR bestätigen lässt.



pHBV Δ +

Spuren: 1: pMK.C 2: Mock 3: PP134,135AA 4: A137G 5: N136T

Abb. 25: Nukleokapsid- und Virus-Nachweis der Mutanten des PPNAP-Motivs

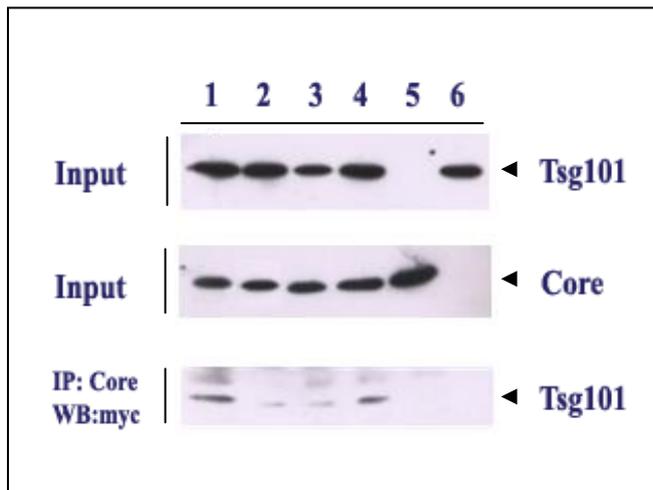
Hier dargestellt ist das Ergebnis der EPR der Zelllysate und Zellkulturüberstände von Huh7-Zellen, die mit den Mutanten des PPNAP-Motivs und pHBV Δ C kotransfiziert waren. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben, so dass spezifisch Nukleokapside (A) und Virionen (B) zu detektieren sind.

Jedoch ist auch die Punktmutante N136T, welche noch eine Kapsid-Formation zulässt, in Nukleokapsid- und Virus-Synthese defizient. Einzig die Mutante A137G ist positiv in Nukleokapsid-Bildung, allerdings ist auch sie nicht mehr fähig, Virionen zu synthetisieren. Es zeigt sich also, dass das PPNAP-Motiv eine signifikante Funktion im Replikationszyklus von HBV übernimmt. So sind die Proline 134 und 135 schon für die Kapsid-Bildung unerlässlich. Auch die vermeintliche Optimierung des Motivs durch Tausch des Asparagins zu Threonin scheitert auf der Stufe der Nukleokapsid-Bildung, so dass dem Asparagin doch eine notwendige Rolle zugesprochen werden muss. Bemerkenswert ist die Mutation des Alanins 137, denn diese ist zwar für Kapsid- und Nukleokapsid-Bildung positiv, versagt jedoch in der Synthese von Virionen. Eventuell ist diese Aminosäure an der Vermittlung der Umhüllung des Nukleokapsids oder an der Ausschleusung der fertigen Virionen aus der Zelle beteiligt.

3.2.4 Der Einfluss des PPNAP-Motivs auf Tsg101-Interaktion

Tsg101 (tumor susceptibility gene 101) ist ein zytosolisches Protein, es findet sich in fast allen eukaryontischen Zelltypen und hat ein Molekulargewicht von etwa 44 kDa. Es spielt eine Rolle bei vesikulären Transportprozessen und bei der Sortierung von zu endozytierendem Protein-Material, beispielsweise dem EGF-Rezeptor. Des Weiteren scheint es auch an Zellwachstum und -differenzierung beteiligt zu sein. Ferner ist bekannt, dass Tsg101 über die Bindung an die Late-Domäne PS/TAP am Ausschleusungsprozess vieler Viren beteiligt ist. Diese L-Domäne findet sich beispielsweise auf den gag-Proteinen von HIV-1 und von HTLV-1 oder auf dem Matrixprotein VP40 des Ebola Virus. (Babst et al., 2000, Pornillos et al., 2002, Timmins et al., 2003). Mittels Tsg101-Interaktions-Assay wurde überprüft, ob das PPNAP-Motiv des HBV-Core-Proteins auch als Tsg101-Interaktionspartner in Frage kommt. Dazu wurden WT-Core und die Mutanten PP134,135AA; A137G und N136T zusammen mit myc-markiertem Tsg101 in Huh7-Zellen für 48 Stunden exprimiert. Protein A-Agarose Beads, mit Antikörpern gegen Core beschichtet, sorgten für die Fällung der Core-Proteine. Im SDS-Page und Western-Blot wurden diese Immunpräzipitate mit Hilfe eines α -myc-Antikörpers auf Tsg101-Wechselwirkung geprüft (Abb. 26).

Mit diesem Interaktions-Assay konnten wir zeigen, dass das Core-Protein des Hepatitis-B Virus mit Tsg101 interagiert. Die Proline 134 und 135, sowie das Asparagin 136 scheinen bei dieser Wechselwirkung eine Rolle zu spielen, denn nach Substitution dieser Aminosäuren ist die Bindung von Tsg101 stark verringert. Dagegen weist die Mutante A137G eine dem Wildtyp vergleichbare Tsg101-Interaktion auf. In diesem Falle scheint Alanin 137 gut durch Glycin ersetzbar zu sein, schließlich besitzen beide Aminosäuren unpolare und aliphatische Seitenketten und unterscheiden sich lediglich um eine Methylgruppe. Diese muss jedoch eine Funktion in der Virus-Bildung ausüben, denn obwohl die Mutante für Tsg101-Wechselwirkung, Kapsid- und Nukleokapsid-Nachweis positiv ist, ist sie doch defizient in der Bildung von Virionen.



Tsg101 +

Spuren: 1: pMK.C 4: A137G
 2: PP134,135AA 6: Mock
 3: N136T

Spur 5: pMK.C + Mock

Abb. 26: Tsg101-Interaktion mit HBV-Core und den Mutanten des PPNAP-Motivs

Plasmide, kodierend für die

Mutanten PP134,135AA, A137G, N136T, das WT-Core Protein bzw. einer Negativ-Kontrolle wurden mit dem myc-markierten Tsg101-Gen in Huh7-Zellen kotransfiziert. Aus Lysaten dieser Zellen wurde mit Protein A-Agarose-Beads, gekoppelt an Core-Antikörper, Core immunpräzipitiert. Diese Präzipitate wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit einem Antikörper gegen myc auf Wechselwirkung zwischen Tsg101 und dem Core-Protein untersucht. Ebenfalls abgebildet ist der Input an Tsg101 und Core-Protein, der bei der Immunpräzipitation dieses Assays eingesetzt wurde.

3.3 Die Bedeutung der Lysine 7 und 96

Das 8 kDa große Ubiquitin dient der Modifizierung von Proteinen. Wie der Name andeutet, kommt es ubiquitär in allen Zellen vor und übernimmt zahlreiche Funktionen. Es kann als Monomer oder als Polymer kovalent an Lysinreste innerhalb eines Zielproteins gebunden werden (Katzmann, 2001). Die Anheftung von Lys-48-vernetzten Polymeren markiert meist Proteine zur Degradierung in Proteasomen (Haglund und Dikic). Wird dagegen ein Protein mit einem Ub-Monomer markiert, führt dies nicht zum Abbau, sondern wird als Signalgeber bei vielen verschiedenen Schritten verwendet, wie beispielsweise Regulation der Genexpression oder DNA-Reparatur. Ferner ist die Monoubiquitinierung der Signalgeber für die Sortierung von Proteinen in MVBs und beteiligt sich darüber am Sprossungsprozess vieler Retroviren (Martindale, 2003). Auch im Core-Protein sind potentielle Stellen zur Ubiquitinierung zu finden, das Lysin an Position 7 und das an Position 96. Durch Substitution der beiden Lysine, sowohl einzeln (K7A; K96A), als auch gemeinsam (KK7,96AA) soll aufgeklärt werden, ob diese Aminosäuren für die Reproduktion von HBV bedeutsam sind. In Abb. 27 ist die Position der Lysine innerhalb des Core-Dimers dargestellt und Abb. 28 zeigt die dazugehörigen Mutanten.

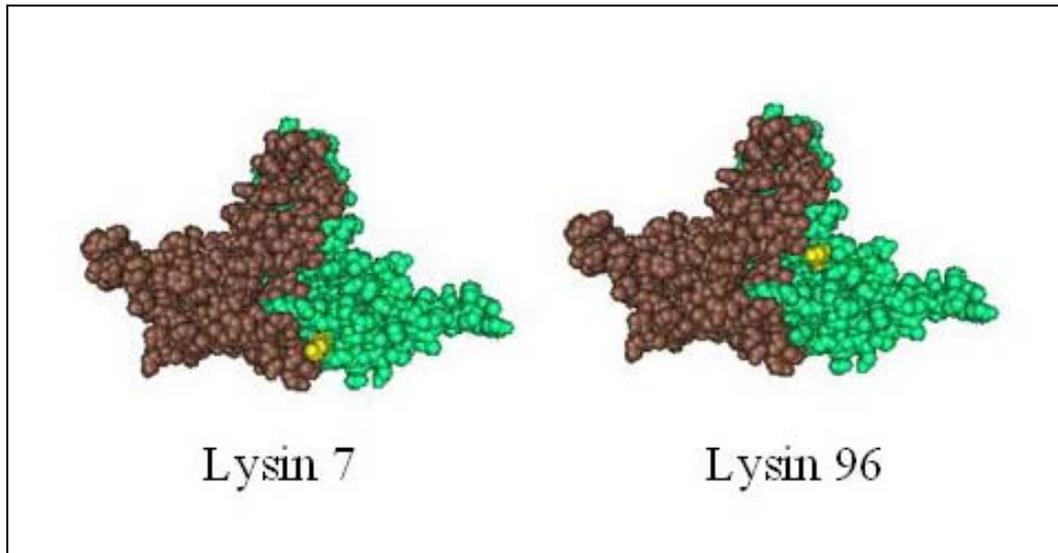


Abb. 27: Lysin 7 und Lysin 96 in einem 3D-Modell eines HBV-Core-Dimers
Die beiden Core-Dimere (Monomere jeweils in grün und braun) zeigen links das Lysin 7 (gelb) und rechts das Lysin 96 (gelb).

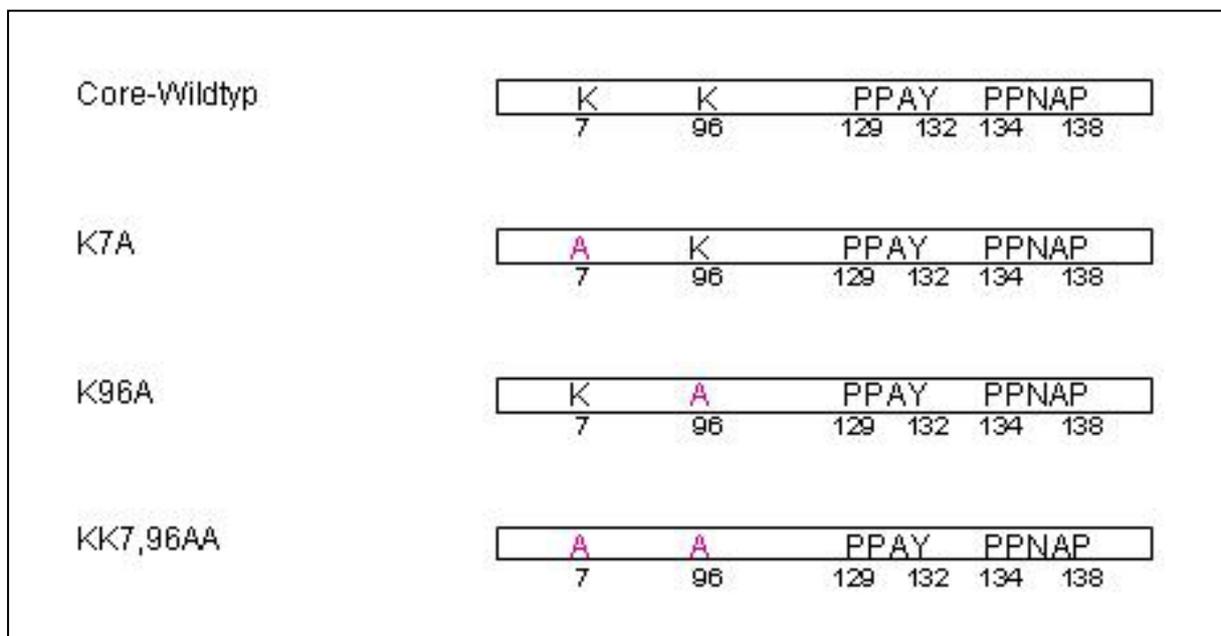


Abb. 28: Lysin-Mutanten in der AS-Sequenz des HBV-Core-Proteins
Die Darstellung zeigt die Lysin-Mutanten (rosa) des Core-Proteins, wobei die Ziffern die jeweils substituierten AS markieren.

3.3.1 Das Expressions-Niveau der Lysin-Mutanten

Wie schon bei den vorangegangenen Mutanten wurden auch die Lysin-Mutanten zuerst auf ihre Expression getestet. Bei den Mutanten K7A und K96A kann eine Expression nachgewiesen werden, die dem Niveau des WT-Core-Proteins entspricht (Abb. 29). Die Doppelmutante KK7,96AA jedoch zeigt eine etwas schwächere Ausprägung und ist als Doppelbande erkennbar. Es scheint, als sei diese Mutante in ihrer Stabilität beeinträchtigt. Dennoch ist auch hier die Expression ausreichend, um mit den Mutanten die nachfolgenden Versuch zur Virus-Morphogenese durchzuführen.

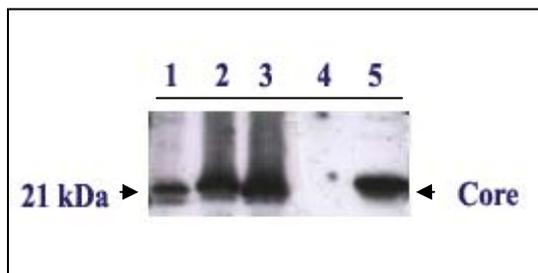


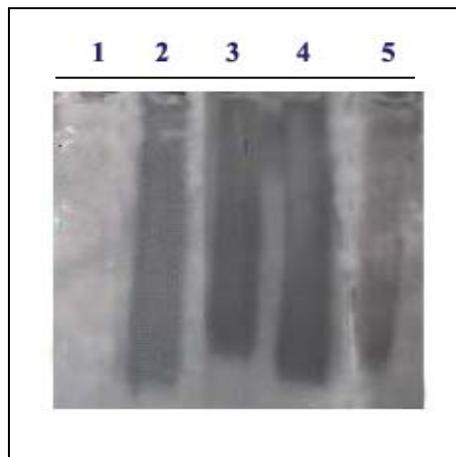
Abb. 29: Expression des Core-Proteins der Lysin-Mutanten

Dargestellt sind die Ergebnisse des Expressions-Assays der Lysin-Mutanten KK7/96AA, K96A und K7A.

