

**Virus-Wirt-Interaktionen während der
Morphogenese des Murinen Leukämievirus und
des humanen Hepatitis-B-Virus: Die Rollen
zellulärer ESCRT- und Rab-Proteine**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Christina Bartusch

geboren am 29.09.1987 in Mainz

Mainz, im Oktober 2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2014 bis Oktober 2017 im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Universitätsmedizin Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] [REDACTED] angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Mündliche Prüfung: 08.12.2017

*“Nothing in life has to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Virus-Wirt-Interaktionen.....	1
1.1.1 Endosomale Sortieremaschinerie (ESCRT)	4
1.1.1.1 ESCRT-Komponenten und Viren.....	8
1.1.2 Rab GTPasen.....	9
1.1.2.1 Rab GTPasen und Viren	13
1.2 Murines Leukämievirus (MLV).....	14
1.2.1 Genomstruktur und Aufbau des MLV	15
1.2.2 Lebenszyklus von MLV.....	17
1.2.3 MLV und zelluläre Wirtsfaktoren.....	18
1.3 Hepatitis-B-Virus (HBV)	19
1.3.1 Genomstruktur und Aufbau des HBV	20
1.3.2 Lebenszyklus von HBV.....	24
1.3.3 HBV und zelluläre Wirtsfaktoren.....	27
1.4 Zielsetzung.....	29

2	Material und Methoden	31
2.1	Material.....	31
2.1.1	Antikörper	31
2.1.2	Bakterienstämme.....	35
2.1.3	Chemikalien.....	35
2.1.4	Enzyme	35
2.1.5	Kits und Reagenzien	36
2.1.6	Lösungen und Puffer	37
2.1.7	Molekulargewichtsstandards	38
2.1.8	Oligonukleotide.....	38
2.1.8.1	Probes	40
2.1.8.2	Mutageneseprimer.....	40
2.1.8.3	Sequenzierungsprimer	41
2.1.9	siRNAs	41
2.1.10	Vektoren	44
2.1.11	Zelllinien	47
2.1.12	Software	47
2.2	Mikrobiologische Methoden	48
2.3	DNA- und RNA-Standardmethoden	48
2.3.1	Isolierung bakterieller DNA.....	48
2.3.2	Isolierung viraler DNA.....	48

2.3.3	RNA-Isolierung	48
2.3.4	cDNA-Synthese	48
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	49
2.3.6	Aufreinigung von DNA	49
2.3.7	Klonierung	49
2.3.8	Mutagenese.....	50
2.3.9	Sequenzierung	50
2.3.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
2.3.11	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	51
2.3.11.1	SYBR Green-basierte qPCR	52
2.3.11.2	TaqMan™-basierte Multiplex-qPCR.....	53
2.4	Zellkultur-Techniken	55
2.4.1	Kultivierung von Zellen	55
2.4.2	Transiente Transfektion von DNA.....	55
2.4.3	Transiente Transfektion von siRNA	56
2.5	Protein-Methoden	56
2.5.1	Aufarbeitung von Zellen und Überstand der MLV-Proben.....	56
2.5.2	Aufarbeitung von Zellen und Überstand der HBV-Proben.....	57
2.5.3	Immunpräzipitation der HBV-Proben	57
2.5.4	SDS-PAGE	60
2.5.5	Western Blot.....	60

2.5.6	Proteinbestimmung mittels Bradford-Test	61
2.5.7	Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH-Test	62
2.5.8	Analyse von löslichen und unlöslichen Proteinfractionen	62
2.5.9	Immunfluoreszenz	62
2.5.10	MLV Infektions-Test.....	63
2.6	Statistik	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Untersuchungen zur Rolle von ESCRT-Komplexen in der Morphogenese und Ausschleusung von MLV	65
3.1.1	Herstellung des retroviralen Vektors MLV.WT ^{FLAG/HA}	66
3.1.2	Die Rolle von MVB-Adaptoren und ESCRT-I bei der Reifung und Ausschleusung von MLV.....	68
3.1.3	Die Rolle von ESCRT-II bei der Reifung und Ausschleusung von MLV ..	70
3.1.4	Die Rolle von ESCRT-III bei der Reifung und Ausschleusung von MLV .	71
3.1.5	Die Rolle von ESCRT-III bei der Prozessierung des Gag-Polyproteins von MLV.....	74
3.1.6	Die besondere Rolle der ESCRT-III-Untereinheit CHMP1A bei der Reifung und Ausschleusung von MLV	76
3.1.7	Zusammenfassung zur Rolle von ESCRT-Komplexen in der Reifung und Ausschleusung von MLV.....	80
3.2	Untersuchungen zur Rolle von Rab GTPasen in der Morphogenese und Ausschleusung von HBV	81
3.2.1	Rollen der Rab GTPasen Rab1A, Rab18 und Rab34 bei der Reifung und Ausschleusung von HBV: RNA-Interferenz- und Überexpressionsstudien.....	82

3.2.2	Die Rolle der Rab GTPase Rab6A bei der Reifung und Ausschleusung von HBV: RNA-Interferenz-, Überexpressions- und Immunfluoreszenzstudien	87
3.2.3	Etablierung eines Rescue-Protokolls zur Validierung von Depletions-Effekten anhand der Rab6A GTPase	91
3.2.4	Die Rolle der Rab GTPase Rab33B bei der Reifung und Ausschleusung von HBV	98
3.2.4.1	Rab33B-Inaktivierung hat keinen Einfluss auf die Bildung und Ausschleusung subviraler HBV-Partikel	98
3.2.4.2	Rab33B-Inaktivierung hemmt die Bildung und Ausschleusung viraler HBV-Partikel.....	101
3.2.4.3	Rab33B-Inaktivierung und Rescue: Phänomen einer Ko-Depletion	103
3.2.4.4	Rab33B-Inaktivierung beeinflusst die Bildung/Stabilität von HBV-Kapsiden	105
3.2.4.5	Rab33B-Inaktivierung durch dominant-negative Mutanten hemmt die Bildung und Ausschleusung von HBV	105
3.2.4.6	Rab33B-Expression wird durch die HBV-Replikation positiv reguliert.....	107
3.2.4.7	Rab33B-Inaktivierung und HBV-Replikationszyklus: Untersuchungen zur Transkription, Translation und Löslichkeit der Virusproteine	109
3.2.4.8	Rab33B-Inaktivierung durch short hairpin RNA-Interferenz.....	110
3.2.4.9	Rab33B-Inaktivierung und intrazelluläres Verteilungsmuster von HBV.....	113
3.2.4.10	Rab33B und GAPs: OATL1-Inaktivierung begünstigt die Reifung und Ausschleusung von HBV	116
3.2.4.11	Rab33B blockiert auch die Ausschleusung von HBV-	

Nukleokapsiden.....	118
4 Diskussion	120
4.1 MLV-Morphogenese: Abhängigkeit von Tsg101, CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B	120
4.1.1 MLV-Morphogenese: Modell	125
4.2 HBV-Morphogenese: Die Rollen der Rab GTPasen Rab1A, Rab18, Rab34, Rab6A und Rab33B	127
4.2.1 Rab1A ist an der Bildung von Nukleokapsiden beteiligt	127
4.2.2 Rab18 ist am Transport von Hüllproteinen und/oder Core/Nukleokapsiden zum Syntheseort/Sprossungsort beteiligt	128
4.2.3 Rab34 ist an der Umhüllung von Nukleokapsiden beteiligt.....	129
4.2.4 Rab6A reguliert den Transport von Nukleokapsiden zum Ort der Umhüllung.....	130
4.2.5 Rab33B reguliert den Transport von Core zum Syntheseort von Nukleokapsiden und/oder den Transport von Nukleokapsiden zum Sprossungsort.....	132
4.2.6 HBV-Morphogenese: Modell	138
5 Zusammenfassung.....	142
6 Summary.....	145
7 Literaturverzeichnis	147

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die ESCRT-Maschinerie	5
Abb. 2 Zelluläre Funktionen der ESCRT-Komplexe	7
Abb. 3 Rab GTPase Aktivitätskreislauf.....	11
Abb. 4 Funktionen der Rab GTPasen im Vesikeltransport	13
Abb. 5 Genomstruktur von MLV	16
Abb. 6 Genomstruktur von HBV	22
Abb. 7 Replikationszyklus von HBV	26
Abb. 8 Schematische Darstellung des MLV.WT ^{FLAG/HA} Vektors	67
Abb. 9 Schematische Darstellung der MLV-Konstrukte.....	68
Abb. 10 Die Rolle von ESCRT-I, Alix und Nedd4-1 bei der Reifung und Ausschleusung von MLV	69
Abb. 11 Die Rolle von ESCRT-II bei der Reifung und Ausschleusung von MLV	71
Abb. 12 Überprüfung der Spezifität der CHMP siRNAs.....	72
Abb. 13 Die Rolle von ESCRT-III bei der Reifung und Ausschleusung von MLV	73
Abb. 14 Überprüfung der Isoform-Spezifität der CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B siRNAs	74
Abb. 15 Die Rollen von ESCRT-III-Untereinheiten während der MLV Gag-Polyprotein Prozessierung	76
Abb. 16 Die ESCRT-III-Untereinheit CHMP1A, jedoch nicht CHMP1B, hemmt die Ausschleusung von MLV	78
Abb. 17 Die ESCRT-III-Untereinheit CHMP1A beeinträchtigt den intrazellulären	

Transport von MLV.....	79
Abb. 18 Struktur des 1.1-fachen HBV-Genoms.....	82
Abb. 19 Effekte der Depletion von Rab1A, Rab18 und Rab34 auf die Reifung und Ausschleusung von HBV.....	84
Abb. 20 Effekte der Überexpression von Rab1A.DN, Rab18.DN und Rab34.DN auf die Reifung und Ausschleusung von HBV.....	86
Abb. 21 Effekte der Depletion von Rab6A und Überexpression von Rab6A.DN auf die Reifung und Ausschleusung von HBV.....	88
Abb. 22 Effekt der Depletion von Rab6A auf das intrazelluläre Verteilungsmuster von HBV.....	90
Abb. 23 Rab6A-Depletion und -Rekonstitution: Protein-Expressionsanalysen.....	92
Abb. 24 Schematische Darstellung des Rescue-Vektors zur attenuierten Proteinexpression.....	93
Abb. 25 Rab6A-Depletion und -Rekonstitution: HBV-Replikationsanalysen.....	95
Abb. 26 Optimierung der Rab6A-Depletion und -Rekonstitution: HBV-Replikationsanalysen.....	97
Abb. 27 Effekt der Depletion von Rab33B auf die Reifung und Ausschleusung subviraler HBV-Partikel.....	99
Abb. 28 Effekt der Depletion von Rab33B auf die Zell-Morphologie.....	100
Abb. 29 Effekt der Depletion von Rab33B auf die Reifung und Ausschleusung viraler HBV-Partikel.....	102
Abb. 30 Rab33B-Depletion und -Rekonstitution: Ko-Depletion von Effektor-Proteinen.....	104
Abb. 31 Effekt der Depletion von Rab33B auf den Zusammenbau/Stabilität von HBV-	

Kapsiden	105
Abb. 32 Effekte der Überexpression von Rab33B.DN auf die Reifung und Ausschleusung von HBV	107
Abb. 33 Die HBV-Replikation erhöht die Transkription und Translation von Rab33B	108
Abb. 34 Effekte der Rab33B Depletion auf die Transkription, Proteinexpression und Löslichkeit von HBV	110
Abb. 35 Rab33B-Depletion durch short hairpin RNA-Interferenz	111
Abb. 36 Schematische Darstellung des sh.HA-Bet1 Vektors	113
Abb. 37 Effekte der Depletion von Rab33B auf die intrazelluläre Verteilung der HBV-Proteine	115
Abb. 38 Depletion von OATL1, ein Rab33B-spezifisches GAP	116
Abb. 39 Effekte der OATL1-Depletion und der OATL1/Rab33B-Ko-Depletion die Reifung und Ausschleusung von HBV	117
Abb. 40 Effekt der Rab33B-Depletion auf die Bildung und Ausschleusung von HBV-Nukleokapsiden.....	119
Abb. 41 MLV Virionen- und VLP-Morphogenese: Die Beteiligung von ESCRT-Komponenten	126
Abb. 42 Interaktion von Rab33B, Atg5/12/16L1 und Core an autophagosomalen Membranen	135
Abb. 43 HBV-Morphogenese: Modell	141

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnungen in Western Blot (WB), Immunfluoreszenz (IF) und Immunpräzipitation (IP).....	31
Tab. 2 Sekundär-Antikörper im Western Blot	34
Tab. 3 Sekundär-Antikörper in der Immunfluoreszenz	34
Tab. 4 Enzyme	35
Tab. 5 Kits und Reagenzien	36
Tab. 6 Wichtige Lyse- und Probenpuffer	37
Tab. 7 Oligonukleotide in PCR und qPCR.....	38
Tab. 8 Probes in der TaqMan™-basierten qPCR	40
Tab. 9 Mutageneseprimer	40
Tab. 10 Sequenzierungsprimer	41
Tab. 11 siRNA	41
Tab. 12 Vektoren.....	44
Tab. 13 DNA-Transfektion.....	55
Tab. 14 siRNA-Transfektion	56
Tab. 15 Immunpräzipitation der HBV-Proben.....	59
Tab. 16 Beteiligung von MVB-Adaptorproteinen und ESCRT-Komponenten an der Ausschleusung von subviralen MLV-Partikeln (VLPs).....	66

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
Aq. bidest.	bidestilliertes Wasser
Bet1	engl. <i>blocked early in transport 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cccDNA	kovalent-geschlossene zirkuläre DNA (engl. <i>covalently closed circular DNA</i>)
CHMP	engl. <i>charged multivesicular body protein</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxyl-Ende
Con	Kontrolle (engl. <i>control</i>)
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAP	engl. <i>ELL-associated Proteine</i>
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (engl. <i>enhanced chemiluminescence</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eh.	ehemals
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
Env	Hülle (engl. <i>Envelope</i>)
ESCRT	endosomale Sortiermaschine (engl. <i>endosomal sorting complex required for transport</i>)

ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Fa.	Firma
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm; bei Zentrifugation Erdschwerebeschleunigung
G	Guanin
Gag	engl. <i>group antigenes</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl. <i>green fluorescent protein</i>)
GTP	Guanidintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HBcAg	Hepatitis-B-Core-Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (engl. <i>hepatitis B surface antigen</i>)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Leberkarzinom
HEK 293T	engl. <i>human embryonic kidney cells</i>
HepG2	engl. <i>human hepatocellular carcinoma cells</i>
HRS	engl. <i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HuH-7	engl. <i>human hepatocellular carcinoma cells</i>
IC	Intermediärkompartiment
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	großes HBV-Hüllprotein
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. <i>multiple cloning site</i>)
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter

MLV	Murines Leukämievirus
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	Multivesikulärer Körper (engl. <i>multivesicular body</i>)
NIH 3T3	engl. <i>murine fibroblast cells</i>
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
Nt	Nukleotid
NTCP	engl. <i>sodium taurocholate co-transporting polypeptide</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OATL1	engl. <i>ornithine aminotransferase-like 1</i>
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl. <i>quantitative real-time PCR</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pgRNA	prägenomische RNA
POX	Peroxidase
Rab	engl. <i>Ras-related in brain</i>
Ras	engl. <i>rat sarcoma</i>
rcDNA	nicht-kovalent geschlossene zirkuläre DNA (engl. <i>relaxed circular DNA</i>)
rcf	Relative Zentripetalbeschleunigung (engl. <i>relative centrifugal force</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RIPA	Radioimmunpräzipitation-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	kleines HBV-Hüllprotein
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannte

SVP	subviraler Partikel
T	Thymin
TM	Transmembran-Domäne
U	engl. <i>unit(s)</i>
UTR	untranslatierter Bereich
u.a.	unter anderem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
üN	über Nacht
V	Volt
VLP	Virus-ähnlicher Partikel (engl. <i>virus-like particle</i>)
Vps	engl. <i>vacuolar protein sorting</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Virus-Wirt-Interaktionen

Das Gelbfieber-Virus war das erste beschriebene humane Virus im Jahre 1901 und bis heute sind etwa 219 Virusarten bekannt, die Menschen infizieren können (Woolhouse *et al.*, 2012). Jedes Jahr werden etwa drei bis vier neue humane Virusarten identifiziert, wodurch Viren etwa 75% der neu entdeckten humanen Pathogene darstellen (Woolhouse & Gaunt, 2007; Woolhouse *et al.*, 2012). Virusinfektionen sind häufig immer noch eine globale Bedrohung für die menschliche Gesundheit und Entwicklung, denn gegen viele Viren liegen noch keine präventiven Impfstoffe und/oder ausreichende antivirale Therapien vor. Viren besitzen weder eine eigenständige Replikation noch einen eigenen Stoffwechsel und sind daher auf zelluläre Wirtsfaktoren angewiesen, um ihre Verbreitung zu gewährleisten. Deswegen ist es wichtig, zelluläre Wirtsfaktoren zu identifizieren, woraus sich möglicherweise neue Angriffspunkte in der antiviralen Medikamentenentwicklung ergeben.

Das humane Proteom umfasst nach dem *human proteome map portal* derzeit 30057 identifizierte Proteine (Kim *et al.*, 2014), wodurch sich ein enorm großer Pool zur möglichen Manipulation durch Viren ergibt. Das Proteom einer Zelle regelt alle wichtigen Vitalprozesse, die u.a. Proteinhomöostase durch Ubiquitin-Proteasom-System und Autophagie, Transkription und Translation, Proteintransport, Signaltransduktion, metabolische Prozesse, Zellzyklus und Apoptose umfassen. Dazu verfügt die Zelle über ein Netzwerk von Proteinen, die sich zu komplexen Protein-Maschinerien zusammensetzen und spezifische Funktionen wahrnehmen. Viren haben gezielte Strategien entwickelt, um zelluläre Protein-Maschinerien für den Viruseintritt, den spezifischen intrazellulären Transport, die Replikation, und die Bildung und Ausschleusung von Viruspartikeln zu missbrauchen.