Spuren: 1: KK7,96AA 2: K96A 3: K7A 4: Mock 5: pMK.C

3.3.2 Die Kapsid-Bildung der Lysin-Mutanten

Der Kapsid-Nachweis der Lysin-Mutanten wurde wie oben beschrieben durchgeführt (3.1.2), wobei die Überprüfung aller Lysin-Mutanten zu positiven Ergebnissen führte (Abb. 30). Allerdings ist die Quantität der Kapside für die Mutante KK7,96AA auch hier wieder deutlich vermindert, was sich durch die schon verringerte Core-Expression erklären lässt.



pHBV Δ C +

Spuren: 1: Mock 4: K96A
 2: pMK.C 5: KK7,96AA
 3: K7A

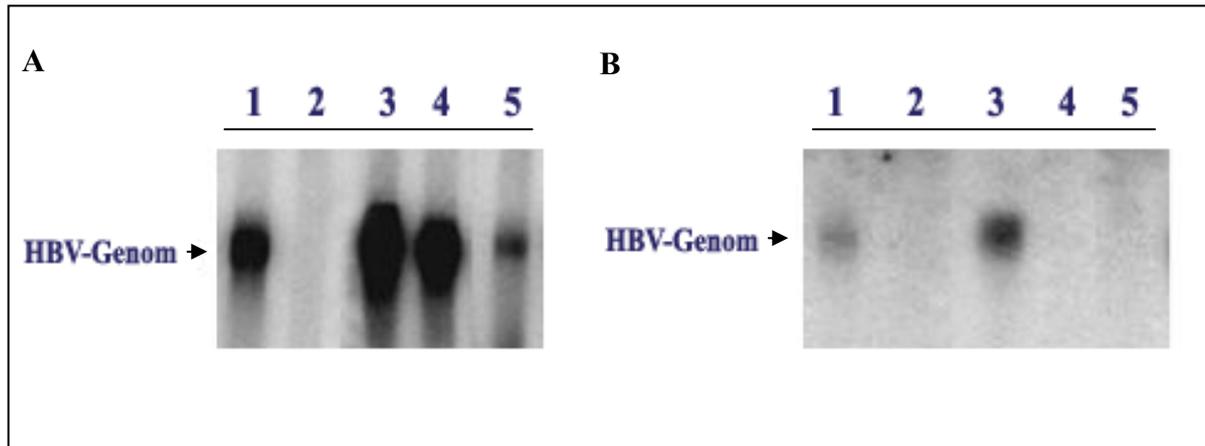
Abb. 30: Kapsid-Nachweis der Core-Mutanten

Der Kapsid-Nachweis der Lysin-Mutanten KK7,96AA, K96A und K7A wurde wie für das PPAY-Motiv beschrieben durchgeführt (3.1.2).

3.3.3 Auswirkungen der Lysin-Mutanten auf die Nukleokapsid- und Virus-Bildung

Wie sich die Substitution der potentiellen Ubiquitinierungsstellen auf Nukleokapsid- und Virus-Bildung auswirkt, wurde wiederum durch den EPR-Test überprüft. Dieser radioaktive Nachweis wurde bereits bei der Analyse des PPAY-Motivs ausführlich beschrieben (3.1.3) und hier analog dazu mit den Mutanten KK7,96AA, K96A und K7A durchgeführt (Abb.31).

Der radioaktive Nachweis des HBV-Genoms in Zellysaten von Huh7-Zellen die mit pHBV Δ C und K7A, K96A beziehungsweise KK7,96AA kotransfiziert waren, zeigt, dass die Mutationen der Lysine des Core-Proteins keine negativen Auswirkungen auf die Nukleokapsid-Formation haben. Auch hier zeigt wieder die Mutante KK7,96AA eine geringere Nukleokapsid-Synthese. Betrachtet man dazu die Untersuchungen zur Virus-Bildung der Lysin-Mutanten, zeigt sich eine absolute Notwendigkeit des Lysins 96. Denn im Falle dieser Substitution ist, trotz intakter Kapsid- und Nukleokapsid-Bildung, die Morphogenese kompletter Viruspartikel vollständig unterbunden.



pHBV Δ C +

Spuren: 1: pMK.C 2: Mock 3: K7A 4: K96A 5: KK7,96AA

Abb. 31: Die Lysin-Mutanten im Nukleokapsid- und Virus-Nachweis

Hier dargestellt ist das Ergebnis der EPR von Zelllysaten und Zellkulturüberständen der Huh7-Zellen, die mit den Lysin-Mutanten und pHBV Δ C kotransfiziert waren. Nukleokapside (A) waren bei allen Mutanten detektierbar, Virionen (B) dagegen nur noch bei der Mutante K7A.

Dies wirkt sich auch auf die Doppelmutante KK7,96AA aus, die demzufolge defizient in Virus-Bildung ist. Der Austausch des Lysins 7 dagegen hat keine negativen Effekte auf die Virus-Bildung. Der scheinbare quantitative Anstieg der Virionen-Produktion lässt sich allerdings zurückführen auf die schon sehr starke Nukleokapsid-Produktion. So scheint die putative Ubiquitinylierungsstelle Lysin 96 eine bedeutsame Rolle zu übernehmen. Allerdings dürfte auch dem Lysin 7 eine kompensatorische Bedeutung zukommen. Denn mutiert man K96 alleine, ist diese Mutante noch fähig, äquivalente Mengen Kapsid zu produzieren, eventuell durch die Hilfe von K7. Fehlt K7, wie bei der Doppelmutante KK7,96AA, ist die synthetisierte Kapsidmenge reduziert. Dies trifft auch bei der Nukleokapsid-Bildung zu: hier zeigt KK7,96AA reduzierte Syntheseraten. Bei der Bildung von Virionen genügt K7 nicht mehr um den K96-Verlust auszugleichen und sowohl K96A als auch KK7,96AA zeigen sich defizient in Virus-Bildung. Allerdings ist K96 fähig, den Verlust bei der Mutante K7A in allen Bereichen auszugleichen, was seine Notwendigkeit innerhalb des Core-Proteins unterstreicht.

3.4 Zusammenfassung der wichtigsten Mutanten

Eine Zusammenfassung der Untersuchungen zur Kapsid-, Nukleokapsid- und Virus-Bildung und Interaktions-Assays der wichtigsten Mutanten ist in Tab.1 dargestellt.

	P129A	Y132A	PP134, 135AA	N136T	A137G	K7A	K96A	KK7, 96AA	WT
Kapside	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Nukleo- kapside	-	-	-	-	+	+	+	wenig	+
Viren	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Nedd4- Interaktion	+	-	/	/	/	/	/	/	+
Tsg101- Interaktion	/	/	wenig	wenig	+	/	/	/	+

Tab.1: Übersicht der Ergebnisse der wichtigsten Mutanten

Diese Tabelle fasst die Versuche, die zur Morphogenese des HBV mit dem WT-Core und den Mutanten P129A, Y132A, PP134,135AA, N136A, A137G, K7A, K96A und KK7,96AA durchgeführt wurden, zusammen. Die Spalten listen die verwendeten Mutanten und den Wildtyp des HBV-Core-Proteins auf und in den Zeilen befindet sich der jeweilig durchgeführte Versuch. „+“ steht für ein positives Ergebnis, „-“ für einen negativen Nachweis, „/“ besagt, dass der Versuch bei dieser Mutante nicht durchgeführt wurde.

Es zeigt sich, dass insbesondere das Tyrosin 132 des PPAY-Motivs und die Prolinreste des Motivs PPNAP für die Virus-Morphogenese wichtig sind. Denn bei Substitution dieser Aminosäuren wird die Virus-Bildung schon im Stadium der Kapsid-Bildung unterbrochen. Betrachtet man die Synthese von Nukleokapsiden, ist diese bei fast allen von uns durchgeführten Mutationen des PPAY- und des PPNAP-Motivs unterbrochen, nur die Aminosäure A137G ist substituierbar und bildet nachweisbare Mengen Nukleokapside. Betrachtet man die Virus-Bildung, wäre die einzige L-Domänen-Mutante, bei welcher noch Virionen zu erwarten wären, die A137G-Mutante. Allerdings ist auch sie in diesem letzten Schritt der HBV-

Morphologie negativ. Wodurch die Notwendigkeit der von uns untersuchten Motive PPAY und PPNAP verdeutlicht wäre.

Bei den Untersuchungen der potentiellen Ubiquitinierungsstellen, Lysine 7 und 96, zeigt sich deren absolute Notwendigkeit etwa ab der Stufe der Nukleokapside, denn die Doppelmutante KK7,96AA synthetisiert noch geringe Mengen Kapside und Nukleokapside, aber keine Virionen mehr. Betrachtet man die drei Mutanten gemeinsam, wird eine generelle Bedeutung des Lysins 96 sichtbar. Denn K96 kann bei Verlust von K7 einen vollkommenen Ersatz für diese Aminosäure in der kompletten Virus-Morphogenese bewirken und es können bei K7A deutliche Mengen an Kapsiden, Nukleokapsiden und Virionen detektiert werden. Das Lysin 96 selbst kann in der HBV-Morphogenese bis einschließlich Nukleokapsid-Bildung durch K7 kompensiert werden. Allerdings nicht mehr bei dem darauf folgenden Schritt der Virus-Synthese, die dann bei K96A negativ ist.

3.4 Die Lokalisation des Kapsid-Proteins in der Leberzelle

Die Synthese der Kapside ist ein sehr komplexer Vorgang, bei welchem spezifisch die pgRNA eingeschlossen wird. Da das Kapsid-Protein von HBV zwei Kernlokalisationssignale (NLS) trägt, wurde seine Lokalisation früher nukleär angenommen (Gudat und Bianchi 1977). Neuere Studien zeigen jedoch, dass der Zusammenbau der Core-Partikel sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma stattfinden kann (Zhou und Standring, 1991). Um die Lokalisation des Kapsid-Proteins und auch der von uns konstruierten Mutanten innerhalb der Hepatozyten zu bestimmen, wurde die Methode der Immunfluoreszenz-Mikroskopie angewandt. Wir detektierten die Kapside mit einem Antikörper gegen natives Core-Protein und verwendeten einen Antikörper gegen CD63 zur Markierung des endosomalen System, denn CD63, ein etwa 25 kDa großes Protein in endosomalen und lysosomalen Membranen, gilt als spezifischer Marker für MVBs (Ono und Freed, 2004). Mit Hilfe dieser Doppelfärbung sollte eine eventuelle Kolokalisation von Core mit MVBs möglich sein.

Für diesen Versuch wurde WT-Core beziehungsweise die Mutanten zusammen mit dem Core-defizienten HBV-Genom in Huh7-Zellen auf Deckgläschen exprimiert, die Zellen in Methanol fixiert und mit einem primären Core-Antikörper und einem Alexa Flour[®]488-gekoppelten sekundären Antikörper (grüne Färbung) spezifisch markiert. Die MVBs wurden mit einem 1^oAntikörper gegen CD63 und einem Alexa Flour[®]594-gekoppelten 2^o Antikörper (rote Färbung) gekennzeichnet (Abb. 32).

Zudem wurde die Lokalisation von Kapsiden mit Hilfe des Membran-Flotations-Assays bestimmt. Es ist bekannt, dass der Zusammenbau von HBV an intrazellulären Membranen stattfindet und nicht, wie bei vielen anderen umhüllten Viren, an der Plasmamembran. Daher sollte festgestellt werden, ob Kapside eine Affinität zu zellulären Membranen aufweisen oder ob es ausschließlich frei im Zytoplasma vorliegt. Dieser Assay beruht darauf, dass zytoplasmatische Kapside gegenüber membrangebundenen

Kapsiden in einem Saccharose-Gradienten unterschiedliche Sedimentations-Koeffizienten aufweisen. Dieser Sachverhalt wird zur Auftrennung dieser Fraktionen mittels Ultrazentrifugation genutzt und lässt uns so die intrazelluläre Position der Kapside feststellen. Dazu wurden Wildtyp-Core und die Mutanten zusammen mit pHBV Δ C in Huh7-Zellen für 48 Stunden exprimiert. Die Zellysate wurden auf einem Saccharose-Gradienten (60% - 48% - 10%) durch Ultrazentrifugation in Membran-Fraktionen (1-3, 10-48% Saccharose) und zytosolische Fraktionen (4-7, 60% Saccharose) getrennt und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und einem Core-Antikörper ausgewertet. So waren Rückschlüsse auf die Lokalisation des Core-Proteins innerhalb der Leberzelle möglich (Abb. 33).

Mit den Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abb. 32) wird präsentiert, dass sich das Core-Protein im Kern, aber auch im Zytosol finden lässt (WT-Core). WT-Core zeigt ferner eine Co-Lokalisation mit endosomalen Proteinen, die jedoch nur wenig ausgeprägt ist. Betrachtet man dagegen die Mutanten der beiden potentiellen L-Domänen, findet man Core ausschließlich nukleär. Bei den Lysin-Mutanten findet man, wie schon in den Versuchen der Virus-Morphogenese, dass die Mutante K7A ein dem Wildtyp vergleichbares Verteilungsmuster aufweist. Core-Proteine der Mutanten K96A und KK7,96AA sind dagegen nur im Kern lokalisiert. Eine Auffälligkeit findet sich bei der Mutante PPAY 25-28: hier sieht man innerhalb des Kerns eine Zusammenlagerung des Core-Proteins, die sich deutlich verstärkt, wenn das Prolin 25 und das Prolin 129 zu Alanin mutiert ist (Mutante APAY 25-28).