Die Adsorption eines Virus kann entweder durch Membranfusion oder Endozytose erfolgen. Um die Schritte der Penetration, Kapsid-Destabilisierung und *Uncoating* voranzutreiben, nutzt das Virus u.a. zelluläre Signalkaskaden zu seinem Vorteil aus (Marsh & Helenius, 2006). Durch die Bindung an Zell-Rezeptoren, niedrigen pH-Wert

oder Modifikationen durch Enzyme werden Konformationsänderungen herbeigeführt (Marsh & Helenius, 2006). Die Internalisierung des Simian-Virus 40 (SV40) durch Caveolae/Raft-vermittelte Endozytose wird zum Beispiel von mindestens fünf verschiedenen Kinasen reguliert (Pelkmans *et al.*, 2005). Zur Replikation der viralen Genome bedienen sich Viren oft der Transkription- und Translationsmaschinerien der Wirtszelle. Die Bildung neuer Viruspartikel bedarf einer präzisen Koordination im Transport aller benötigten viralen Proteine zum Ort des Zusammenbaus (Marsh & Helenius, 2006). Die Freisetzung nicht-umhüllter Viruspartikel durch Zellyse galt lange als einzig möglicher Mechanismus. In jüngeren Studien konnte allerdings beobachtet werden, dass Picornaviren, wie Poliovirus, Coxsackie-Virus und Hepatitis-A-Virus (HAV) und andere nicht-umhüllte RNA-Viren nicht durch Zellyse ausgeschleust wurden (Bird & Kirkegaard, 2015). Auf der Suche nach alternativen Ausschleuserouten entdeckten Jackson *et al.* (2005), dass Polioviren einzelne Schritte der Makroautophagie instrumentalisieren. Die erhöhte Replikation in Poliovirus-infizierten Zellen ging mit der Bildung autophagosomaler Membranen einher (Jackson *et al.*, 2005). Umhüllte Viruspartikel verlassen die Zelle dagegen durch Knospung an intrazellulären Membranen oder der Plasmamembran mit anschließender Freisetzung (Marsh & Helenius, 2006).

Virusinfektionen rufen komplexe Immunantworten in der Zelle hervor, die zur Eliminierung des Pathogens führen sollen. Viren haben daher Strategien entwickelt, um das angeborene und adaptive Immunsystem zu sabotieren oder ihm zu entkommen. Zu den viralen Strategien der Immunevasion gehören u.a. die Hemmung des Interferonsystems, Zerstörung von Immunzellen, Blockierung von T-Zell-Rezeptoren und Latenzmechanismen. RNA-Viren haben aufgrund der hohen Fehlerrate der RNA-Polymerasen eine hohe genetische Variabilität (Drake & Holland, 1999). Durch diese Mutationen ist eine schnelle Immunevasion möglich (Alcami & Koszinowski, 2000). Das RNA-Genom ist in der Größe limitiert, sodass es nur wenig spezifische virale Proteine gibt, die der zellulären Immunantwort entgegen wirken (Alcami & Koszinowski, 2000). Als Beispiel hemmt das Humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) die Antigenpräsentation durch die Expression der viralen Gene *tat* (*trans-activator of transcription*), *vpu* (*viral protein U*) und *nef* (*negative regulatory factor*). Dadurch werden Transkription (Weissman *et al.*, 1998) und Synthese (Kerkau *et al.*,

1997) des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC-Klasse-I) reduziert und dessen Endozytose gefördert (Dirk *et al.*, 2016). Im Falle von DNA-Viren erlaubt die Genomgröße eine noch zielgerichtetere Expression viraler Proteine gegen das Immunsystem des Wirts (Alcami & Koszinowski, 2000). Das Humane Cytomegalievirus (HCMV) induziert bspw. die Expression des antiviralen zellulären Proteins Viperin. Das virale Protein vMIA (*viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis*) bindet Viperin, was in einer Re-Lokalisation von Viperin vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) in Mitochondrien resultiert. Dort beeinflusst es den Energiehaushalt der Zelle negativ und verstärkt die Infektion. HCMV schafft es mit diesem Mechanismus, die physiologisch antivirale Wirkung von Viperin in eine antizelluläre Wirkung umzuwandeln (Seo *et al.*, 2011). Einige Viren sind in der Lage lebenslange, persistente Infektionen auszubilden. Dabei unterscheidet man zwischen einer latenten (ruhend, sich nicht vermehrend) und einer chronischen (kontinuierliche Replikation) Infektion. Prominente Beispiele für humanpathogene Viren, die persistente Infektionen verursachen können, sind HIV-1, HCMV, Hepatitis-B-Virus (HBV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Humane Papillomviren (HPV).

Viren nutzen also viele Strategien, die perfekt auf ihre spezifischen Bedürfnisse zugeschnitten sind. Durch selektive Manipulation wichtiger Transport-Routen der Zelle stellen Viren sicher, zur richtigen Zeit am richtigen Ort des Zusammenbaus oder der Knospung zu sein. Sie rekrutieren gezielt Komponenten der einzelnen Transportwege, wie den Clathrin COPI (*coatamer protein complex*)- I und -II Komplex, die endosomale Sortierungsmaschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT) und die Rab GTPasen, zu bestimmten Kompartimenten in der Zelle (de Armas-Rillo *et al.*, 2016). Dabei bedarf es einem engen Zusammenspiel zwischen den viralen und zellulären Proteinen oder Zellmembranen. Um Einblicke in diese faszinierende Feinregulation zu erhalten, sollten in dieser Arbeit zwei große Protein-Maschinerien in den Fokus rücken: die ESCRT-Maschinerie und die Rab GTPasen. ESCRT-Komplexe spielen u.a. in der Biogenese Multivesikulärer Körper (*multivesicular bodies*, MVBs) eine wesentliche Rolle, während die Rab GTPasen für den intrazellulären Vesikeltransport wichtig sind.

1.1.1 Endosomale Sortieremaschinerie (ESCRT)

Die ESCRT-Maschinerie wurde zuerst in Hefen beschrieben (Raymond *et al.*, 1992). Durch genetische *Screens* gelang die Entschlüsselung der Bedeutung der ESCRT-Proteine für die Sortierung von Transmembranproteinen in intraluminale Vesikel (ILVs), die dann in das Lumen von Endosomen abgeschnürt werden (Katzmann *et al.*, 2001; Odorizzi, 2015). Wie in Abb. 1 gezeigt, setzt sich die ESCRT-Kaskade aus den heteromeren ESCRT-0, -I, -II und -III und der VPS4 AAA-ATPase (weiterhin als VPS4 bezeichnet) zusammen (Hurley, 2015). In der ESCRT-Kaskade werden ubiquitinierte Frachtmoleküle von ESCRT-0 über ESCRT-I auf ESCRT-II übertragen, bevor ESCRT-III zusammen mit VPS4 zur Membranabschnürung rekrutiert werden.

Der heterodimere ESCRT-0 Komplex besteht aus den Proteinen HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) und STAM (*signal transducing adaptor molecule*). HRS und STAM enthalten Ubiquitin-Interaktions-Motive (UIMs), die der Konzentration von ubiquitinierten Frachtmolekülen dienen (McCullough *et al.*, 2013). HRS kann außerdem mit der N-terminalen Ubiquitin-E2-Variant-Domäne (UEV) von TSG101 (*tumor susceptibility gene*) und Clathrin interagieren (Bache *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Raiborg *et al.*, 2006). Zusätzlich vermittelt HRS das Andocken an endosomale Membranen durch die Bindung des Ankerlipids Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) (Raiborg *et al.*, 2001). ESCRT-I ist ein heterotetramerer Komplex, der sich aus TSG101, VPS28 (*vacuolar protein sorting*), VPS37 und MVB12 zusammensetzt. Die C-terminale Domäne von VPS28 bindet ESCRT-II über die GLUE (*GRAM-like ubiquitin-binding in ELL-associated protein 45*)-Domäne von EAP45 (*ELL-associated protein 45*) (Gill *et al.*, 2007; McCullough *et al.*, 2013). ESCRT-II ist ein Heterotetramer-Komplex mit EAP45, EAP30 und zwei Untereinheiten EAP20, angeordnet in einer charakteristischen Y-Struktur (Teo *et al.*, 2004). EAP45 bindet neben ESCRT-I auch PI(3)P und Ubiquitin. EAP20 rekrutiert und bindet CHMP6 (*charged multivesicular body protein*), eine ESCRT-III-Untereinheit (Teo *et al.*, 2004; Yorikawa *et al.*, 2005). Der ESCRT-II-Komplex dient als Brücke zwischen ESCRT-I und ESCRT-III (McCullough *et al.*, 2013). Bro1-Proteine, wie ALIX (*ALG-2-interacting protein X*), sind ESCRT-Adaptorproteine und können die ESCRT-III-Untereinheiten CHMP4 und CHMP5 direkt rekrutieren (McCullough *et al.*, 2013). ESCRT-III besteht

aus den vier „Kern“-Untereinheiten CHMP6, CHMP4(A-C), CHMP3 und CHMP2(A,B), die in dieser Reihenfolge rekrutiert werden (Peel *et al.*, 2011). Weitere ESCRT-III assoziierte, regulatorische Proteine sind CHMP1(A,B), CHMP5, CHMP7 und IST1 (*increased sodium tolerance-1*) (Peel *et al.*, 2011). Der wachsende ESCRT-III-Komplex interagiert mit Deubiquitinasen und VPS4 (Peel *et al.*, 2011).

Die ESCRT-Maschinerie kann in „früh“ und „spät“ agierende Komplexe unterteilt werden (McCullough *et al.*, 2013). Während die „frühen“ ESCRT-Komplexe ESCRT-0, -I, -II und Bro1-Proteine in der Sortierung von Frachtmolekülen und der Rekrutierung von ESCRT-III zusammen mit VPS4 fungieren, übernehmen ESCRT-III und VPS4 die essentiellen Funktionen der Membran-Remodelierung und Abschnürung, sowie den Abbau und das Recycling von ESCRTs (McCullough *et al.*, 2013).

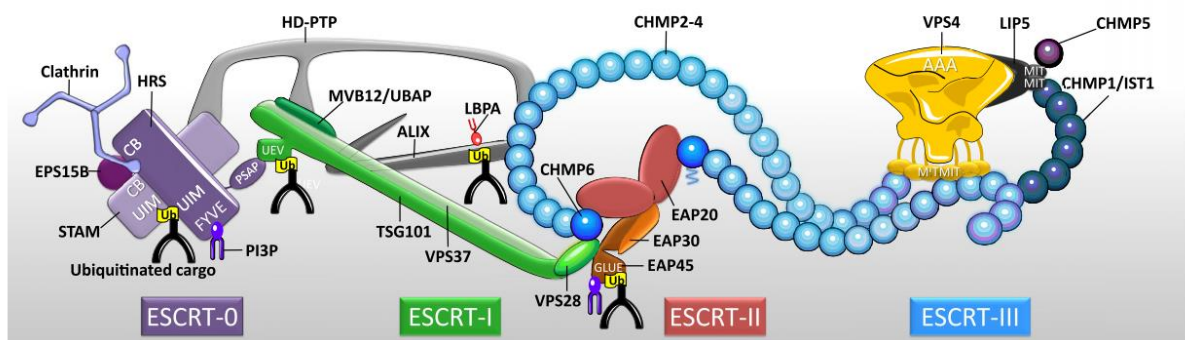


Abb. 1 Die ESCRT-Maschinerie

Dargestellt ist der Aufbau und vermutliche Interaktionen der ESCRT-Maschinerie. ALIX: *ALG-2-interacting protein X*; CB: Clathrin-Box Motiv; CHMP: *charged multivesicular body protein*; EAP: *ELL-associated protein*; FYVE: Fab1p/YOTB/Vac1p/EEA1 Domäne; GLUE: *GRAM-like ubiquitin-binding in ELL-associated protein*; HD-PTP: *His domain-containing tyrosine phosphatase*; HRS: *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*; IST1: *increased sodium tolerance-1*; LBPA: Lysophosphatidsäure; LIP5: *Lyst-interacting protein 5*; Interaktion mit Mikrotubuli, Transport-Domäne; MVB: Multivesikulärer Körper; PI3P: Phosphatidylinositol-3-Phosphat; STAM: *signal transducing adaptor molecule*; TSG101: *tumor susceptibility gene*; Ub: Ubiquitin; UEV: Ubiquitin-E2-Variant-Domäne; UIM: Ubiquitin-Interaktions-Motiv; VPS: *vacuolar protein sorting*; VPS4: AAA-ATPase. Verändert nach: Christ *et al.*, 2017.

ESCRT-Komplexe sind als Schlüsselregulatoren an vielen zellulären Prozessen beteiligt (Abb. 2). Die klassischen ESCRT-Funktionen umfassen die MVB-Biogenese, die Abschnürung umhüllter Viren von der Plasmamembran, und die Abschnürung von Zellen während der Zellteilung in Säugetieren und einigen Archaeen (Hurley, 2015). Bei der Bildung von MVBs werden ILVs in das Lumen von Endosomen abgeschnürt (Katzmann *et al.*, 2001). Eine der ersten Studien zur Notwendigkeit von ESCRT bei der Virus-Abschnürung fand heraus, dass das HIV-1 Gag-Polyprotein die ESCRT-I-

Untereinheit Tsg101 rekrutiert und bindet, wodurch die Knospung von der Plasmamembran vermittelt wird (Garrus *et al.*, 2001; VerPlank *et al.*, 2001). Während der Zytokinese werden Tsg101 und Alix durch Interaktion mit dem Zentrosomenprotein Cep55 zu der Trennzone rekrutiert (Carlton & Martin-Serrano, 2007). Alix interagiert wiederum mit ESCRT-III (Morita *et al.*, 2007). ESCRT-III katalysiert dann zusammen mit dem Enzym Spastin die Membranabschnürung (Yang *et al.*, 2008; Connell *et al.*, 2009). In den letzten Jahren wurden den ESCRT-Komplexen neue Einsatzorte und Funktionen zugesprochen. So ist die ESCRT-Maschinerie auch an den Prozessen der Autophagie beteiligt (Hurley, 2015; Lefebvre *et al.*, 2017). Die endosomale Mikroautophagie findet während der MVB-Biogenese unter der Verwendung der ESCRT-I und -III-Systeme und dem Chaperon hsc70 (*heat shock protein*) statt (Sahu *et al.*, 2011). Während der Makroautophagie fördert die ESCRT-Maschinerie die Bildung von MVBs, die mit Autophagosomen zu Amphisomen fusionieren können (Lefebvre *et al.*, 2017). Neben einer möglichen Interaktion mit Atg-(*Autophagy-related protein*)-Proteinen können ESCRT-Proteine auch an der Membran-Schließung der Phagophore beteiligt sein (Lu *et al.*, 2013; Murrow *et al.*, 2015; Lefebvre *et al.*, 2017). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ESCRT-Komplexe für die Bildung von RNA-Replikations-Kompartimenten für RNA-Pflanzenviren, wie das Brommosaikvirus (BMV), notwendig sind (Diaz *et al.*, 2015; Hurley, 2015). Für die nukleäre Ausschleusung des Herpesvirus EBV bedarf es einer Beteiligung von ESCRT-Komplexen. EBV wird im Nukleus zusammengebaut und kann die nukleäre Kernpore (*nuclear pore complex*, NPC) aufgrund seiner Größe nicht passieren. Daher rekrutiert das virale BFRF 1-Protein Alix, welches seinerseits die ESCRT-III-Untereinheit CHMP4B rekrutiert und so die EBV-Abschnürung von der nukleären Membran ermöglicht (Lee *et al.*, 2012; Hurley, 2015). Zur Aufrechterhaltung und Reformation der nukleären Membran während der Zellteilung und Überwachung der Integrität von NPC kommen die ESCRT-III-Untereinheiten und VPS4 zum Einsatz (Hurley, 2015; Christ *et al.*, 2017). Beim neuronalen *Pruning* werden synaptische Verbindungen, die nicht mehr funktional oder redundant sind, abgebaut (Hurley, 2015). Eine kürzliche Studie im Kontext mit *Drosophila* zeigte, dass die ESCRT-Maschinerie diesen Prozess durch Herunterregulation des Zelloberflächen-Proteins Neuroglian und des Hedgehog-Rezeptors Patched fördert (Zhang *et al.*, 2014; Issman-Zecharya & Schuldiner, 2014;

Hurley, 2015; Christ *et al.*, 2017). Des Weiteren sind die ESCRT-Komplexe an Reparaturprozessen der Plasmamembran beteiligt (Hurley, 2015). Binnen Sekunden werden Alix, ESCRT-III und VPS4 rekrutiert und schnüren den beschädigten Membranteil zum extrazellulären Raum hin ab (Jimenez *et al.*, 2014). ESCRT-Komplexe spielen auch bei der Ausschleusung von Exosomen und Mikrovesikeln (Ektosomen) eine wichtige Rolle (Hurley, 2015). Eine der Hauptaufgaben von Exosomen und Mikrovesikeln besteht in der Vermittlung interzellulärer Kommunikation (Christ *et al.*, 2017). Wenn MVBs mit der Plasmamembran fusionieren, werden die enthaltenen ILVs als Exosomen freigesetzt. Während der MVB-Biogenese regulieren die ESCRT-Komplexe die Verpackung von Frachtmolekülen in ILVs (Christ *et al.*, 2017). Mikrovesikel werden dagegen ESCRT-abhängig direkt von der Plasmamembran abgeschnürt, ähnlich den Mechanismen der Plasmamembran-Reparatur oder der Virus-Abschnürung (Christ *et al.*, 2017).