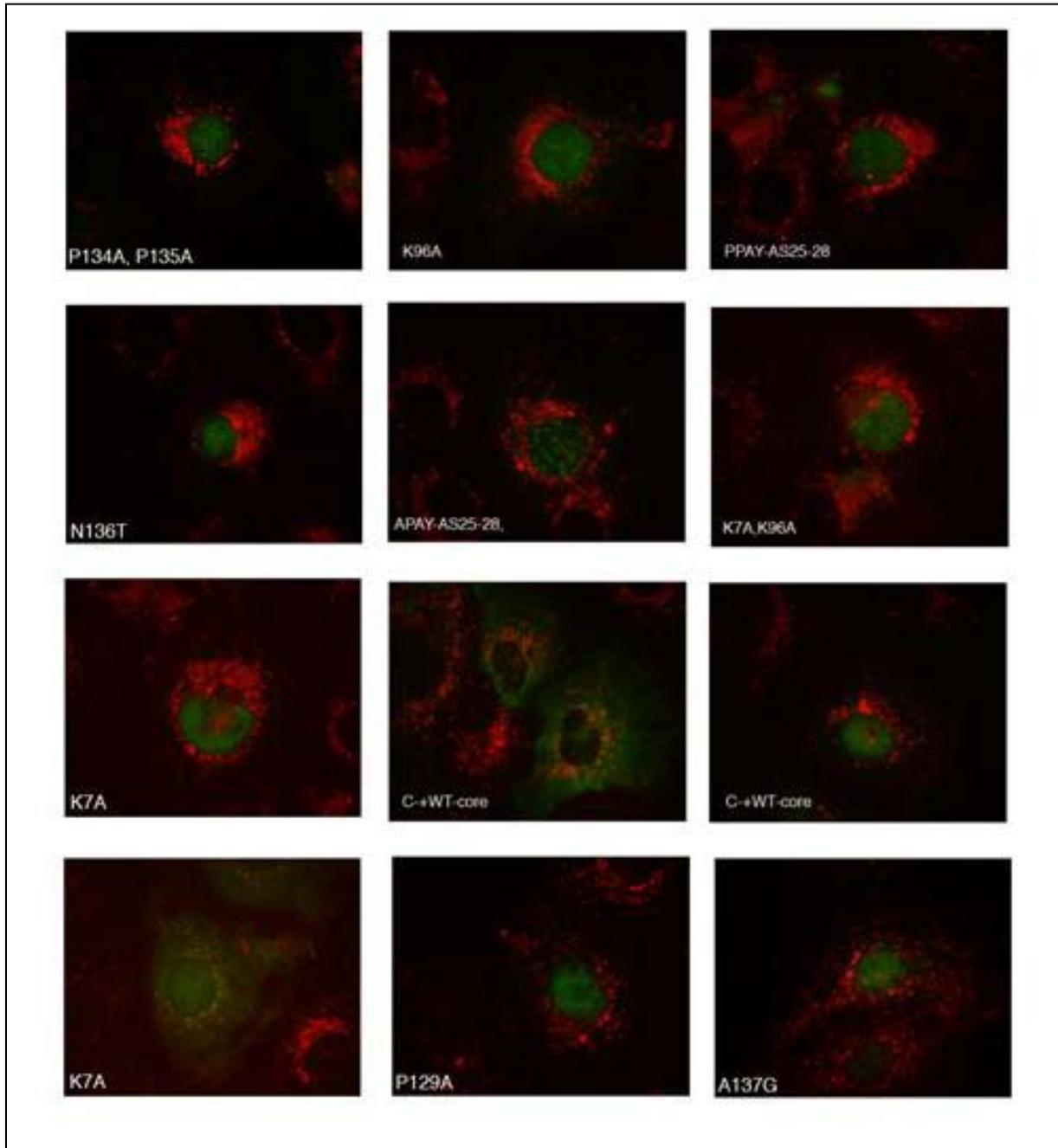


Abb. 32: Immunfluoreszenzen zur Kapsid-Lokalisation in Huh7-Zellen

Huh7-Zellen wurden mit den Core-Mutanten P129A, PP134,135AA, A137G, N136T, K7A, K96A, PPAY 25-28, APAY 25-28 und KK7,96AA beziehungsweise WT-Core und pHBV Δ C kotransfiziert. Die Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert und Core wurde mit einem spezifischem 1°Antikörper und einem Alexa Flour[®]488-gekoppelten 2° Antikörper (grüne Färbung) markiert. Endosomen wurden mit einer roten Färbung (CD63-Marker und Alexa Flour[®]594) versehen. Die Zellen konnten dann im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss) mit der Software Axiovision Release 4.4 identifiziert werden.

Betrachten wir die Lokalisation der Core-Partikel mit Hilfe des Membran-Flotations-Assays (Abb. 33), können wir zeigen, dass ein Teil der Kapside an Membranen gebunden vorliegt (die jeweilige Fraktion 2), wobei die Quantität jedoch variiert. Vergleicht man die einzelnen Mutanten untereinander, sieht man, dass die Mutanten P129A und K7A dem WT vergleichbare Mengen an membrangebundenen Kapsiden aufweisen. Dagegen fällt bei den Mutanten des PPNAP-Motivs (PP134,135AA; A137G; N136T), aber auch bei den Mutanten Y132A und K96A und KK7,96AA die membrangebundene Menge an Kapsiden deutlich geringer aus.

Die Hauptmenge der Kapside findet sich jedoch sowohl beim WT als auch bei allen Mutanten im zytosolischen Bereich der Hepatozyten (Fraktionen 4-7). Allerdings wurden die Zelllysate vor der Ultrazentrifugation stark gepottert, so dass die Möglichkeit der Kernzerstörung vorliegt, und man damit rechnen muss, dass innerhalb der zytosolischen Fraktion auch nukleäres Core vorhanden ist. Allgemein auffällig ist die Mutante KK7,96AA, die verglichen mit dem WT und den anderen Mutanten, eine insgesamt verminderte Quantität zeigt.

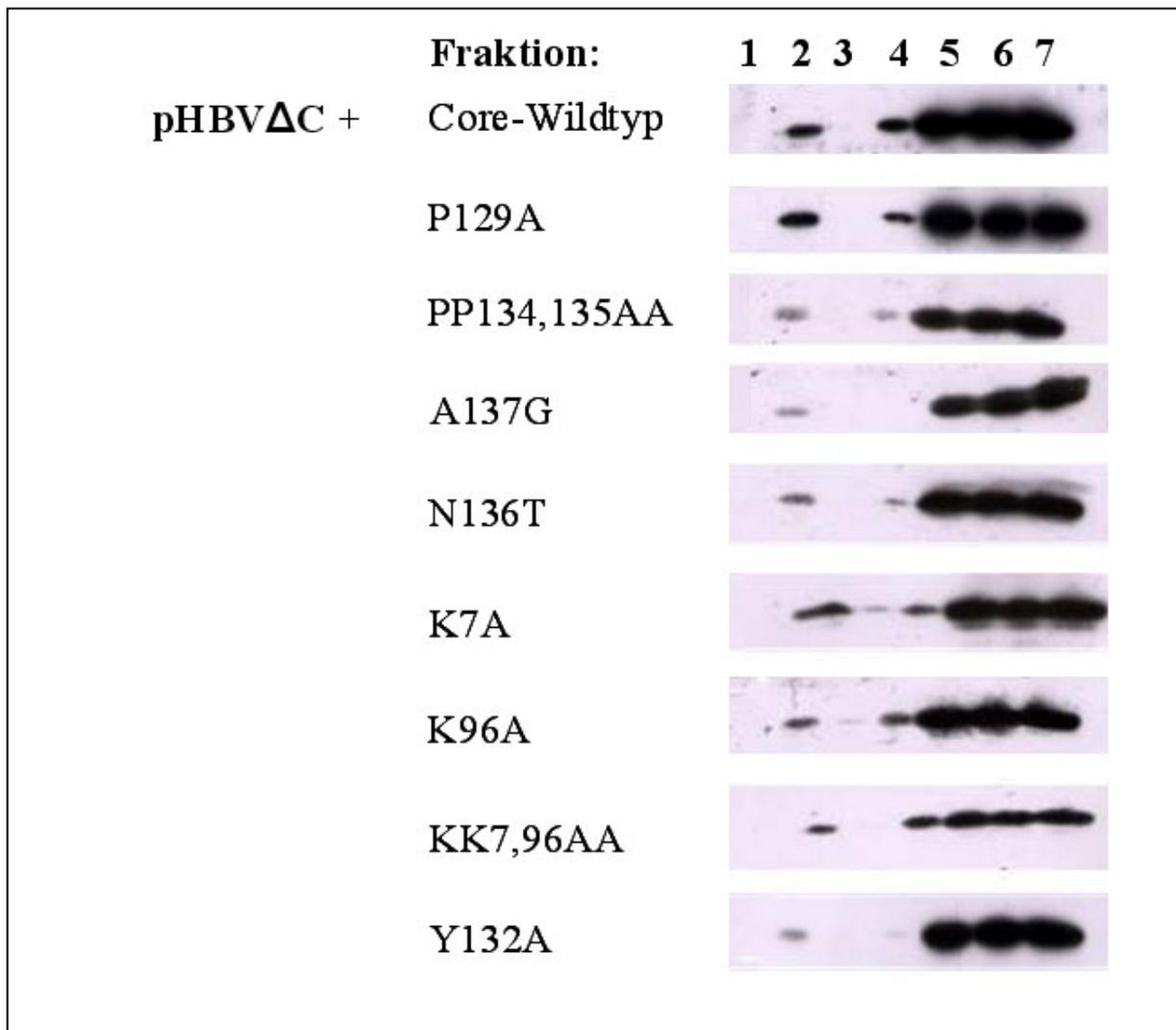


Abb. 33: Membran-Flotationss-Assay

Lysat von im Virus-Kontext transfizierten Zellen wurde mittels eines Succrose-Gradienten (60% - 48% - 10%) und Ultrazentrifugation in Membran-Fractionen (1-3, 10-48% Succrose) und zytosolische Fractionen (4-7, 60% Succrose) getrennt. Core-Protein wurde mit Hilfe von SDS-PAGE, Western-Blot und einem für denaturiertes Core-spezifischen Antikörpers detektiert.

Die Versuche zur Lokalisation der HBV-Kapside zeigen wiederum die Notwendigkeit der beiden potentiellen L-Domänen. Aber auch das Lysin 96, das möglicherweise einer Konjugation mit Ub dient, ist für die korrekte Lokalisation von Core in der Leberzelle essentiell.

4. Diskussion

Das Hepatitis-B Virus gelangt über einen noch unbekanntem Rezeptor in die Leberzelle. Die bisher identifizierten Mechanismen, welche dazu beitragen, dass das Virus in die Zelle aufgenommen wird und sich dort spezifisch reproduziert, wurden in der Einleitung dieser Arbeit referiert. Weitgehend unerforscht ist der Weg, den das Virus zu seiner Freisetzung aus der Zelle nutzt. Da HBV eine sehr hohe Infektiosität aufweist, und schon wenige in die Blutbahn gelangende Viren zu einer Infektion von Hepatozyten führen, muss dieses Virus über sehr effiziente Mechanismen der Aufnahme, Bildung und Freisetzung verfügen. Ein zentraler Mechanismus scheint die Nukleokapsid-Umhüllung und die darauf folgende Virus-Ausschleusung aus der Leberzelle darzustellen. Zu einer Umhüllung des Nukleokapsids kommt es nur bei vollständig ausgereiftem Virusgenom. Woher aber weiß die Zelle, dass die Reifung des Virusgenoms innerhalb des Nukleokapsids abgeschlossen ist? Welches Signal bedingt die Einleitung der Verpackung mit den Hüllproteinen? Und wie gelangen die fertigen Viren aus der Zelle? Um diesen Fragen etwas näher zu kommen, betrachten wir zunächst, welche Mechanismen andere umhüllte Viren benutzen. Das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) stülpt sich zwecks eigener Umhüllung durch zelluläre Membranen. Eines der wichtigsten viralen Proteine hierfür ist das Gag-Vorläufer-Proteine P55_{gag}; nach seiner zytosolischen Synthese gelangt es an die Plasmamembran und ist dort für das Budding der Virionen verantwortlich. Nach Freisetzung der unreifen Virionen wird es von der HIV-Protease in das Matrix-, das Kapsid-, das Nukleokapsid-Protein, p6 und die kleineren Peptide p1 und p2 zerschnitten (Freed, 1998). Ausschlaggebend für das Budding ist das carboxyterminal-gelegene p6 mit seinem PTAP-Motiv, das einer L-Domäne entspricht (Gottlinger, 2001). Diese interagiert mit dem zellulären Protein Tsg101 und rekrutiert somit das Endosomen-System, dass dem Virus das Budding ermöglicht (Pornillos et al., 2006). Es wurde beobachtet, dass Mutationen jeder einzelnen Aminosäure innerhalb dieses PTAP-Motivs in p6 zu einer gestörten Virus-Ausschleusung führen, bei der

die Virionen an der Zelle haften bleiben (Freed, 2003). Wie eben berichtet, geschieht der Vorgang des Virus-Buddings bei HIV-1, aber auch bei den meisten anderen umhüllten RNA-Viren an der Plasmamembran (Ono und Freed, 2001). Für HIV im Makrophagen ist darüber hinaus ein intrazellulärer Weg der Virionen-Produktion bekannt. Eingangs zeigten ultrastrukturelle Analysen von HIV-infizierten Monozyten und Makrophagen, dass sich Virionen innerhalb von intrazellulären Golginahen Vakuolen finden (Gendelman et al., 1988; Orenstein et al., 1988). Neuere Studien von Raposo et al. (2002) ergaben, dass es sich hierbei um Major Histocompatibility Antigen Typ II (MHCII)-Kompartimente handelt, in denen normalerweise MHCII-Moleküle mit Peptiden beladen werden, die dann zur Zelloberfläche transportiert werden. Pelchen-Matthews et al. charakterisierten 2003 diese Kompartimente genauer und zeigten, dass sie sehr große Ähnlichkeit mit dem endosomalen System aufweisen. Sie konnten mit Antikörpern gegen späte Endosomen markiert werden, und es wurde gezeigt, dass bei der Einstülpung von HIV-1-Virionen in dieses Kompartiment Membran-Proteine von späten Endosomen beteiligt sind, wie beispielsweise CD-63 und LAMP-1 (Pelchen-Matthews et al, 2003). Zudem konnten diese Vakuolen bei der Fusionierung mit der Plasmamembran, und der dadurch erfolgenden Freisetzung der Virionen in das Kulturmedium, beobachtet werden. Da diese Vakuolen intrazelluläres Material nach außen transportieren, nennt man sie Exosomen (Denzer et a., 2000). Diese intrazelluläre Entstehung von HIV-1 mittels des endosomalen Systems wurde zudem noch mit einem weiteren Nachweis bestätigt: Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen intrazelluläre Faktoren und Plasmamembran-Proteine zeigten, dass HIV-1-Virionen, die aus Makrophagen freigesetzt werden, an endosomalen Kompartimenten entstehen und nicht an der Plasmamembran (Pelchen-Matthews et al, 2003).

Vergleiche mit HBV zeigen, dass auch das HBV-Assembling intrazellulär stattfindet und dass innerhalb des HBV-Core-Proteins eine der HIV-1 Late-Domäne PTAP-ähnliche Sequenz lokalisiert ist, das PPNAP-Motiv an Position 134-138. Mit Mutationsversuchen dieser potentiellen L-Domäne

wollten wir überprüfen, ob HIV-ähnliche Budding-Mechanismen vorliegen, ob auch hier das endosomale System beteiligt ist und ob analoge Faktoren rekrutiert werden.

Das HBV-Core ist nur 185 Aminosäuren groß, unterstützt aber im viralen Lebenszyklus eine Vielzahl von komplexen Mechanismen, wie beispielsweise das selektive Verpacken des Pregenoms (Nassal, 1992; Beames et al, 1993), die Wanderung des Nukleokapsids innerhalb der Zelle und die Einleitung der Umhüllung des Nukleokapsids (Koschel et al., 1999, 2000). Die von uns konstruierten Mutationen innerhalb des PPNAP-Motivs, PP134,135AA, N136T und A137G weisen alle unterschiedliche Phänotypen auf. Tauscht man die Aminosäure Alanin 137 in Glycin, verhält sich diese Mutante dahingehend, dass Kapside und Nukleokapside, aber keine Virionen nachgewiesen werden können. So scheint die zusätzliche Methylgruppe des Alanins, die bei Glycin nicht vorhanden ist, eine Bedeutung zu besitzen. Eventuell steht sie im Zusammenhang mit der Signalisierung des Reifegrades des Nukleokapsids oder mit dessen Transport zu weitervermittelnden zellulären Strukturen, wie beispielsweise die des endosomalen Transportwegs. Bei der Mutante N136T hingegen kam es nur noch zur Bildung von Kapsiden. Bei dieser Mutante sollte eine Optimierung des PPNAP-Motivs zu der in Retroviren häufig vorkommenden Late-Domäne PT/SAP erzielt werden. Da aber die Virus-Synthese schon im Stadium der Nukleokapsid-Bildung blockiert war, muss dem Asparagin 136 eine spezifische Funktion zukommen, die von Threonin nicht erfüllt werden kann. Könnte das Asn 136 eventuell an der Erkennung der viralen RNA beteiligt sein? Dem widerspricht jedoch die in der Einleitung erwähnte Einteilung des Core-Proteins, bei welcher die N-terminalen 144 AS als Assemblierungsdomäne angesehen werden und der restliche C-terminale Bereich (AS 141-183) für die pgRNA-Bindung notwendig ist (Nassal, 1992). Da aber Asn 136 sehr nah an der Grenze dieser beiden Bereiche liegt, wäre zu vermuten, dass es gleichwohl an der RNA-Bindung beteiligt ist.

Die Prolinreste an Position 134 und 135 scheinen ebenfalls bedeutungsvoll zu sein, da bei Substitution dieser Aminosäuren durch Alanin schon die Kapsid-Bildung unterbrochen war.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Arbeitsgruppe von Bruss (Ponsel und Bruss, 2003) zeigt sich, dass die Ergebnisse bei der Mutante A137G mit den hier dargestellten Daten übereinstimmen. Bei Substitution des Asparagins 136 zu Threonin wurden bei den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, keine Nukleokapside mehr detektiert. Von Ponsel und Bruss (2003) wurde dieses Asparagin aber zu Alanin mutiert, und in diesem Fall konnte die Bildung von Nukleokapsiden nachgewiesen werden (Ponsel und Bruss, 2002). Dies entspricht nicht den Erwartungen, da man eigentlich davon ausgehen könnte, dass die Substitution von Asparagin zu einer ihr ähnlichen Aminosäure wie Threonin eher die natürliche Protein-Funktion aufrechterhalten könnte, denn beide sind, im Gegensatz zum hydrophoben Alanin, polar. Die Autoren konnten auch zeigen, dass bei Einzelsubstitution des Prolins 135 zu Alanin eine normale Nukleokapsid- und Virus-Bildung vonstatten ging, wogegen die hier vorliegende Doppelmutation der Proline 134 und 135 zu Alanin die Kapsid-, die Nukleokapsid- und die Virus-Bildung vollständig blockierte.

Unsere Ergebnisse hinsichtlich des PPNAP-Motivs präsentieren, dass zur Kapsid-Formation nur die beiden Proline essentiell sind. Bei Nukleokapsid-Bildung kann ausschließlich auf das Alanin an Position 137 verzichtet werden. Bei der Virionen-Produktion jedoch ist, ähnlich wie bei HIV-1, jede einzelne Aminosäure des Motivs unentbehrlich. So offenbart die Mutagenese des PPNAP-Motivs seine ausdrückliche Notwendigkeit innerhalb der HBV-Morphogenese.

Auch die Immunfluoreszenzen zur Identifikation der Lokalisation von Core präsentieren bei allen Mutationen des PPNAP-Motivs ein vom Wildtyp abweichendes Verteilungsmuster. Länger zurückliegende immunohistochemische Versuche zeigten, dass das Core-Protein, welches zwei Kern-Lokalisations-Signale (NLS) trägt (Eckhardt et al., 1991; Yeh et al., 1990), häufig innerhalb des Kerns infizierter Zellen lokalisiert ist (Gudat und Bianchi, 1977; Suzuki et al., 1985; Chu et al., 1987) und sich dort zu Kapsiden zusammenlagert (Yamada und Nakane, 1977). Neuere Studien, welche in *Xenopus* Oozyten durchgeführt wurden, wiesen dagegen eine signifikante Lokalisation von Core und Core-Partikeln auch im Zytoplasma auf (Zhou und Standring, 1991, 1992). Hier ließ sich auch

bei entferntem Kern der Kapsid-Zusammenbau nachweisen (Zhou und Standring, 1991), und man nimmt heute an, dass die Kapsid-Bildung hauptsächlich im Zytoplasma und nur zu einer geringen Menge im Nukleus stattfindet. Unsere Versuche mit WT-Core zeigen dessen Verteilung ebenfalls zytosolisch wie nukleär. Betrachtet man allerdings die PPNAP-Mutanten, findet sich Core ausnahmslos im Kern, weshalb diesem Motiv auch bei der intrazellulären Verteilung von Core eine Mitwirkung zugesprochen werden muss.

Allerdings findet sich bei umhüllten Viren neben dem PS/TAP-Motiv noch eine weitere, sehr gut charakterisierte Late-Domäne, das Motiv PPxY, welches laut zahlreicher Publikationen das Protein Nedd4 bindet, ein Mitglied der Familie der E3-Ub-Ligasen. Das Motiv PPxY wird von Viren genutzt, um von Nedd4 ubiquitiniert zu werden. Da Ub ein Signal zur Einschleusung in das endosomale System darstellt, ist diese PPxY-Domäne maßgeblich an der Ausschleusung von Virionen aus der Zelle beteiligt (Xiang et al., 1996; Harty et al., 1999, 2001; Strack et al., 2000; Kikonyogo et al., 2001; Yasuda et al., 2002, 2003; Timmins et al., 2003; Vana et al., 2004). Da auch diese Sequenz im HBV-Core anzutreffen ist (PPAY an Position 129-132), stellt sich die Frage, ob HBV diese Domäne ebenfalls nutzt, um von Nedd4 ubiquitiniert zu werden, ob es sich hier auch um eine L-Domäne handelt und ob diese ebenso gravierende Auswirkungen auf die HBV-Morphogenese besitzt. Dieser Fragestellung sind wir erneut mit Mutations-Analysen näher gekommen, wobei wir neben weiteren Mutationen zu diesem Motiv insbesondere die Mutanten P129A und Y132A untersuchten. Wir konnten feststellen, dass bei Mutation des Prolins 129 zu Alanin der Nachweis von Kapsiden noch möglich ist, Nukleokapside und Viren jedoch nicht mehr detektierbar sind. Dies verdeutlicht, dass bei Austausch dieser Aminosäure das Core-Protein noch die Fähigkeit besitzt, sich zusammenzulagern, jedoch ein Defizit in der Pregenom-Bindung aufweist, weshalb die Verpackung mit den Hüllproteinen und somit die Fertigstellung zu reifen Virionen unterbleibt. So scheint das Prolin 129 an der Erkennung oder Bindung der pregenomischen RNA beteiligt zu sein. Wie oben erwähnt, ist bekannt,

dass das HBV-Core-Protein aus zwei Bereichen besteht: die N-terminalen 140 Aminosäuren sind für die Dimerisierung des Core-Proteins und die Zusammenlagerung zu Kapsiden verantwortlich, während die 40 C-terminalen Aminosäuren argininreich sind und eine Nukleinsäure-Bindungs-Aktivität aufweisen (Nassal, M., 1992). Es wurde gezeigt, dass sich innerhalb des C-terminalen Abschnitts phosphorylierbare Serinreste befinden (Liao, et al, 1995). Diese an den Positionen 155, 162 und 170 liegenden Serine sind essentiell für die Nukleokapsid-Bildung und man nimmt an, dass diese durch koordinierte Phosphorylierung gesteuert wird (Melegari et al, 2005). Allerdings liegt nun das kritische Prolin an Position 129, also innerhalb des von Nassal postulierten N-terminalen Bereichs, und wäre somit nicht an der Bindung der pgRNA beteiligt, sondern eher an der Kapsid-Bildung. Da diese aber noch intakt ist, stellt sich die Frage, ob nicht auch Teile des N-terminalen Bereichs an der RNA-Bindung beteiligt sein könnten oder ob die Grenze der Bereichs-Einteilung eventuell nicht so streng bei Aminosäure 140 liegt.

Tauscht man die Aminosäure Tyrosin 132 des PPAY-Motivs gegen Alanin, ist diese Mutante in Kapsid-, Nukleokapsid- und Virusbildung defizient. Weitere Untersuchungen innerhalb dieses Motivs, die von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Bruss vorgenommen wurden, bestätigten diese Ergebnisse (Ponsel und Bruss, 2003). Sie zeigten darüber hinaus die Entbehrlichkeit des Alanins an Position 131 und verdeutlichten den Bedarf von Prolin 130, bei dessen Austausch keine Nukleokapside und keine Virionen mehr detektierbar waren. Auch dieser möglichen L-Domäne PPAY konnten unsere Ergebnisse eine wesentliche Notwendigkeit zur Aufrechterhaltung der HBV-Morphogenese zuweisen.

Der Bedarf des PPAY-Motivs bestätigte sich auch in der Immunfluoreszenz, denn hier zeigt sich, vergleichbar mit den Mutanten des PPNAP-Motivs, die vom WT abweichende, ausschließliche Kernlokalisation von Core.

So kann die Hypothese formuliert werden, dass die potenziellen Late-Domänen PPNAP und PPAY innerhalb des Core-Proteins für die Morphogenese von HBV essentiell sind. Ob und wie diese Motive

zelleigene Faktoren zur Virus-Ausschleusung rekrutieren, ist noch unklar und soll im Folgenden diskutiert werden.

Wegen der Kenntnis, dass L-Domänen über das wirtszelleigene Ubiquitin-System mit der endosomalen Endozytose-Maschinerie interagieren, wollten wir vorab eine mögliche Ubiquitinierung von Core untersuchen. Proteine werden spezifisch über die kovalente Anheftung von Ub an ein Lysin des Ziel-Proteins markiert. In der Core-Sequenz findet man zwei mögliche Ubiquitinierungsstellen, ein Lysin an Position 7 und eins an Position 96. Unsere Arbeitsgruppe unternahm zahlreiche Versuche zum Nachweis einer Core-Ubiquitinierung. Aber auch mit den unterschiedlichsten Nachweis-Verfahren war es nicht möglich, Ub-Core-Moleküle zu detektieren. Da jedoch vieles für eine Ubiquitinierung von Core spricht, versuchten wir auf einem anderen Weg einen Hinweis auf Core-Ubiquitinierung zu bekommen. Zum besseren Verständnis dieser Methode sollen vorab jedoch die von uns kürzlich publizierten Ergebnisse über $\gamma 2$ -Adaptin und seine Interaktion mit Core erläutert werden (Rost et al., 2006). Nachdem wir 2001 $\gamma 2$ -Adaptin im Yeast-two-Hybrid-System als Interaktionspartner des großen L-Hüllproteins ausmachen konnten (Hartmann-Stuhler und Prange, 2001), zeigten wir 2006, dass $\gamma 2$ -Adaptin auch mit dem HBV-Kapsid interagiert (Rost et al., 2006).

Adaptine sind Untereinheiten von Adapter-Proteinen (AP) und an der Sortierung von Proteinen in spezielle Zellkompartimente beteiligt. Bisher sind vier heterotrimere APs beschrieben, AP-1 bis AP-4, wobei für AP-1 und AP-2 eine Interaktion mit der Late-Domäne YxxL beschrieben wurde (Freed, 2002). Sie sind verantwortlich für die Konzentrierung der Cargo-Proteine in sich bildenden Vesikeln, ermöglichen die Faltung der Membranen und gestatten das „Pinching-off“ der Vesikel in Richtung des Zytoplasmas (Boehm und Bonifacino, 2001). Das mit HBV-Proteinen interagierende $\gamma 2$ -Adaptin hat Ähnlichkeiten mit $\gamma 1$ -Adaptin, einer großen Untereinheit von AP-1, welches als Adapter-Protein im trans-Golgi-Netzwerk und in Endosomen gefunden wird. $\gamma 2$ -Adaptin und $\gamma 1$ -Adaptin ähneln sich sowohl in der Primär-Sequenz als auch in ihrer Domänen-Struktur, beide tragen eine N-terminale *head*- und eine C-terminale *ear*-

Domäne, die durch eine *hinge*-Region verbunden sind (Lewin et al., 1998, Takatzu et al., 1998). Allerdings scheint $\gamma 2$ -Adaptin eine andere Funktion als $\gamma 1$ -Adaptin zu erfüllen, die bisher jedoch noch nicht bekannt ist (Zizioli et al., 1999). Da für $\gamma 2$ -Adaptin eine Wechselwirkung mit Core detektiert werden kann, stellt sich die Frage, wie diese zustande kommt. Es könnte dann innerhalb der $\gamma 2$ -Adaptin-Sequenz ein Ub-interagierendes Motiv (UIM) gefunden werden und „Pull-down“-Analysen mit Ub-Agarose lieferten ein positives Ergebnis in $\gamma 2$ -Adaptin-Ub-Bindung. Mittels Mutationen dieses Motivs konnte die Ub-Bindung zu $\gamma 2$ -Adaptin dann abgeschwächt beziehungsweise ganz blockiert werden (Rost et al., 2006). Aufgrund dieser Begebenheiten lässt sich die Annahme formulieren, dass die Wechselwirkung zwischen $\gamma 2$ -Adaptin und HBV-Core durch eine Ubiquitinierung des Core-Proteins vermittelt wird.

Hinweise auf eine Ubiquitinierung von Core lieferte nun ein Versuch, der darin bestand, zu testen, ob $\gamma 2$ -Adaptin noch eine Interaktion mit Core bewerkstelligen kann, wenn sein UIM deletiert ist, es also seine Fähigkeit zur Erkennung ubiquitiniertes Proteine verloren hat. Da bei Verwendung von $\gamma 2$ -Adaptin mit deletiertem UIM keine Core-Wechselwirkung mehr detektiert werden konnte, ist dies ein starker Hinweis darauf, dass Core höchstwahrscheinlich einer Konjugation mit Ub unterliegt (Rost et al., 2006).

Eine nahe liegende Folgerung wäre, dass $\gamma 2$ -Adaptin das Kapsid-Protein durch dessen Ub-Markierung erkennt und so die Wechselwirkung dieser zwei Proteine zustande kommt. Allerdings könnte auch ein zusätzlicher Faktor zwischengeschaltet sein, der selbst ubiquitiniert wird und so eine Verbindung zwischen Core und $\gamma 2$ -Adaptin herstellt. Ein theoretisches Modell dieser Hypothese ist in Abb. 34 dargestellt.

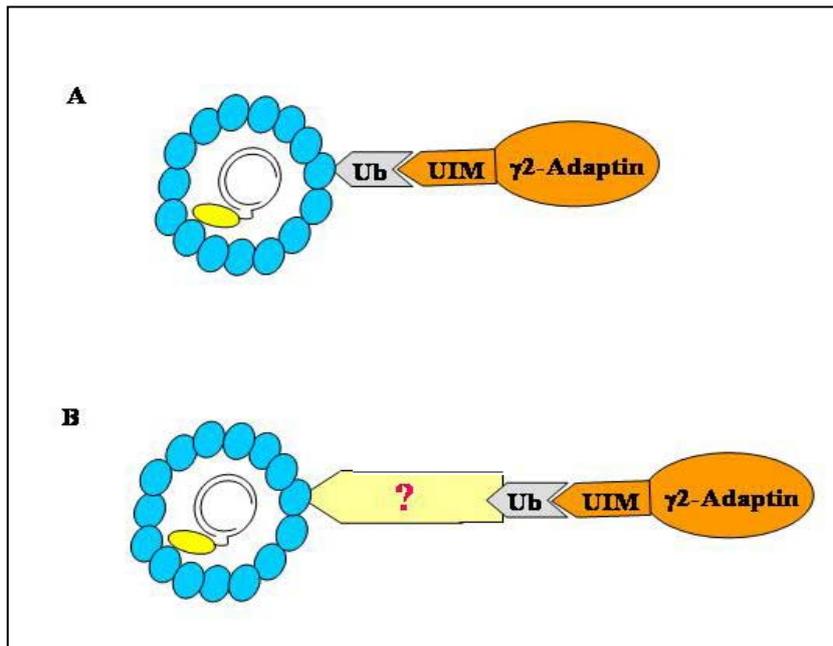


Abb. 34: Modell der Core- γ 2-Adaptin-Interaktion

A: die HBV-Kapside werden spezifisch mit Ub konjugiert und über das UIM-Motiv von γ 2-Adaptin erkannt.