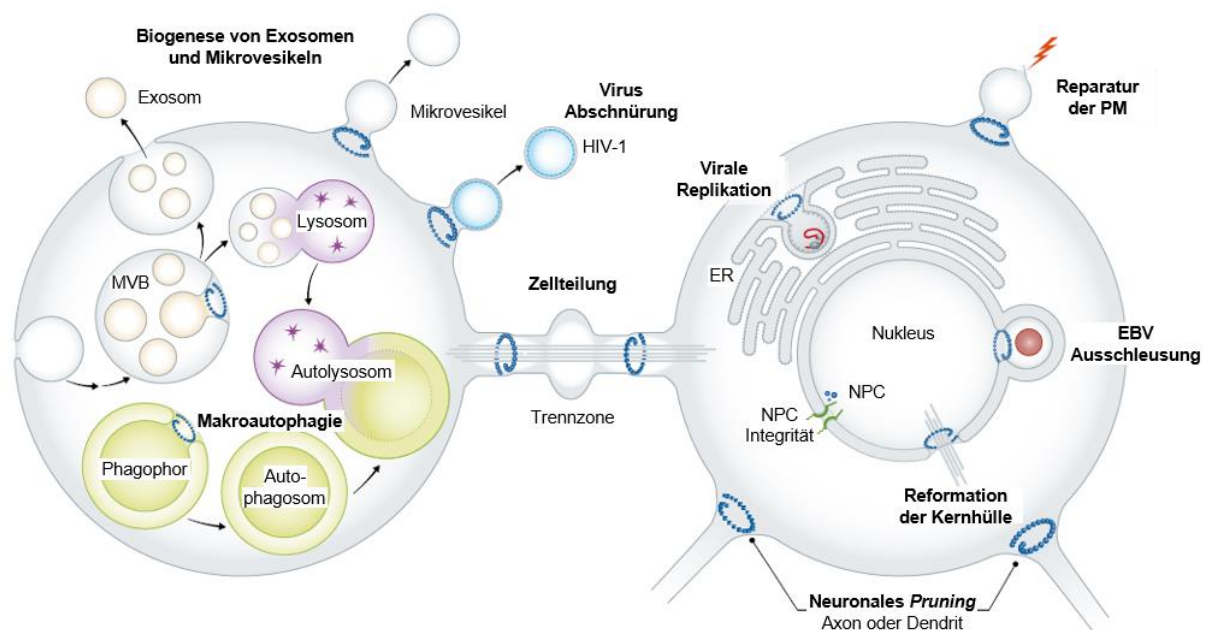


Abb. 2 Zelluläre Funktionen der ESCRT-Komplexe

Überblick der ESCRT-Funktionen: Biogenese von Exosomen und Mikrovesikeln, Abschnürung von Viren, Makroautophagie, virale Replikation, nukleäre Ausschleusung von Viren, Neuronales *Pruning*, Reformation der Kernhülle, Reparatur der Plasmamembran (PM) und Zellteilung. Die Abschnürung ist mit einem blauen Kreis dargestellt. EBV: Epstein-Barr-Virus; HIV-1: Humane Immundefizienz-Virus; MVB: Multivesikuläre Körper; NPC: nukleäre Kernpore; PM: Plasmamembran. Verändert nach: Hurley, 2015.

In Hefen wurde eine unkonventionelle Sekretion beschrieben, die unabhängig vom ER agiert: CUPS (*compartment for unconventional protein secretion*) (Christ *et al.*, 2017). Für die Sekretion von Acb1 (*Acyl-CoA-binding protein*) via CUPS werden ESCRT-I, -II

und -III, nicht aber VPS4, benötigt (Curwin *et al.*, 2016).

1.1.1.1 ESCRT-Komponenten und Viren

Wie bereits erwähnt, nutzen Viren zelluläre Protein-Maschinerien zu ihrem Vorteil aus, um ihre Freisetzung zu katalysieren. Viren können die ESCRT-Komplexe über spezifische Tetrapeptid-Motive in den Strukturproteinen, auch *late*-Domänen genannt, rekrutieren (Freed, 2002; Bieniasz, 2006). Der Name ergibt sich aus ihrer „späten“ Funktion in der Virusmorphogenese (Parent *et al.*, 1995). Die Identifikation der *late*-Domänen erfolgte durch Mutationsanalysen in retroviralen Gag-Polyproteinen (Freed, 2002). Göttlinger *et al.* (1991) entdeckten die erste *late*-Domäne P(S/T)AP in der p6-Domäne des Gag-Polyproteins von HIV-1. Nur wenig später wurde das PPXY-Motiv im Gag-Polyprotein vom Rous-Sarkom-Virus (RSV) beschrieben (Wills *et al.*, 1994). Das YXXL-Tetrapeptidmotiv wurde zuerst im Virus der equinen infektiösen Anämie (EIAV) charakterisiert (Puffer *et al.*, 1997). Dieses Motiv wurde in weiteren Viren, wie RSV, HIV-1 und Simianen Immundefizienz-Virus (SIV), mit leichten Abweichungen gefunden, wodurch es nun allgemein als (L)YPX_nL-Motiv beschrieben wird (Demirov & Freed, 2004). Ein weiteres Motiv FPIV konnte im Humanen Parainfluenza-Virus beschrieben werden, allerdings ist die genaue Charakterisierung und Identifizierung der ESCRT-Bindungspartner noch nicht abgeschlossen (Votteler & Sundquist, 2013). Über *late*-Domänen werden Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem Virus und den ESCRT-Komplexen vermittelt. Viele Viren besitzen mehrere *late*-Domänen oder sogar eine Kombination, wie das Ebolavirus (PTAPPXY) (Freed, 2002). Das P(S/T)AP-Motiv bindet die UEV-Domäne von Tsg101, wodurch der ESCRT-I Komplex rekrutiert und die ESCRT-Kaskade initiiert wird (Votteler & Sundquist, 2013). Die PPXY *late*-Domäne interagiert mit den WW-Domänen der HECT Ubiquitin-Ligasen (Votteler & Sundquist, 2013). Wie genau die HECT Ubiquitin-Ligasen den Zugang zur ESCRT-Kaskade vermitteln, ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Mehrere Studien schlagen die Ubiquitinierung des Gag-Polyproteins oder der HECT-E3-Ubiquitin-Ligase durch die (Selbst-) Ubiquitin-Ligase-Aktivität vor, was dann als Erkennungssignal für die ESCRT-Kaskade dienen könnte (Freed, 2002; Martin-Serrano *et al.*, 2005; Bieniasz, 2006). Eine weitere Möglichkeit der Vernetzung zur ESCRT-Maschinerie eröffnen ART (*arrestin-related trafficking*)-Proteine. Diese

interagieren sowohl mit HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen als auch mit ESCRT-Komponenten und fungieren somit als Adaptorproteine (Rauch & Martin-Serrano, 2011). Das (L)YPX_nL-Motiv ist verantwortlich für die Rekrutierung und Bindung von Alix, einem ESCRT-assoziierten Protein, welches mit der ESCRT-III Untereinheit CHMP4 interagiert (Demirov & Freed, 2004).

HIV-1 besitzt zwei *late*-Domänen P(S/T)AP und (L)YPX_nL, die Tsg101 und Alix binden und rekrutieren (Göttlinger *et al.*, 1991; Demirov & Freed, 2004). Obwohl HIV-1 kein PPXY-Motiv besitzt, konnte gezeigt werden, dass die Nedd4-ähnliche Ubiquitin-Ligase (Nedd4-2s) die Abschnürung stimulieren kann (Weiss *et al.*, 2010). Dabei interagiert die N-terminal verkürzte C2-Domäne von Nedd4-2s, und nicht die PPXY-bindende WW-Domäne, mit dem Gag-Polyprotein (Weiss *et al.*, 2010).

Eine ESCRT-abhängige Knospung aller Viren bedingt die Anwesenheit von ESCRT-III-Komponenten und VPS4, um die Abschnürung zu katalysieren. Die komplette „frühe“ ESCRT-Kaskade ist nicht notwendig, solange der ESCRT-III-Komplex rekrutiert werden kann. Im Falle der P(S/T)AP-abhängigen Knospung bei HIV-1 ist die Rolle von ESCRT-II sehr umstritten (Langelier *et al.*, 2006; Carlson & Hurley, 2012; Meng *et al.*, 2015). Bei den Arbeiten, die gegen eine Beteiligung von ESCRT-II und CHMP6 sprechen, verbleibt die Frage, wie ESCRT-I dann den ESCRT-III-Komplex rekrutiert. Das humane Hepatitis-B-Virus (HBV) und das Aviäre Leukosevirus (ASV) sind ESCRT-I unabhängig und benutzen ESCRT-II zur Aktivierung von ESCRT-III/VPS4 (Pincetic *et al.*, 2008; Stieler & Prange, 2014).