B: ein unbekannter Faktor, der ubiquitiniert wird, ist der Core- γ 2-Adaptin-Interaktion zwischengeschaltet.

Da Core zwei Lysinreste trägt, K7 und K96, wollten wir die Bedeutung dieser potentiellen Ubiquitinierungsstellen innerhalb des Core-Proteins und ihre Rolle in der HBV-Morphogenese genauer untersuchen. Wir mutierten die Lysine sowohl einzeln als auch gemeinsam und stellten fest, dass bei Substitution beider Lysine die initialen Schritte der Virusmorphogenese noch vollzogen werden, denn es ist weiterhin möglich, sowohl Kapside als auch Nukleokapside zu detektieren. Allerdings ist die Quantität der detektierten Mengen an Kapsiden und auch Nukleokapsiden bei der Lysin-Doppelmutante deutlich vermindert. Bei der Virionen-Synthese hingegen zeigt sich ein anderes Bild, hier ist nur noch die Mutante K7A zur Virus-Produktion fähig. Des Weiteren zeigen die Versuche mit den Lysin-Mutanten, dass K96 für die Wechselwirkung von Core mit γ 2-Adaptin verantwortlich ist (Rost et al., 2006). Wir schließen daraus, dass die putative Ubiquitinylierungsstelle Lysin 96 eine bedeutsame Rolle übernimmt, da bei Substitution dieser Aminosäure alle viralen Komponenten synthetisiert werden und ausschließlich die Detektion von Virionen im Zellkultur-Überstand nicht mehr möglich ist. Dies deutet darauf hin, dass das Lysin an Position 96 des Core-Proteins an der

Erkennung der Hüllproteine und/oder dem Einschleusen in das Endosomale-System beteiligt ist und hierbei höchstwahrscheinlich die Konjugation mit Ub hilfreich ist. Zurückblickend auf die Hinweise einer Core-Ubiquitinierung durch den Nachweis mit γ 2-Adaptin lässt sich nun annehmen, dass das Kapsid durch die Konjugation mit Ub an Lysin 96 durch γ 2-Adaptin erkannt und über die ESCRT-Maschinerie in MVBs, welche womöglich die HBV-Hüllproteine S, M und L in ihre Membran integriert haben, knospen kann (siehe auch Abb. 35).

Die Assoziation von Kapsiden an zelluläre Membranen wird in dieser Arbeit durch die Daten des Membran-Flotations-Assays nachgewiesen. Wir können zeigen, dass sie innerhalb der Leberzelle einerseits an Membranen gebunden vorliegen, andererseits aber auch frei im Zytosol zu finden sind. Besonders die Kapside des Wildtyps zeigen eine deutliche Membran-Interaktion, die jedoch auch für die Mutanten P129A und K7A detektiert werden kann. Betrachtet man allerdings weitere Mutanten der von uns untersuchten Motive, wie PP134,135AA, A137G und Y132A, fällt ein deutlicher Rückgang der Membran-Assoziation auf. Für das WT-Kapsid konnten von Mabit und Schaller (2000) ähnliche Daten mit DHBV-Core erhoben werden. Diese Arbeitsgruppe testete die Membran-Fraktion noch eingehender: sie setzte der Membran-Core-Fraktion native Membranen zu und konnte beobachten, dass Core mit den neuen Membranen assoziierte. Der gleiche Ansatz mit der zytosolischen Fraktion war negativ (Mabit und Schaller, 2000).

Allerdings besteht bisher das Modell, dass das L-Hüllprotein, integriert in zelluläre Membranen, die Verbindung zu Core herstellt. Wenn aber die Kapside selbst eine Membranaffinität besitzen, und das ohne die Anwesenheit weiterer viraler Proteine, welche Rolle spielt dann das L-Protein? Dieser Frage sind auch Mabit und Schaller nachgegangen und stellten fest, dass das L-Hüllprotein die Membranbindung von Core stabilisiert, also durchaus notwendig ist. Sie nehmen an, dass Kapside zuerst mit nicht-viralen Komponenten der Membran, beispielsweise mit Phospholipiden, interagieren, um dann von L stabilisiert und zum Ort des Buddings dirigiert zu werden (Mabit und Schaller, 2000).

Die Affinität der Kapside zu zytosolische Membranen ist dabei insgesamt ein signifikanter Hinweis darauf, dass Kapside an Membranen des endosomalen Wegs in der Zelle binden könnten.

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse des Membran-Bindungs-Assays kann wieder ein Unterschied in der Membran-Bindungs-Kapazität der Lysin-Mutanten erkannt werden. Es sollte noch genauer untersucht werden, ob Ub auch eine Rolle bei der Membran-Affinität der Kapside spielt. Denn die Mutante K7A verhält sich, wie auch schon bei allen vorangegangenen morphogenetischen Untersuchungen, dem HBV-Wildtyp entsprechend. Die Mutanten K96A und KK7,96AA zeigen dagegen eine verminderte Membran-Bindung, so dass auch dieser Assay erneut die Bedeutung von K96A verdeutlicht. So könnte wiederum die Annahme der Ub-Beteiligung bei der Membran-Assoziation von Core in Betracht gezogen werden.

Mit Ub als Signalgeber zur Einschleusung von Core in das Endosomale System könnte HBV allerdings noch weitere Wirtszellfaktoren nutzen, um seine Reproduktion zu erzielen. Vor allem für das PPAY-Motiv innerhalb des Core-Proteins wäre die Ubiquitinierung eine logische Schlussfolgerung. Denn diese als PPxY beschriebene Domäne interagiert bei RNA-Viren mit der E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4 (Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4) (Yasuda et al., 2003) und es ist bekannt, dass Nedd4, zusammen mit Ub, im Knospungs-Prozess von Retroviren eine ausschlaggebende Rolle spielt (Vana et al., 2004; Yasuda et al., 2003). Nedd4 ist ein typisches Protein der Familie der E3 Ubiquitin Ligasen. Sie haben die Aufgabe, spezielle Proteine für die Konjugation mit Ubiquitin auszuwählen (Varshavsky, 1997). Dies geschieht höchstwahrscheinlich über die L-Domäne PPxY. Es schließt sich dann die Konjugation eines Mono-Ubs an einen Lysinrest des Proteins an, so dass dieses in das MVB-System eingeschleust werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Core-Protein von HBV über die potentielle Late-Domäne PPAY mit der E3 Ubiquitin-Ligase Nedd4 interagiert. Durch Substitution einzelner Aminosäuren dieses Motivs wird nachgewiesen, dass das Tyrosin 132 essentiell für die

Interaktion mit Nedd4 ist. Tauscht man nur das Prolin 129 gegen Alanin, kommt es zu einer dem Wildtyp vergleichbaren Interaktion mit Nedd4. So lässt sich auch hier wieder die Annahme einer Ub-Konjugation des HBV-Core-Proteins nicht übersehen.

Als weiteren Interaktionspartner von Core konnten wir Tsg101 ausmachen. Es ist bekannt, dass Tsg101 HIV-1, aber ebenso zahlreichen anderen umhüllten Viren, über die L-Domäne PT/SAP Zugang zum MVB-System vermittelt und damit die zelluläre Ausschleusung ermöglicht (Bouamr et al., 2003, Wang et al., 2002, Yasuda and Hunter, 1998, Yuan et al., 2000). Aufgrund der im HBV Core-Protein vorhandenen PPNAP-Domäne (an Position 134-138) war es eine Überlegung, ob Tsg101 über dieses Motiv mit dem Core-Protein interagiert und auch bei diesen Viren das Budding unterstützt. Durch Mutation verschiedener Aminosäuren dieser Domäne und mittels Koimmunpräzipitation konnte eine spezifische Interaktion zwischen dem PPNAP-Motiv des HBV-Core Proteins und Tsg101 nachgewiesen werden. So sind die Aminosäuren Prolin 134 und Prolin 135 für eine dem Wildtyp vergleichbare Tsg101-Interaktion unentbehrlich. Auch bei Substitution des Asparagins 136 kann eine verminderte Wechselwirkung zwischen Core und Tsg101 festgestellt werden. Lediglich das Alanin 137 ist bei einem Tausch gegen Glycin nicht entscheidend, so dass bei der Mutante A137G noch eine gute Interaktion mit Tsg101 zu detektieren ist.

Genau wie der andere Core-Interaktionspartner Nedd4, steht Tsg101 ebenfalls in enger Verbindung zu Ub. Die Aufgabe von Tsg101, als Komponente des ESCRT-I Komplexes, ist die Erkennung und Bindung von ubiquitinierten Proteinen und ihre anschließende Einschleusung in MVBs durch das ESCRT-System, so dass auch bei Interaktion von HBV-Core mit Tsg101 eine Konjugation mit Ub erforderlich wäre. Allerdings besteht bei der Überprüfung der Wechselwirkung zwischen Proteinen mittels Koimmunpräzipitation die Möglichkeit der Mitwirkung zwischengeschalteter Proteine. So wären eventuell Core-bindende Proteine, die dann ubiquitiniert werden, und dadurch die Interaktion zu Tsg101 vermitteln, denkbar. Da jedoch die Wechselwirkung von Tsg101 mit der L-Domäne charakteristisch ist, wäre die direkte Ubiquitinierung

von Core viel überzeugender. Und auch die γ 2-Adaptin-Wechselwirkung spricht in diesem Sinne. Falls das Kapsid-Protein einer Ubiquitinierung ausgesetzt wäre, könnte man vermuten, dass Core über die L-Domäne PPAY von der E3 Ub-Ligase Nedd4 mit Ub markiert, dann von Tsg101 über das Motiv PPNAP identifiziert wird, möglicherweise unter der Mitwirkung von γ 2-Adaptin, das spezifisch die Ubiquitinierung erkennt. Das Resultat wäre, dass das reife Nukleokapsid schließlich in die MVBs knospt, welche die Hüllproteine in ihren Membranen tragen. Dieses Modell ist schematisch in Abb. 35 dargestellt.

Wie die fertigen Virionen dann zur Zelloberfläche gelangen, ließe sich mit Hilfe des Exosomen-Systems erklären. Denn zur Degradierung von Proteinen fusionieren MVBs beziehungsweise die späten Endosomen mit den Lysosomen, und es kommt zum Abbau dieser Vakuolen. Mittels eines adäquaten Signals jedoch können diese Partikel auch zur Plasmamembran transportiert werden, mit dieser fusionieren und ihren Inhalt in den Extrazellulären Raum entlassen; man spricht dann von Exosomen (Raiborg et al., 2003). Dieser Mechanismus ist vor allem bei Antigen-präsentierenden Zellen bekannt. Hier sind die späten Endosomen gleichzusetzen mit dem MHCII-Kompartiment, in welchem die MHCII-Moleküle mit Antigenen beladen werden. Wie oben schon berichtet, ist dies der Ort, an welchem HIV-1 in Makrophagen gebildet werden (Raposo et al., 2002, Pelchen-Matthews et al., 2003). Ob diese Art der Freisetzung auch bei HBV die Ausschleusung unterstützt, bleibt zu untersuchen.

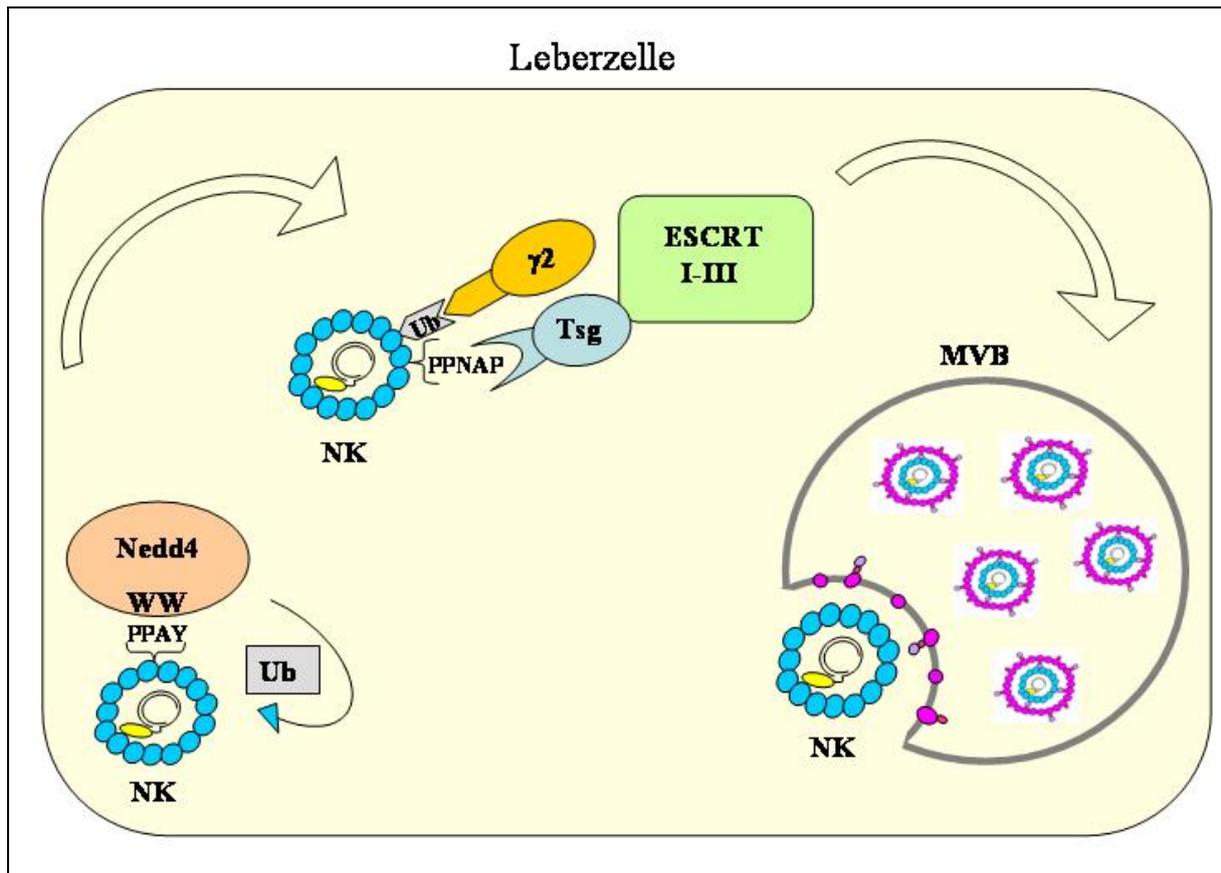


Abb. 35 Modell der Einschleusung von HBV in MVBs

Diese Abbildung gibt eine Vorstellung, wie die Einstülpung der HBV-Nukleokapside in MVBs ablaufen könnte: Nukleokapside (NK) werden über das PPAY-Motiv von den WW-Domänen der Ub-Ligase Nedd4 erkannt und ubiquitiniert. Über Ub gelingt Core die Interaktion mit $\gamma 2$ -Adaptin ($\gamma 2$) und über das PPNAP-Motiv die Wechselwirkung mit Tsg101 (Tsg). Es erfolgt die Rekrutierung des ESCRT-Systems und die Einschleusung in das Endosomale-System. Dieses bewerkstelligt dann die Internalisierung der Nukleokapside in die MVBs, welche die HBV-Hüllproteine in ihrer Membran integriert haben.