1.1.2 Rab GTPasen

Rab GTPasen (*ras-related in brain*) bilden die größte Familie der kleinen, monomeren GTPasen. Bis heute sind über 60 Rab-Mitglieder identifiziert und beschrieben (Stenmark, 2009). Rab-Proteine sind in spezifischen Kompartimenten lokalisiert, wo sie zur Membranidentität beitragen (Stenmark, 2009). Die Hauptfunktion der Rab GTPasen besteht in der Koordination des intrazellulären Vesikelnetzwerks, wo sie Vesikelabschnürung, -transport und -fusion kontrollieren (Stenmark, 2009). In Abb. 3 ist der Aktivitätskreislauf der Rab GTPasen schematisch beschrieben. Neu synthetisierte Rab-Proteine werden zunächst von REPs (*rab escort protein*) gebunden

(Stenmark, 2009). Es folgt eine Prenylierung an ein oder zwei C-terminalen Cystein-Resten (Stenmark, 2009). Diese posttranslationale Modifikation wird von Geranyl-Geranyl-Transferasen katalysiert (Stenmark, 2009). Durch die Prenylierung kann das Rab-Protein in Wechselwirkung mit Membranen und Proteinen treten (Zhang & Casey, 1996; Müller & Goody, 2017). Das prenylierte, GDP-gebundene Rab-Protein wird von einem GDP-Dissoziations-Inhibitor (GDI) erkannt und gebunden (Stenmark, 2009). Der Rab-GDI Komplex gelangt durch die Interaktion und Bindung eines membrangebundenen GDI-Austauschfaktors (GDFs), der die Freisetzung von GDI bedingt, an eine spezifische Membran (Stenmark, 2009). Das Rab-Protein wird dann von einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) aktiviert, der die Freisetzung des gebundenen GDP und die Bindung von GTP katalysiert, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt (Stenmark, 2009). GTP liegt in einer hohen zytosolischen Konzentration vor, wodurch sichergestellt wird, dass nach GDP-Freisetzung sofort ein GTP binden kann (Traut, 1994; Stenmark, 2009; Müller & Goody, 2017). In aktiviertem Zustand können Rab-Proteine mit spezifischen Effektorproteinen, wie z.B. Kinasen, Phosphatasen, Motorproteinen und Proteinen, die bei der Sortierung der Frachtmolekülen helfen, interagieren (Stenmark, 2009). Die Inaktivierung erfolgt über die intrinsische GTPase-Aktivität und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die für die Hydrolyse von GTP sorgen (Stenmark, 2009). In der inaktiven Form wird das Rab-Protein wieder von GDI gebunden und verbleibt im Zytosol (Müller & Goody, 2017; Pfeffer, 2017). Rab-Proteine alternieren als molekulare Schalter zwischen dem aktiven, GTP-gebundenen und dem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand.

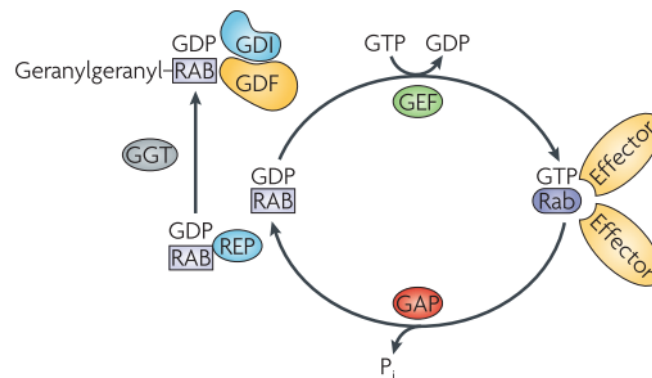


Abb. 3 Rab GTPase Aktivitätskreislauf

Dargestellt ist der Aktivitätskreislauf der Rab GTPasen. Neu synthetisierte Rab-Proteine werden von REP (*Rab escort protein*) erkannt und einer Geranyl-Geranyl-Transferase (GGT) prenyliert. Das prenylierte Rab-Protein wird von einem GDP-Dissoziations-Inhibitor (GDI) erkannt. Der Rab-GDI Komplex wird durch die Interaktion mit einem membrangebundenen GDI-Austauschfaktor (GDF) an eine spezifische Membran rekrutiert. Die Aktivierung des Rab-Proteins erfolgt durch den Austausch von GDP mit GTP, katalysiert von einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF). Die aktive Form des Rab-Proteins kann nun Effektorproteine binden und rekrutieren. Durch das GTPase-aktivierende Protein (GAP) wird die Hydrolyse von GTP bedingt und das Rab-Protein in seine inaktive Form versetzt (Stenmark, 2009).

Abb. 4 fasst Funktionen der Rab GTPasen im Vesikeltransport zusammen. Rab-Proteine sind in der Rekrutierung von Hüllproteinen an bestimmte Membranen involviert und vermitteln dadurch die Zusammenlagerung zu Hüllkomplexen (Kelly *et al.*, 2012) (Abb. 4,a). Clathrin-umhüllte Vesikel (*clathrin coated vesicle*, CCV) sind wichtige Transportvesikel im endolysomalen Transportsystem (Boehm & Bonifacino, 2001). Die Hülle setzt sich aus Clathrin und unterschiedlichen Adaptorkomplexen (AP) zusammen (Boehm & Bonifacino, 2001). Die Adaptorkomplexe sind an der Bildung der CCV und der Sortierung von Frachtmolekülen beteiligt (Boehm & Bonifacino, 2001). AP2 vermittelt die Endozytose von der Plasmamembran zu frühen Endosomen (Boehm & Bonifacino, 2001). Der Abbau der Hüllproteine ist Voraussetzung für die Fusion der Vesikel mit der Akzeptor-Membran (Kelly *et al.*, 2012) (Abb. 4,b). Rab5 und sein GEF hRME6 sind am Abbau der Clathrin-Hülle involviert, indem sie auf die stabilisierende Phosphoinositid (PI)-Zusammensetzung in der Hülle einen negativen Einfluss nehmen (Shin *et al.*, 2005; Stenmark, 2009). Die Beweglichkeit des Vesikeltransports wird über Aktin-Filamente oder Mikrotubuli des Zytoskeletts ermöglicht (Stenmark, 2009) (Abb. 4,c). In Hefe und höheren Zellen assoziieren Aktin-Motorproteine der Myosin V Familie mit Vesikeln in Abhängigkeit von Rab-Proteinen (Seabra & Coudrier, 2004; Stenmark, 2009). Rab27A rekrutiert das Adaptorprotein Melanophilin zu den Membranen der Melanosomen, wodurch es Melanosomen mit

Myosin Va verknüpft (Ishikawa *et al.*, 2003; Stenmark, 2009). Myosin Va bewegt dann Rab27A-positive Vesikel in Richtung Zellperipherie, was entscheidend für die Funktion von Melanozyten ist (Wu *et al.*, 2002; Stenmark, 2009). Beim Mikrotubuli-assoziierten Transport unterscheidet man zwischen dem Motorprotein Kinesin (Richtung Plasmamembran, Plus-Ende) und dem Motorprotein Dynein (Richtung Zellkern, Minus-Ende). Beide Transporttypen stehen unter der Regulation von Rab GTPasen (Stenmark, 2009). Kinesine können auch direkte Effektorproteine sein, wie z.B. der zytokinetische Regulator Rabkinesin 6 (KIF20A) ein Effektorprotein von Rab6 ist (Echard *et al.*, 1998; Stenmark, 2009). Das Effektorprotein RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*) von Rab7 vermittelt den Transport von späten Endosomen über Rekrutierung von Dynein-Dynactin (Jordens *et al.*, 2001; Stenmark, 2009). Rab GTPasen ermöglichen auch das Andocken (*Tethering*) eines Vesikels durch die Interaktion verschiedener *Tethering*-Faktoren mit Proteinen an der Akzeptor-Membran, wie SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) und SNARE-Regulatorproteinen (Stenmark, 2009) (Abb. 4,d). Rab5 besitzt zwei *Tethering*-Faktoren, EEA1 (*early endosome antigen 1*) und Rabenosyn 5 (Rundlett *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; Stenmark, 2009). Das Rab5-vermittelte Andocken mit folgender Fusion erfolgt durch direkte Interaktion von EEA1 und Rabenosyn 5 mit den endosomalen SNARE-Proteinen Syntaxin 6, 7 und 13 (Simonsen *et al.*, 1999; Stenmark, 2009). Außerdem besteht eine weitere Interaktion zwischen Rabenosyn 5 und VPS45 (*vacuolar sorting-associated protein 45*), Mitglied der Sec1-Familie von SNARE-Regulatorproteinen (Morrison *et al.*, 2008; Stenmark, 2009). Beide Interaktionen resultieren in der Fusion des Vesikels mit der Akzeptor-Membran und dem Rücktransport der Rab GTPase zur Donor-Membran (Abb. 4,e).

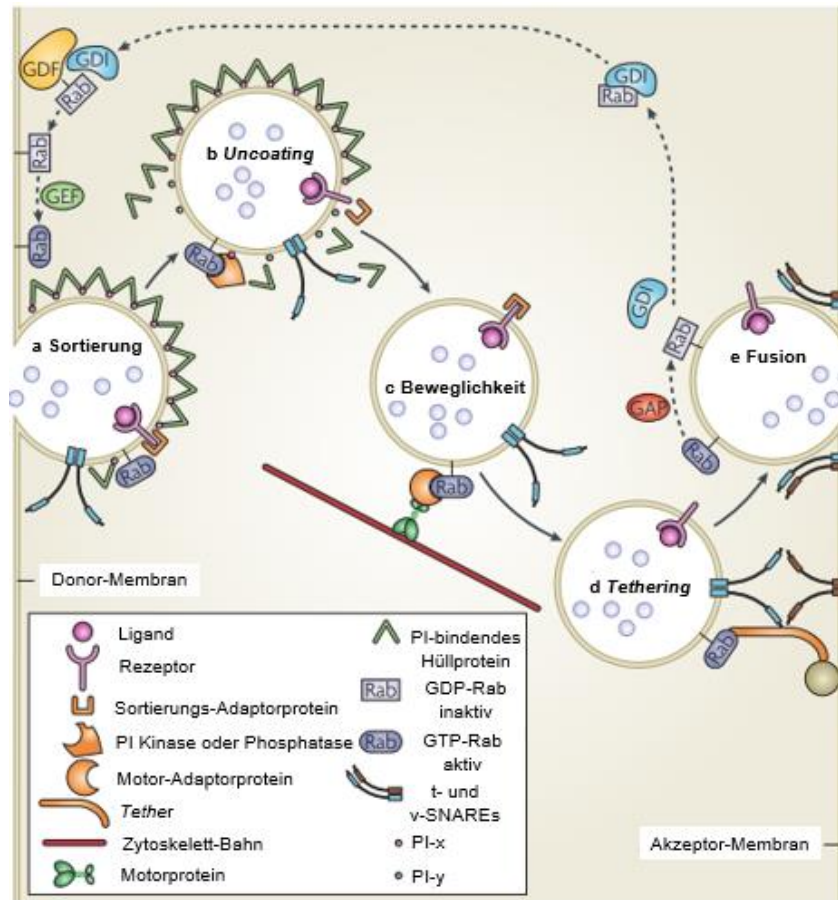


Abb. 4 Funktionen der Rab GTPasen im Vesikeltransport

Dargestellt sind die Schritte im Vesikeltransport, die von Rab GTPasen kontrolliert werden. **(a, Sortierung)** Ein GTP-gebundenes Rab-Protein aktiviert ein Sortierungs-Adaptorprotein, um Frachtmoleküle (hier ein Rezeptor) in ein Vesikel zu sortieren. **(b, Uncoating)** Rekrutierung von Phosphoinositid (PI)-Kinasen oder -Phosphatasen, die die PI-Zusammensetzung des Vesikels ändern (PI-x in PI-y), wodurch das *Uncoating* gefördert wird. **(c, Beweglichkeit)** Rab GTPasen vermitteln den Transport von Vesikeln über Aktin-Filamente oder Mikrotubuli durch die Rekrutierung von Motor-Adaptorproteinen oder Motorproteinen. **(d, Tethering)** Rab GTPasen können *Tethering*-Faktoren rekrutieren, die mit t- und v-SNAREs der Akzeptor-Membran interagieren und so das Andocken und die Fusion des Vesikels ermöglichen. **(e, Fusion)** Nach der Fusion und Exozytose werden die Rab GTPasen durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) unter Hydrolyse von GTP inaktiviert. Das inaktive GDP-gebundene Rab-Protein wird vom GDP-Dissoziations-Inhibitor (GDI) gebunden und durch Interaktion mit dem GDI-Austauschfaktor (GDF) zurück zur Donor-Membran transportiert. Verändert nach: Stenmark, 2009.

1.1.2.1 Rab GTPasen und Viren

Durch die Vernetzung verschiedener Kompartimente stellen Rab GTPasen ein bedeutendes Transportmittel für viele Viren dar. Während des viralen Lebenszyklus können Rab GTPasen an mehreren Schritten beteiligt sein. Wird der Viruseintritt durch Endozytose vermittelt, gelangt das Virus über frühe/späte Endosomen ins Zytoplasma (Spearman, 2017). Bei Influenzaviren wird das Virus nach Clathrin-vermittelter Endozytose oder Makropinozytose über Rab5-positive frühe und Rab7-positive späte

Endosomen ins Zytoplasma transportiert (de Vries *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Spearman, 2017). Zu weiteren Schritten, bei dem sich Virus und Rab GTPasen kreuzen können, zählen der Zusammenbau und die Ausschleusung viraler Partikel (Spearman, 2017). Die Bildung des Replikationskomplexes vom Hepatitis-C-Virus (HCV) wird durch Rab5 und Rab7 gefördert (Manna *et al.*, 2010), während Rab18 für den Transport des HCV Core-Proteins zu Lipidtropfen verantwortlich ist, wo der Virus-Zusammenbau stattfindet (Dansako *et al.*, 2014). Influenza A-Virus und Paramoxyviren modulieren Rab11 für Schritte der Umhüllung und Knospung (Bruce *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2016). Der Zusammenbau von HCMV und HIV-1 hängt maßgeblich von Rab27A ab (Fraile-Ramos *et al.*, 2010; Gerber *et al.*, 2015). Die Bildung und Ausschleusung nackter HBV Kapside benötigt Rab33B und seinem autophagosomalen Atg5/12/16L1-Komplex (Döring & Prange, 2015). Zudem können Rab GTPasen einen Transportmechanismus bei der Sortierung von viralen Glykoproteinen der Hülle darstellen (Spearman, 2017). Rab6 vermittelt den post-Golgi-Transport der Hüllproteine von Herpes simplex-Virus 1 (HSV 1) zum Ort der Umhüllung (Johns *et al.*, 2014). Dies sind nur einige Beispiele von Viren, die von den intrazellulären Transportwegen der Rab-Proteine profitieren. Der Einfluss der Rab-Proteine in den unterschiedlichen Schritten im viralen Lebenszyklus unterstreicht deren Bedeutung für die Virusreplikation.

1.2 Murines Leukämievirus (MLV)

Das Murine Leukämievirus (MLV) ist ein umhülltes RNA-Virus und gilt als Prototyp der Gattung der Gammaretroviren aus der Familie der Retroviren. Anfang der 50er Jahre zeigten mehrere Studien zur Leukämogenese, dass die Injektion eines isolierten murinen Leukämievirus in neugeborenen Mäusen ebenfalls zur Entwicklung von Leukämie führte (Gross, 1951, 1957; Moloney, 1960; Rein, 2011). Es gibt verschiedene MLV-Stämme, die nach dem jeweiligen Entdecker benannt wurden. 1981 wurde das Moloney MLV (Mo-MLV) vollständig sequenziert (Shinnick *et al.*, 1981). Neben HIV-1, einem Retrovirus aus der Gattung der Lentiviren, gehört MLV zu den am besten untersuchten Virussystemen. Unterschiede zwischen MLV und HIV-1 bestehen zum einen in der Einfachheit des MLV-Genoms ohne weitere regulatorische Gene und zum anderen in der Unfähigkeit von MLV, nicht-teilende Zellen zu infizieren

(Roe *et al.*, 1993; Rein, 2011). Das MLV-Genom ist ein wichtiges Modellsystem bei der Konstruktion retroviraler Vektoren zur Gentherapie (Blesch, 2004; El Ashkar *et al.*, 2017). Retroviren sind natürliche Gentransfervehikel und können ihr Genom effizient in die Wirtszelle transferieren, integrieren und exprimieren (Doerr & Gerlich, 2010b). Aufgrund der einfachen Genomstruktur ist es möglich, gezielte Manipulationen durchzuführen. Bei der Herstellung retroviraler Vektoren werden die viralen Gene durch den Einbau des zu transferierenden Gens (Transgen) modifiziert oder ersetzt (Doerr & Gerlich, 2010b).