Bisher berichteten wir nur von jeweils einzeln in viralen Proteinen vorkommenden L-Domänen, zeigen aber das Vorhandensein von zwei Motiven in HBV-Core. Dass auch andere Viren mehrere L-Domänen in ihren am Budding beteiligten Proteinen besitzen können, zeigt sich beispielsweise bei dem Humanen T-Zell Leukemia Virus Typ-1 (HTLV-1). Dieses Virus ist ein Mitglied der Deltaretrovirus-Familie. Es enthält C-terminal in seinem Matrix-Protein die Sequenz PPPYVEPTAP, welche die Late-Domänen PPPY und PTAP einschließt. Wie bei HBV-Core sind die beiden Motive sehr nah beieinander gelegen und auch hier lässt sich dem

PTAP-Motiv eine Interaktion mit Tsg101 und der Sequenz PPPY eine Wechselwirkung mit dem Nedd4-ähnlichen Protein WWP1 zuschreiben. Die Arbeitsgruppe von Heidecker zeigte, dass diese Motive ebenfalls einen gravierenden Einfluss auf die Virusmorphogenese ausüben (Heidecker et al., 2004). Ein weiteres Virus mit zwei L-Domänen ist das zu den Arenaviren gehörende Lassa Virus. Hier sind die L-Domänen im Z-Protein, welches für die Synthese von VLPs (Virus like Particles) zuständig ist, lokalisiert. Auch für das Lassa-Virus weiß man, dass es den MVB-Weg zur Ausschleusung aus der Zelle nutzt (Urata et al., 2006). Des Weiteren zeigt die Arbeitsgruppe um Segura-Morales, dass das Gag-Protein des Murin Leukemia Virus (MLV) sogar alle drei beschriebenen Late-Domänen aufweist, nämlich PSAP, LYPAL und PPPY. Mit diesen drei Motiven ist es in der Lage, sowohl mit Nedd4 als auch mit Tsg101 und zudem noch mit Alix, ein weiteres essentielles Protein des MVB-Wegs, zu interagieren (Segura-Morales et al., 2005). Dabei zeigte diese Arbeitsgruppe, dass ein Knock-down dieser zellulären Faktoren mittels siRNA zu reduzierter VLP-Synthese führt (Segura-Morales et al., 2005). Letztendlich gibt es zahlreiche Publikationen von Viren, welche über Late-Domänen und die Rekrutierung von zellulären Faktoren das wirtszelleigene endosomale System nutzen und so die Ausschleusung aus der Zelle bewerkstelligen.

Um unsere Hypothese der HBV-Knospung in das endosomale System zu untermauern, sollten allerdings zusätzliche Versuche durchgeführt werden. So könnten weitere, diese These stützende, Interaktionspartner von Core gefunden werden. Wir sollten auch die Wechselwirkung zwischen Core und Tsg101 beziehungsweise Nedd4 genauer auf eventuell zwischengeschaltete Faktoren prüfen. Zudem bleiben die Membranen, an welche Core bindet, genauer zu charakterisieren: handelt es sich hier um endosomale Membranen oder sogar um Membranen des MHCII-Kompartiments, so dass ein direkter Vergleich mit der Reifung von HIV-1 in Makrophagen zulässig wäre? In diesem Zusammenhang sollten wir auch versuchen, Exosomen im Zellkultur-Überstand zu detektieren, da diese ja zu Ausschleusung der Virionen notwendig wären und einen unmittelbaren Hinweis auf das Budding von HBV in MVBs liefern würden. Des Weiteren

steht noch der tatsächliche Nachweis von Ub-Core-Molekülen aus, denn dies könnte unsere Hypothesen grundsätzlich stärken. Allerdings könnten Mutationen der ausschlaggebenden Aminosäuren der untersuchten Motive, wie P129, Y132 oder PP134,135 gemeinsam mit der Mutation des Lysins 96, weitere nützliche Hinweise liefern.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit hatte zum Ziel, den Ausschleusungsmechanismus des Hepatitis-B Virus zu beleuchten. Es ist bisher unbekannt, wie das virale Nukleokapsid umhüllt und das reife Virion aus der Leberzelle freigesetzt wird. Bei einigen RNA-Viren, beispielsweise HIV-1, Ebola oder RSV, vermitteln so genannte Late-Domänen im viralen Kapsid- oder Matrix-Protein die Knospung der Viren an intrazellulären Membranen oder der Plasmamembran. Da das HBV-Core-Protein ähnliche Sequenzen trägt, wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, welche Rolle diese im viralen Replikationszyklus spielen. Meine Ergebnisse zeigen, dass die beiden Prolin-reichen Sequenzen PPAY (129-132) und PPNAP (134-138), die retroviralen Late-Domänen ähneln, für die HBV-Morphogenese essentiell sind. Mutationen einzelner Aminosäuren innerhalb dieser Motive führen zu Phänotypen mit verändertem Kapsid-, Nukleokapsid- und Virus-Bildungs-Vermögen. Insbesondere sind die Aminosäure Tyrosin 132 des Motivs PPAY und die Prolinreste 134 und 135 des Motivs PPNAP erforderlich, da diese schon für die Bildung der Kapside unentbehrlich sind. Charakteristisch für beide Motive sind auch die hier gezeigten Interaktionen mit speziellen Wirtszellfaktoren, deren physiologische Funktion es ist, zelluläre Proteine in den endosomalen Sortierungsprozess einzuschleusen. Im Vordergrund stehen hier die E3 Ub-Ligase Nedd4, welche Proteine mit Ub konjugiert und diese so signifikant für die Einschleusung in das endosomale System markiert, und Tsg101, das als zentrale Komponente des ESCRT-I-Komplexes für die Erkennung von ubiquitinierten Proteinen zuständig ist und diese dadurch in die ESCRT-Kaskade des multivesikulären Endosoms einführt. Für die genannten Interaktionen ist das Motiv PPAY und hier wieder speziell das Tyrosin 132 des HBV-Core-Proteins für die Wechselwirkung mit Nedd4 notwendig. Hingegen vermittelt die L-Domänen-ähnliche Sequenz PPNAP die Assoziation von Core mit Tsg101, wobei die beiden Prolinreste 134 und 135 und auch das Asparagin 136 für die Interaktion essentiell sind. Sowohl

Nedd4 als auch Tsg101 wirken im Zusammenhang mit Ubiquitin, weshalb eine Ubiquitinierung von Core, trotz bislang negativer Nachweise, wahrscheinlich ist. Zugunsten dieser Annahme spricht auch mein Nachweis, dass der Lysinrest an Position 96 des Core-Proteins, als potentieller Ub-Akzeptor, gerade in späten Schritten eine essentielle Rolle spielt. Weiterhin klärungsbedürftig ist auch die Frage, ob Core direkt mit Tsg101 und Nedd4 interagiert, oder ob andere Faktoren dazwischen geschaltet sind.

Auch könnte mit Hilfe von siRNA-vermittelten Depletionsversuchen die physiologische Relevanz der Tsg101/Core- und Nedd4/Core-Interaktion weiterführend untersucht werden. Zudem zeigen meine Arbeiten, dass Core mit intrazellulären Membranen assoziiert, weshalb es interessant wäre, zu untersuchen, ob es sich hierbei um Membranen des endosomalen Systems handelt, an denen die finalen Schritte der Virus-Morphogenese stattfinden könnten.

6. Literaturverzeichnis

Amerik A.Y., Nowak J., Swaminathan S., Hochstrasser M. 2000. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell*. 11: 3365–3380.

Andre B., Springael J.Y. 1994. WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205(2):1201-5.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York

Babst, M. 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic*. 6:2–9.

Babst, M., Katzmann D.J., Estepa-Sabal E.J., Meerloo T., Emr S.D. 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* 3:271–282.

Babst, M., Katzmann D.J., Snyder W.B., Wendland B., Emr S.D. 2002. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell* 3:283–289.

Babst M., Odorizzi G., Estepa E.J., Emr S.D. 2000. Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1:248–258.

Babst, M., Wendland B., Estepa E.J., Emr S.D. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J*. 17:2982–2993.

Babst M., Sato T.K., Banta L.M., Emr S.D. 1997. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J*. 16:1820–1831.

Bache K.G, Slagsvold T., Cabezas A., Rosendal K.R., Raiborg C., Stenmark H. 2004. The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation. *Mol Biol Cell*. 15:4337–4346.

Bache K.G., Raiborg C., Mehlum A., Stenmark H. 2003. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem*: 278 (14):12513–12521.

- Bache K.G., Brech A., Mehlum A., Stenmark H. 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*: 162:435–442.
- Bartenschlager R. 1990. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des P-Proteins der Hepatitis B Viren. Ph.D. Thesis, University of Heidelberg.
- Bartenschlager R., Schaller H. 1988. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J*. 7:4185-4192.
- Beames B., Lanford R.E. 1993. Carboxy-terminal truncations of the HBV core protein affect capsid formation and the apparent size of encapsidated HBV RNA. *Virology* 194:597–607.
- Beasley, R.P. 1988. Hepatitis B virus: The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61, 1942-1956.
- Beasley R.P., Lin C-C., Hwang L.Y., Chen C.-S. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 2, 1129-1133.
- Beck J., Nassal M. 2003. Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J. Biol. Chem.* 278, 36128–36138.
- Bianchi L., Gudat F. 1977. Hepatitis B: immunopathology of various forms *Schweiz Med Wochenschr.* 9;107(27):929-35.
- Bilodeau P.S., Urbanowski J.L., Winistorfer S.C., Piper R.C. 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol.* 4:534-539.
- Birnbaum F., Nassal M. 1990. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J. Virol.* 64:3319–3330.
- 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.* 157:91-101.
- Bishop N., Woodman P. 2000. ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol Biol Cell.* 11:227–239.
- Bishop N., Woodman P. 2000. TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J. Biol. Chem.* 276:11735–11742.

- Blom J., Nielsen C., Rhodes J.M. 1993. An ultrastructural study of HIV-infected human dendritic cells and monocytes/macrophages. *APMIS* 101:672–680.
- Blum H.E., Zhang Z.S., Galun E., Weizsäcker F., Garner B., Liang T.J., Wands J.R. 1992. Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J. Virol.* 66: 1223–1227
- Blumberg B.S. 1997. Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 94: 7121–7125.
- Boehm M., Bonifacino J. S. 2001. Adaptins. The Final Recount. *Mol. Biol. Cell* 12, 2907–2920.
- Boname J.M., Stevenson P.G. 2001. MHC class I ubiquitination by a viral PHD/LAP finger protein. *Immunity*, 15, 627–636.
- Bork P., Sudol M. 1994. The WW domain: A signalling site in dystrophin? *TIBS* 19, 531-533.
- Bouamr F., Melillo J.A., Wang M.Q., Nagashima K., de Los Santos M., Rein A., Goff S.P. 2003. PPPYEPTAP 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. *J. Virol.* 77:11882–11895.
- Breiner K.M., Schaller H. 2000. Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection. *J Virol.* 74(5): 2203-2209.
- 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.
- Carter C.A. 2002. Tsg101: HIV-1's ticket to ride. *Trends Microbiol.* 10:203–205.
- Cereghino J.L., Marcusson E.G., Emr S.D. 1995. The cytoplasmic tail domain of the vacuolar sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function and localization. *MBC.* 6:1089–1102.
- Ceres P., Zlotnick A. 2002. Weak protein–protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry (Mosc)* 41, 11525–11531.
- Chisari F.V. 1997. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest.* 99: 1472-1477.

- Chu C.M., Liaw Y.F. 1987. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection: hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology*. 92:220-5.
- Clague M.J., Urbe S. 2003. Hrs function: viruses provide the clue *Trends in Cell Biology* 13 (12)
- Conway J.F., Cheng N., Zlotnick A., Wingfield P.T., Stahl S.J., Steven A.C. 1997 *Nature* 386, 91–94.
- Cooper A., Paran N., Shaul Y. 2003. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *EMBO J.* 13: 2273-2279.
- Coscoy L., Ganem D. 2003. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell. Biol.* 13, 7–12
- Courtois G., Baumhueter S., Crabtree G.R. 1988. Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(21), 7937-41.
- Craven R.C., Harty R.N., Paragas J., Palese P., Wills J.W. 1999. Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras. *J. Virol.* 73:3359–3365.
- Crowther R.A., Kiselev N.A., Bottcher B., Berriman J.A., Borisova G.P., Ose V., Pumpens P. 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77, 943–950.
- Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1(7649), 695-8.
- Dash S., Rao K.V., Panda S.K. 1992. Receptor for pre-S1(21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction. *J Med Virol* 37(2), 116-21.
- Daub H., Blencke S., Habenberger P., Kurtenbach A., Dennenmoser J., Wissing J., Ullrich A., Cotten M. 2002. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J. Virol.* 76, 8124–8137.
- Demirov D.G., Orenstein J.M., Freed E.O. 2002. The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *J. Virol.* 76:105–117.
- Demirov, D.G., A. Ono, J.M. Orenstein, and E.O. Freed. 2002. Overexpression of the N terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:955–960.

- Denzer K., Kleijmeer M.J., Heijnen H.F., Stoorvogel W., Geuze H.J. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* 113, 3365–3374
- DiFiore P.P., Polo S., Hofmann K. 2003. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4, 491±497.
- Durfee T., Becherer K., Chen P.-L., Yeh S.-H., Yang Y., Kilburn A.E., Lee W.-H., Elledge S.J. 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7:555–569.
- Eble B.E., Lingappa V.R., Ganem D. 1986. Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* 6(5), 1454-63.
- 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.
- Eckhardt S.G., Milich D.R., McLachlan A. 1991. Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol* 65(2), 575-82.
- Enders G.H., Ganem D., Varmus H. 1985. Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant. *Cell* 42(1), 297-308.
- Engelke M., Mills K., Seitz S., Simon P., Gripon P., Schnolzer M., Urban S. 2006. Characterization of a Hepatitis B and Hepatitis Delta Virus Receptor Binding Site. *Hepatology*, 43: 750-760.
- Falco S., Ruvoletto M.G., Verdoliva A., Ruvo M., Raucci A., Marino M., Senatore S., Cassani G., Alberti A., Pontisso P., Fassina G. 2001. Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. *J Biol Chem.* 276 (39): 36613-36623.
- Felder S., Miller K., Moehren G., Ullrich A., Schlessinger J., Hopkins C.R. 1990. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell.* 61(4): 623–634.
- Freed, E. O. 1998. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle *Virology* 251:1–15.
- Freed E. O. 2002. Viral late domains. *J. Virol.* 76:4679–4687
- Freed, E.O. 2003. The HIV-TSG101 interface: recent advances in a budding field. *Trends Microbiol.* 11:56–59.
- Futter C.E, Pearse A., Hewlett L.J., Hopkins C.R. 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol.* 132(6): 1011–1023.