1.2.1 Genomstruktur und Aufbau des MLV

Das Mo-MLV Genoms besitzt eine Länge von 8332 Nukleotiden (Shinnick *et al.*, 1981). Abb. 5 zeigt die Struktur des proviralen Genoms, welches drei Gene und zwei *long terminal repeats* (LTRs) enthält. Die LTRs flankieren die offenen Leserahmen (ORFs) mit den regulatorischen Signalsequenzen U3, R und U5, welche für die Initiierung der Transkription der proviralen DNA wichtig sind (Rein, 2011). Dem 5'-LTR angeschlossen befindet sich die Primerbindungsstelle (PBS), die Spleiß-Donor-Stelle (SD) und das Verpackungs- und Dimerisierungssignal der RNA (ψ). Die Struktur- (*Gag, group associated antigen*) und Replikations (*Pol, polymerase*)- Proteine, befinden sich im selben ORF, separiert durch ein Stoppkodon (Rein, 2011). Das Gag-Polyprotein umfasst die Matrix (MA)-, p12-, Kapsid (CA)- und Nukleokapsid (NC)-Domänen (Rein, 2011). Durch Suppression des Stoppkodons kann das Pol-Polyprotein zusammen mit dem Gag-Polyprotein als großes Gag-Pol-Fusionspolyprotein synthetisiert werden (Yoshinaka *et al.*, 1985). *pol* kodiert für die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Für eine optimale Replikation bedarf es ein Verhältnis von Gag zu Gag-Pol von 20:1 (Felsenstein & Goff, 1988; Rein, 2011). In einem weiteren ORF befindet sich die Sequenz für die Hüll (*Env, envelope*)-Proteine, welche sich aus Oberflächen-Glykoprotein (SU) und Transmembran-Domänen (TM) zusammensetzen. Der 3'-untranslatierte Bereich besteht aus einem Polypurintrakt (PPT) und dem 3'-LTR, in dem sich das Signal für die Polyadenylierung befindet

(Maetzig *et al.*, 2011; Rein, 2011).

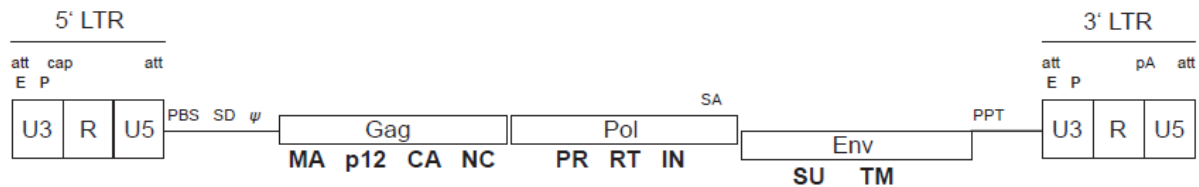


Abb. 5 Genomstruktur von MLV

Schematisch dargestellt ist die provirale Genomstruktur von MLV mit den Genen *gag*, *pol* und *env*. att: *attachment site*; CA: Kapsid-Domäne; cap: *5' RNA capping site*; E: Enhancer; IN: Integrase; LTR: *long terminal repeats*; MA: Matrix-Domäne; NC: Nukleokapsid-Domäne; P: Promotor; p12: p12-Domäne; pA: Polyadenylierungsstelle; PBS: Primer-Bindestelle; PPT: Polypurintrakt; PR: Protease; RT: reverse Transkriptase; SA: Spleiß-Akzeptor-Stelle; SD: Spleiß-Donor-Stelle; SU: Oberflächen-Glykoprotein; TM: Transmembranprotein; ψ : Verpackungssignal; U3, R, U5: regulatorische Sequenzen. Verändert nach: Maetzig *et al.*, 2011; Bartusch & Prange, 2016.

Die MA-Domäne vermittelt die Membranassoziation über seine N-terminale Myristoylierung (Henderson *et al.*, 1983; Rein *et al.*, 1986). Die p12-Domäne ist wichtig für Protein-Protein-Interaktionen (Segura-Morales *et al.*, 2005) und scheint in der Infektion eine wichtige Rolle spielen (Yuan *et al.*, 2002; Yueh & Goff, 2003; Prizan-Ravid *et al.*, 2010). Die Interaktion der monomeren Gag-Proteine wird über die CA-Domäne vermittelt, was letztlich zur Bildung des unreifen Virions führt (Rein, 2011). Die NC-Domäne hingegen ist essentiell für die Bindung des RNA-Genoms (Rein, 2011). Die Hüllproteine werden am ER synthetisiert und glykosyliert, und dann im Golgi-Komplex modifiziert (Rein, 2011). Dort erfolgt außerdem die Spaltung des Hüll-Polypeptids in SU und TM durch die zelluläre Furin-ähnliche Protease. Ein Trimer dieses heterodimeren SU-TM Komplexes wird dann an die Zelloberfläche/Membranen transportiert (Rein, 2011).

Die Virusmorphogenese wird über die *late*-Domänen vermittelt. Das MLV-Genom enthält drei putative *late*-Domänen PSAP (in der MA-Domäne), LYPAL (Übergang MA/p12-Domäne) und PPPY (in der p12-Domäne), wobei letztere eine übergeordnete Funktion einnimmt (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). Das PSAP-Motiv interagiert mit der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101, während LYPAL über die Bindung des MVB-Adaptorproteins Alix eine Brücke zur ESCRT-III herstellt (Segura-Morales *et al.*, 2005). Die PPPY *late*-Domäne bindet und rekrutiert die HECT Ubiquitin-Ligase Nedd4-1 (Segura-Morales *et al.*, 2005).

Die Expression des Gag-Polyproteins ist ausreichend für die Bildung und Ausschleusung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). VLPs erhalten eine Membranhülle ohne Hüllproteine durch die Knospung an der Plasmamembran. Die Bildung von MLV-Virionen beinhaltet die Inkorporation der Gag-, Pol- und Hüll-Polyproteine und der genomischen RNA (Rein, 2011). Erst nach der Ausschleusung der Virionen scheint die Reifungsphase mit der Prozessierung des Gag-Polyproteins durch die virale PR zu beginnen (Rein, 2011). Dabei entstehen vier Spaltprodukte: das MA-, p12-, CA- und NC-Protein. Die Pol-Domäne von Gag-Pol wird außerdem in PR, RT und IN gespalten (Rein, 2011). Auch die heterodimeren SU-TM Komplexe werden durch das Abspalten des C-terminalen R-Peptids des TM-Proteins durch die PR prozessiert (Rein, 2011). Die Reifungsphase geht mit morphologischen Strukturänderungen der Kapsidproteine einher, bei der ein polygonales Kapsid entsteht (Yeager *et al.*, 1998; Rein, 2011).

MLV-Virionen besitzen einen Durchmesser von etwa 100 – 120 nm. Sie bestehen aus einem Kapsid, welches die RNA im Komplex mit NC-Proteinen enthält, und einer Lipidhülle. Das Kapsid enthält zudem die Enzyme RT, IN und PR. Die MA-Proteine bilden eine Schicht außerhalb des Kapsids und interagieren mit den Hüllproteinen, die in der Lipidhülle verankert sind.

1.2.2 Lebenszyklus von MLV

Das MLV-Virion bindet über die Glykoproteine der Hülle an Zielmembran-Rezeptoren mit mehreren Transmembran-Domänen (Rein, 2011). Abhängig von der Genomsequenz der Hülle werden andere Rezeptoren genutzt, woraus sich unterschiedliche Wirtsspezifitäten von MLV ergeben: ecotrope, xenotrope, polytrope und amphotrope Stämme (Stoye & Coffin, 1987). Das Mo-MLV gehört zu den ecotropen MLVs (infizieren murine Zellen) und benötigt den mCAT1 (*murine cationic amino acid transporter*)-Rezeptor (Rein, 2011). Nach Rezeptorbindung kommt es zu einer Konformationsänderung in den Hüllproteinen, wobei das Kapsid ins Zytoplasma gelangt; entweder durch Fusion der viralen und zellulären Membranen oder durch Endozytose (Sommerfelt, 1999; Overbaugh *et al.*, 2001; Maetzig *et al.*, 2011). Das virale RNA-Genom wird von der viralen reversen Transkriptase in dsDNA umgeschrieben. Da MLV keine Kernimport-Signale besitzt, hängt der Transport der

dsDNA in den Zellkern vom (teilweisen) Abbau der Zellkernmembran während der Mitose ab (Roe *et al.*, 1993). Die dsDNA wird in Form eines prä-Integrationskomplex (PIC) mit viralen und zellulären Proteinen eingeschleust. Im Zellkern erfolgt die Integration des PIC in die chromosomale DNA der Zelle. Es folgen Umschreibung der proviralen DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase und Export der viralen RNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Im nächsten Schritt werden die viralen Proteine translatiert und neue Virionen können gebildet werden. Die Ausschleusung der Virionen kann direkt an der Plasmamembran (Chazal & Gerlier, 2003) oder an intrazellulären Membranen erfolgen (Houzet *et al.*, 2006). Nach der Ausschleusung unreifer Virionen beginnt die Reifungsphase mit der Spaltung der viralen Proteine durch die PR. Die Reifung der Virionen ist zugleich Voraussetzung für eine Neu-Infektion (Houzet *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Rein, 2011). MLV kann sowohl myeloide als auch lymphoide Zelllinien infizieren, da diese retrovirale Rezeptoren exprimieren (Gilroy *et al.*, 2016).

Abhängig vom Integrationsort des Provirus in das Genom der Wirtszelle können Promotor- und Enhancer-Elemente des Provirus nicht nur die virale Genexpression, sondern auch die zelluläre Genexpression beeinflussen (Tsuruyama *et al.*, 2016). Findet die Integration in der unmittelbaren Nähe von zellulären