- Galle P.R., Hagelstein J., Kommerell B., Volkmann M., Schranz P., Zentgraf H. 1994. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 106, 664–673.
- Gallina A., Bonelli F., Zentilin L., Rindi G., Muttini M., Milanesi G. 1989. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.* 63:4645–4652.
- Garrus J.E., von Schwedler U.K., Pornillos O.W., Morham S.G., Zavitz K.H., Wang H.E., Wettstein D.A., Stray K.M., Cote M., Rich R.L., Myszka D.G., Sundquist W.I. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for hiv-1 budding. *Cell*, 107(1):55-65.
- Ganem D. 1982. Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. *Rev. Infect. Dis.* 4, 230-232.
- Ganem D. 1996. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. *Virology* 2, 2703-2737.
- Garcia P.D., Ou J.H., Rutter W.J., Walter P. 1988. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* 106(4), 1093-104.
- Gazina E.V., Fielding J.E., Lin B., Anderson D.A., 2000. Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J. Virol.* 74, 4721–4728.
- Gendelman H.E., Orenstein J.M., Martin M.A., Ferrua C., Mitra R., Phipps T., Wahl L.A., Lane H.C., Fauci A.S., Burke D.S. 1988. Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *J. Exp. Med.* 167:1428-1441.
- Gerelsaikhon T., Tavis J.E., Bruss V., 1996. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J. Virol.* 70, 4269–4274.
- Gerken G. 1996. Chronische Virushepatitiden. Die gelben Hefte, Jg. XXXVII, Heft 3, 114-126.
- Gerlich W.H., Lu X., Heermann K.H. 1993. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J. Hepatol.* 17 (Suppl. 3): 10-14.
- Glickman M.H., Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428

Goff A., Ehrlich L.S., Cohen S.N., Carter C.A. 2003. Tsg101 Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Trafficking and Release. *J Virol.* 77(17): 9173-9182.

Gottwein E., Bodem J., Muller B., Schmechel A., Zentgraf H., Krausslich H. G.. 2003. The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release. *J. Virol.* 77:9474–9485.

Göttlinger H.G., Dorfman T., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15; 88(8): 3195-3199.

Gottlinger HG. 2001. The HIV-1 assembly machine. *AIDS.* 15. 5:S13-20.

Gruenberg J., Maxfield F. 1995. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 552–563.

Gruenberg J., Stenmark H. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:317–323.

Gudat F., Bianchi L. 1977. Evidence for phasic sequences in nuclear HBcAg formation and cell membrane-directed flow of core particles in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 73:1194-1197.

Haglund K., Dikic I. 2005. Ubiquitylation and cell signalling. *EMBO.* 24, 3353–3359.

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.

Harty R.N., Paragas J., Sudol M., Palese P. 1999. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *J. Virol.* 73:2921–2929.

Harty R.N., Brown M.E., Wang G., Huibregtse J., Hayes F.P. 2000. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implication for filovirus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13871–13876.

Harty R.N., Brown M.E., McGettigan J.P., Wang G., Jayakar H.R., Huibregtse J.M., Whitt M.A., Schnell M.J. 2001. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J. Virol.* 75: 10623–10629.

Harvey K.F., Kumar S. 1999. Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol.* 9:166–169.

- Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N., Nakayama K.-I. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.*, 276, 33111–33120.
- Heidecker G, Lloyd P.A., Fox K., Nagashima K., Derse D. 2004. Late Assembly Motifs of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 and Their Relative Roles in Particle Release. *J. Virol.* 78 (12)6636–6648.
- Hermida-Matsumoto L., Resh M.D. 2000. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J. Virol.* 74:8670–8679.
- Hershko A., Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 425–479.
- Hewitt E.W., Duncan L., Mufti D., Baker J., Stevenson P.G., Lehner P.J. 2002. Ubiquitylation of MHC class I by the K3 viral protein signals internalization and TSG101-dependent degradation. *EMBO J*, 21:2418–2429.
- Hicke L. 2001. A new ticket for entry into budding vesicles - ubiquitin. *Cell.* 106:527–530.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by mono-ubiquitin. *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.
- Hirsch R., Lavine J., Chang L., Varmus H., Ganem D. 1990. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature (London)* 344:552–555.
- Hirsch J. G., Fedorko M. E., Cohn, Z. A. 1968. Vesicle fusion and formation at the surface of pinocytic vacuoles in macrophages. *J. Cell Biol.* 38, 629–632
- Hirsch V.M., Zack P.M., Vogel A.P., Johnson P.R. (1991). Simian immunodeficiency virus infection of macaques: end-stage disease is characterized by widespread distribution of proviral DNA in tissues. *J Infect Dis*;163:976–988.
- Hofmann K., Bucher P. 1995. The rsp5-domain is shared by proteins of diverse functions. *FEBS Lett.* 358, 153–157.
- Hollinger F.B. 1996. Hepatitis B virus. In Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds), *Virology*, Third Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2739–2807.

- Hoofnagle J.H. 1981. Serological markers of hepatitis B virus infection. *Annu. Rev. Med.* 32, 1-11
- Howard T.L., Stauffer D.R., Degnin C.R, Hollenberg S.M. 2001. CHMP1 functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins. *J Cell Sci.* 114:2395–2404.
- Hu J., Seeger C. 1996. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3), 1060-4.
- 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(1), 59-68.
- Huang L., Kinnucan E., Wang G., Beaudenon S., Howley P.M., Huibregtse J.M., Pavletich N.P. 1999. Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade. *Science* 286: 1321-1326
- Hughson F.M. 1995. Structural characterization of viral fusion proteins. *Current Biology.* 5(3): 265-274.
- Huibregtse J.M., Scheffner M., Beaudenon S., Howley P.M. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2563–2567.
- Huovila A.-P.J., Eder A.M., Fuller S.D. 1992. *J. Cell Biol.*, 118, 1305-1320.
- 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.
- Jayakar H.R., Murti K.G., Whitt M.A. 2000. Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release. *J. Virol.* 74:9818–9827.
- Jiang Y.-H., Ballinger C.A., Wu Y., Dai Q., Cyr D.M., Hohfeld J., Patterson C. 2001. Ubiquitylation as a Quality Control System for Intracellular Proteins . *J. Biol. Chem.*, 276, 42938–42944.
- Joazeiro C.A.P., Weissman A. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell.*102; 549-552.
- Junker-Niepmann M., Bartenschlager R., Schaller H. 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 9:3389–3396.
- Kann M., Gerlich W.H. 1994. Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J. Virol.* 68, 7993–8000.

- Kann M., Sodeik B., Vlachou A., Gerlich W.H., Helenius A. 1999. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 145(1), 45-55.
- Katzmann D.J., Babst M., Emr S.D. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106:145–155.
- Katzmann D.J., Odorizzi G., Emr S.D. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:893-905.
- Kau J.H., Ting L.P. 1998. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J. Virol.* 72, 3796–3803.
- Kekule A.S., Lauer U., Weiss L., Luber B., Hofschneider P.H. 1993. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promotor signalling pathway” *Nature* **361**: 742–745
- Kenney J.M., von Bonsdorff C.H., Nassal M., Fuller S.D. 1995. Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure* 3, 1009–1119.
- Kikonyogo A.F., Bouamr M.L., Vana Y., Xiang A., Aiyar C., Carter J., 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. USA* 98:11199-11204
- Kock 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(8), 4867-74.
- Koonin E.V., Abagyan R.A. 1997. TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators. *Nat Genet.* 16(4): 330–331.
- Koschel M., Thomssen R., Bruss V. 1999. Extensive mutagenesis of the hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation. *J. Virol.* 73, 2153–2160.
- 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.
- Kuroki K., Eng F., Ishikawa T., Turck C., Harada F., Ganem D. 1995. gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* 270:15022-15028.

- Lan, Y.T., Li J., Liao W., Ou, J. 1999. Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus Cp in viral replication. *Virology* **259**, 342–348
- Lambert C., Prange R. 2001. Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing posttranslational pre-S translocation. *J Biol Chem* **276**, 22265–22272.
- Lambert C. 2001. Untersuchungen zur posttranslationalen PräS-Translokation des großen Hüllproteins des Hepatitis B Virus. Dissertation, Johannes Gutenberg Universität, Mainz
- Le Blanc I., Prevost M.C., Dokhelar M.C., Rosenberg A R. 2002. The PPPY motif of human T-cell leukemia virus type 1 Gag protein is required early in the budding process. *J. Virol.* **76**:10024–10029.
- Lemmon S.K., Traub L.M. 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 457–466.
- Lenhoff R.J., Summers J. 1994. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus” *J. Virol.* **68**: 4565–4571.
- Lewin D.A., Sheja D., Eng Ooib C., Whitneya J.A., Yamamotoa E., Chicionea L.M., Webstera P., Bonifacinob J.S., Mellmana I. 1998. Cloning, expression, and localization of a novel Q-adaptin-like molecule. *FEBS Letters* **435**: 263-268.
- Li J., Tong S., Wands J.R. 1996. Characterization of a 120-kilodalton pre-S binding protein as a candidate duck hepatitis B virus receptor. *J. Virol.* **70**: 6029-6038.
- Li L., Cohen S.N. 1996. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell* **85**:319–329.
- Liao W., Ou J.H. 1995. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J. Virol.* **69**:1025–1029.
- 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.
- Lopez-Cabrera M., Letovsky J., Hu K.Q., Siddiqui, A. 1990. Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13), 5069-73.
- Lu X., Block T. 2004. Study of the early steps of the Hepatitis B Virus life cycle. *Int. J. Med. Sci.* **1**(1): 21-33 21.

- Lu Z., Xu S., Joazeiro C., Cobb M.H., Hunter T. 2002. The PHD Domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol. Cell.* 9; 945-956.
- Mabit H., Schaller H. 2000. Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding. *J Virol.* 74:11472-8.
- Macias M.J., Hyvonen M., Baraldi E., Schultz J., Sudol M., Saraste M., Oschkinat H. 1996. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 382, 646-649.
- Marchese A., Benovic J.L. 2001. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem.* 276:45509-45512.
- Martindale D. 2004. Budding viral hijackers co-opt the endocytic machinery to make a getaway. *J Biol.* 3(1): 2.
- Martin-Serrano J., Zang T., Bieniasz P.D. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7:1313–1319.
- Martin-Serrano J., Zang T., Bieniasz P.D. 2003. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J. Virol.* 77:4794–4804.
- Martin-Serrano J., Yaravoy A., Perez-Caballero D., Bieniasz P.D. 2003. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12414–12419.
- Mason W.S., Seal G., Summers J. 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36(3), 829-36.
- Mason W.S., Taylor J.M., Seal G., Summers J.W. 1982. An HBV-like virus of domestic ducks. The Franklin Press, Philadelphia, Pa. p. 107-116.
- McAleer W.J., Bunyak E.B., Maigetter R.Z., Wampler D.E., Miller W.J., Hilleman M.R. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180
- Melegari M., Wolf S.K., Schneider R.J. 2005. Hepatitis B Virus DNA Replication Is Coordinated by Core Protein Serine Phosphorylation and HBx Expression. *J Virol.* 79(15): 9810-9820.
- Morita E., Sundquist W.I. 2004. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:395–425.
- Muratani M., Tansey W.P. 2003. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(3):192-201.

- Myers E.L., Allen J.F. 2002. Tsg101, an inactive homologue of ubiquitin ligase e2, interacts specifically with human immunodeficiency virus type 2 gag polyprotein and results in increased levels of ubiquitinated gag. *J. Virol.* 76: 11226–11235.
- Myszka, Sundquist W.I. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107:55–65.
- Nalefski E.A., Falke J.J. 1996. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity Protein. *Sci5*: 2375-2390.
- Nassal M. 1992. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.* 66:4107–4116.
- Nassal M., Schaller H. 1993. Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol.* 1:221–228.
- Nassal M. 1999. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 42:100–116.
- Nermut M. V., Zhang W. H., Francis G., Ciampor F., Morikawa Y., Jones I.M. 2003. Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy. *Virology* 305:219–227.
- Neurath A.R., Kent S.B., Strick N., Parker K. 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46(3), 429-36.
- Oess S., Hildt E. 2000. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther.* 7:750-758.
- Ono A., Freed E.O. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:13925–13930.
- Ono A., Freed E.O. 2004. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol.* 78:1552-1563.
- Orenstein J.M., Meltzer M.S., Phipps T., Gendelman H.E.. 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J. Virol.* 62:2578–2586.
- Ostapchuk P., Hearing P., Ganem D., 1994. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J.* 13, 1048–1057.

Ou J.H., Laub O., Rutter W.J. 1986. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(6), 1578-82.

Owens R.J., Dubay J.W., Hunter E., Compans R.W. 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3987–3991.

Paran N., Geiger B., Shaul Y. 2001. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J.* 20, 4443–4453.

Passmore L.A., Barford D. 2004. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* 379, 513–525

Patnaik A., Chau V., Wills J.W. 2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13069–13074.

Patzer E.J., Nakamura G.R., Simonsen C.C., Levinson A.D., Brands R. 1986. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 58(3): 884-892.

Pautrat G., Suzan M., Salaun D., Corbeau P., Allasia C., Morel G., Filippi P. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 infection of U937 cells promotes cell differentiation and a new pathway of viral assembly. *Virology* 179:749–758.

Pelchen-Matthews A., Kramer B., Marsh M. 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* 162:443–455.

Pelchen-Matthews A., Raposo G., Marsh M. 2004. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* 12:310-316.

Perez M., Craven R.C., de la Torre J.C. 2003. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12978–12983.

Petit M.A., Pillot J. 1985. HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J Virol.* 53(2): 543-551.

Petit M.A., Dubanchet S., Capel F., Voet P., Dauguet C., Hauser P. 1991. HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-preS1(21-47). *Virology* 180(2), 483-91.

Pickart C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70,503–533.

- 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.* Jan; 77(1): 416-422.
- Ponting C.P., Cai Y.D., Bork P. 1997. The breast cancer gene product TSG101: a regulator of ubiquitination? *J Mol Med.* 75(7): 467–469.
- Pontisso P., Ruvoletto M.G., Gerlich W.H., Heermann K.H., Bardini R., Alberti A. 1989. Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology* 173(2), 522-30.
- Pornillos O., Garrus J.E., Sundquist W.I. 2002. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol.* 12:569-579.
- Pornillos O., Alam S.L., Davis D.R., Sundquist W.I. 2002. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat. Struct. Biol.* 9:812–817.
- Prange R., Streeck, R.E. 1995. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* 14, 247–256
- Puffer B.A., Parent L.J., Wills J.W., Montelaro R.C. 1997. Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J. Virol.* 71:6541–6546
- Puffer B.A., Watkins S.C., Montelaro R.C. 1998. Equine infectious anemia virus Gag polyprotein late domain specifically recruits cellular AP-2 adapter protein complexes during virion assembly. *J. Virol.* 72:10218–10221.
- Pugh J.C., Di Q., Mason W.S., Simmons H., 1995. Susceptibility to duck hepatitis B virus infection is associated with the presence of cell surface receptor sites that efficiently bind viral particles. *J. Virol.* 69 4814–4822.
- Qiao M., Macnaughton T.B., Gowans, E.J. 1994. Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line. *Virology* 201(2), 356-63.
- 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(2), 613-20.
- Raiborg C., Rusten T.E., Stenmark H. 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 15:446–455.
- Ranganathan R., Lu K.P., Hunter T., Noel, J.P. 1997. Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* 89, 875-886.

- Raposo G., Moore M., Innes D., Leijendekker R., Leigh-Brown A., Benaroch P., Geuze H. 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic*. 3:718–729.
- Raymond C.K., Howald-Stevenson I., Vater C.A., Stevens T.H. 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell*. 3:1389–1402.
- Reggiori F., Pelham H.R. 2001. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J*. Sep 17; 20(18): 5176-5186.
- Ribeiro R.M., Lo A., Perelson, A.S. 2002. Dynamics of hepatitis B virus infection. *Microbes. Infect.* 4: 829-835
- Rieder S.E, Banta L.M, Kohrer K., McCaffery J.M., Emr S.D. 1996. Multilamellar endosome like compartment accumulates in the yeast vps28. *Mol Biol Cell*. 7:985–999.
- Robinson W.S. 1977. The genome of hepatitis B virus. *Annu Rev Microbiol* 31, 357-77. Thefeld, W., Seher, C., Dortschy, R. (1994). Hepatitis-B-Durchseuchung in der deutschen Bevölkerung. *Bundesgesundheitsblatt*, 37.Jg., 9, 373-377.
- Rocca A., Lamaze C., Subtil A., Dautry-Varsat A 2001. Involvement of the ubiquitin/proteasome system in sorting of the interleukin 2 receptor beta chain to late endocytic compartments. *Mol Biol Cell*. 12:1293-1301.
- 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
- Rossner M.T. 1992. Hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J. Med. Virol.* 36: 101–117.
- Rost M., Mann S., Lambert C., Döring T., Thome´ N., Prange R. 2006. γ 2-Adaptin, a Novel Ubiquitin-interacting Adaptor, and Nedd4 Ubiquitin Ligase Control Hepatitis B Virus Maturation. *J. Biol. Chem.* 281: 39,29297–29308. 2006
- Rotin D., Staub O., Haguenauer-Tsapis R. 2000. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol*. 176:1-17.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaller H., Fischer M. 1991. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 168, 21-39.

- Scheffner M., Nuber U., Huibregtse J.M. 1995. Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81 - 83
- Scheuring S., Rohricht R.A., Schoning-Burkhardt B., Beyer A., Muller S., Abts H.F., Kohrer K. 2001. Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking. *J Mol Biol.* 312:469–480.
- Schlicht H.J., Schaller H. 1989. Analysis of hepatitis B virus gene functions in tissue cultures and in vivo. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 144: 253–263
- Seeger C., Mason W.S. 2000. Hepatitis B Virus Biology *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(1): 51-68.
- Seeger C., Ganem D., Varmus H.E. 1986. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 232(4749), 477-84.
- Segura-Morales C., Pescia C., Chatellard-Causse C., Sadoul R. 2005. Tsg101 and Alix Interact with Murine Leukemia Virus Gag and Cooperate with Nedd4 Ubiquitin Ligases during Budding* *J Biol Chem* 280. 29 . 27004–27012.
- Shaul Y., Rutter W.J., Laub O. 1985. A human hepatitis B viral enhancer element. *Embo J* 4(2), 427-30.
- Shenoy S.K., McDonald P.H., Kohout T.A., Lefkowitz R.J. 2001. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* 294:1307-1313.
- Simon K., Lingappa V.R., Ganem D. 1988. Secreted hepatitis B surface antigen polypeptides are derived from a transmembrane precursor. *Cell Biol.*, 107, 2163-2168.
- Sotelo J. R., Porter K. R. 1959. An electron microscope study of the rat ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 327-342.
- Sprengel R., Kaleta E.F., Will H. 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62(10), 3832-9.
- Staub O., Gautschi I., Ishikawa T., Breitschopf K., Ciechanover A., Schild L., Rotin D. 1997. Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J.* 3; 16(21): 6325-6336.
- Strecker T., Eichler R., ter Meulen J., Weissenhorn W., Klenk H.D., Garten W., Lenz O. 2003. Lassa virus z protein is a matrix protein sufficient for the release of virus-like particles. *J. Virol.* 77:10700–10705.

Strack B., Calistri A., Accola M.A., Palu G., Gottlinger H.G.. 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13063–13068.

Sudol M., Bork P., Einbond A., Kastury K., Druck T., Negrini M., Huebner K., Lehman D. 1995. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module-the WW domain. *J. Biol. Chem.* 270:14733–14741.

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(2), 403-15.

Summers J., Smolec, J.M., Snyder R. 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(9), 4533-7.

Takatsu H., Sakurai M., Shin H.-W., Murakami K., Nakayama K. 1998. Identification and Characterization of Novel Clathrin Adaptor-related Proteins. *J Biol Chem*, Vol. 273: 38, 24693-24700.

Timmins J., Schoehn G., Ricard-Blum S., Scianimanico S., Vernet T., Ruigrok R.W.H., Weissenhorn W., 2003. Ebola Virus Matrix Protein VP40 Interaction with Human Cellular Factors Tsg101 and Nedd4. *J. Mol. Biol.* 326, 493–502.

Toh H., Hayashida H., Miyata T. 1983. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* 305(5937), 827-9.

Tong S., Li J., Wands J.R. 1999. Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor. *J Virol.* 73 (10): 8696-8702.

Tur-Kaspa R., Burk R.D., Shaul Y., Shafritz, D.A. 1986. Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(6), 1627-31.

Tuttleman J. S., Pourcel C., Summers J. 1986. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47: 451–460

Urata S., Noda T., Kawaoka Y., Yokosawa H., Yasuda J. 2006. Cellular Factors Required for Lassa Virus Budding *J Virol.*, 80 (8), 4191–4195

von Weizsäcker F., 2005. www.aerztezeitung.de

Whittaker G.R., Helenius A. 1998. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246: 1–23.

Whittaker G.R., Kann M., Helenius A. 2000. Viral entry into the nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 627-651

- Winberg G., Matskova L., Chen F., Plant P., Rotin D., Gish G., Ingham R., Ernberg I., Pawson T. 2000. Latent Membrane Protein 2A of Epstein-Barr Virus Binds WW Domain E3 Protein-Ubiquitin Ligases That Ubiquitinate B-Cell Tyrosine Kinases. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8526-8535
- Wynne S.A., Crowther R.A., Leslie A.G. 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* v3, p.771-780.
- Vana M.L., Tang Y., Chen A., Medina G., Carter C., Leis J. 2004. Role of Nedd4 and Ubiquitination of Rous Sarcoma Virus Gag in Budding of Virus-Like Particles from Cells. *J Virol.* 78(24): 13943-13953.
- van Deurs B., Holm P.K., Kayser L., Sandvig K., Hansen S.H. 1993. Multivesicular bodies in HEP-2 cells are maturing endosomes. *Eur J Cell Biol.* 61(2): 208–224.
- VerPlank L., Bouamr F., LaGrassa T.J., Agresta B., Kikonyogo A., Leis J., Carter C.A. 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55Gag. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:7724–7729.
- Van Sant C., Lopez P., Advani S.J., Roizman B. 2001. Role of Cyclin D3 in the Biology of Herpes Simplex Virus 1 ICP0 . *J Virol.* 75(4): 1888–1898.
- Vogt V.M. 2000. Ubiquitin in retrovirus assembly: Actor or bystander? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21; 97(24): 12945-12947.
- Varshavsky A. 1997 . The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci.* 22(10):383-7.
- Weber M., Bronsema V., Bartos H., Bosserhoff A., Bartenschlager R., Schaller H. 1994. Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol.* 68(5): 2994-2999.
- Wang G.H., Seeger C. 1992. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 71(4), 663-70.
- Wang Y., Pennock S., Chen X., Wang Z. 2002. Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 22:7279-7290.
- Wei Y., Tavis J.E., Ganem D. 1996. Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses. *J. Virol.* 70:6455–6458.
- Weiser B., Ganem D., Seeger C., H.E. Varmus. 1983. Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J. Virol.* 48:1-9.

WHO, Fact Sheet Hepatitis B. Fact Sheets, 2000. Nr. 204; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>

WHO, Hepatitis B, 2002. <http://www.who.int/emc>

Will H., Reiser W., Weimer T., Pfaff E., Buscher M., Sprengel R., Cattaneo R., Schaller H. 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 61(3), 904-11.

Wills J.W., Cameron C.E., Wilson C.B., Xiang Y., Bennett R.P., Leis J.. 1994. An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding. *J. Virol.* 68:6605–6618.

Wynne S.A., Crowther R.A., Leslie A.G. 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell* 3, 771–780.

Xie W., Li L., Cohen S.N. 1998. Cell cycle-dependent subcellular localization of the TSG101 protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with TSG101 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17; 95(4): 1595-1600.

Xiang Y., Cameron C.E., Wills J.W., Leis J. 1996. Fine mapping and characterization of the Rous sarcoma virus Pr76gag late assembly domain. *J. Virol.* 70:5695–5700.

Yamada G., Nakane P.K. 1977. Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by the peroxidase-labeled antibody method. *Lab Invest.* Jun;36(6):649-59

Yasuda J., Hunter E. 1998. A proline-rich motif (PPPY) in the Gag polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation-independent role in virion release. *J. Virol.* 72:4095–4103.

Yasuda J., Hunter E., Nakao M., Shida H. 2002. Functional involvement of a novel Nedd4-like ubiquitin ligase on retrovirus budding. *EMBO Rep.* 3:636–640.

Yasuda J., Nakao M., Kawaoka Y., Shida H. 2003. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J. Virol.* 77:9987–9992.

Yee J.K. 1989. A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* 246(4930), 658-61.

Yeh C.T., Liaw Y.F., Ou J.H. 1990. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* 64(12), 6141-7.

- Yoshimori T., Yamagata F., Yamamoto A., Mizushima N., Kabeya Y., Nara A., Miwako I., Ohashi M., Ohsumi M., Ohsumi Y. 2000. The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 11: 747–763.
- Yu M., Summers J.. 1991. A domain of the hepadnavirus capsid protein is specifically required for DNA maturation and virus assembly. *J. Virol*. 65:2511–2517.
- Yu M., Summers J., 1994a. Multiple functions of capsid protein phosphorylation in duck hepatitis B virus replication. *J. Virol*. 68, 4341–4348.
- Yu M., Summers J., 1994b. Phosphorylation of the duck hepatitis B virus capsid protein associated with conformational changes in the C terminus. *J. Virol*. 68, 2965–2969.
- Yuan B., Li X., Goff S.P.. 1999. Mutations altering the Moloney murine leukemia virus p12 Gag protein affect virion production and early events of the virus life cycle. *EMBO J*. 18:4700–4710.
- Yuan B., Campbell S., Bacharach E., Rein A., Goff S.P.. 2000. Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J. Virol*. 74:7250–7260.
- Yuan T.T., Shih C. 2000. A frequent, naturally occurring mutation (P130T) of human hepatitis B virus core antigen is compensatory for immature secretion phenotype of another frequent variant (I97L). *J. Virol*. 74, 4929–4932.
- Yuh C.H., Ting L.P. 1990. The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J Virol* 64(9), 4281-7.
- Zheng J., Schodel F., Peterson D.L., 1992. The structure of hepadnaviral core antigens. Identification of free thiols and determination of the disulfide bonding pattern. *J. Biol. Chem*. 267, 9422–9429.
- Zhou S.L., Standring D.N.. 1991. Production of hepatitis B virus nucleocapsidlike core particles in *Xenopus* oocytes: assembly occurs mainly in the cytoplasm and does not require the nucleus. *J. Virol*. 65:5457-5464.
- Zhou, S., Standring, D.N., 1992. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10046–10050.
- Zhou S., Yang S.Q., Standring D.N. 1992. Characterization of hepatitis B virus capsid particle assembly in *Xenopus* oocytes *J Virol*. 66(5):3086-92.

Zhoulim F., Seeger C. 1994. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J. Virol.* 68:6-13.

Zizioli D., Meyer C., Guhde G., Saftig P., von Figura K., Schu P. 1999. Early Embryonic Death of Mice Deficient in γ -Adaptin. *J Biol Chem*, Vol. 274, Issue 9, 5385-5390.

<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/hepb.html>

7. Abkürzungsverzeichnis

Grundsätzlich werden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Systeme International d'Unites) benutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Ein-Buchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der „International Union for Biochemistry“.

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AP	Adaptor-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	Bindungs- (Binding-) Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
C-Protein	Core-Protein
CAD	zytosolische Verankerungsdomäne (Cytosolic Anchorage Domain)
ccc	kovalent geschlossen zirkulär (covalently closed circular)
DHBV	Enten Hepatitis-B-virus (Duck Hepatitis B Virus)
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Sequenzwiederholung (Direct Repeat)
ECL	Enhanced Chemiluminiscense
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epithelial growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENH	Enhancer-Element
env	envelope
EPR	endogene Polymerase-Reaktion
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESCRT	endosomal sorting compex required for transport
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
Frag.	Fragment
GRE	Glucocorticoid-Responsive Element
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung (Hepes Buffered Saline)
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis B surface Antigen)

HBV	Hepatiti-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HECT	Homologous to E6-AP carboxy terminus
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ-1
hMTT _{Ta}	humaner Metallithionin IIa Promotor
HNF	Nukleärer Hepatozytenfaktor (hepatocyte nuclear factor)
HRPO	Meerrettich (horseradish) Peroxidase
Hsp	Hitzeschock-Protein
HTLV1	Humanes T-Zell Leukemia Virus Typ-1
kDa	Kilodalton
L-Protein	(large) großes HBV-Hüllprotein
M-Protein	(middle) mittleres HBV-Hüllprotein
MMDB	Molecular Modeling DataBase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
Nedd4	Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4
NLS	Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localisation Signal)
NP-40	Nonidet-40
NRE	Negativ-regulierendes Element
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen (Open Reading Frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pg	pregenomisch
PKC	Proteinkinase C
PNGaseF	Peptid:N-Glykosidase F
poly-A	Polyadenylierungssignal
PRO	Promotor-Element
rcDNA	offen-ringförmigen DNA
RING	really interesting novel gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	Ribonuklease H
RT	Reverse Transkriptase
S-Protein	(small) kleines HBV-Hüllprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Spacer-Region
SR	Signalerkennungs-Partikel-Rezeptor
SRP	Signalerkennungs-Partikel (Signal Recognition Particle)
SV40	Affen (Simian) Virus 40
TBS	Tris-HCl-gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TCA	Trichloresigsäure
TEMED	N, N, N, N',-Tetrametylendiamid
TLM	Translokationsmotiv
TM	Transmembrandomäne
TP	Terminales Protein
Tsg101	tumor susceptibility gene 101
Ub	Ubiquitin
WT	Wildtyp

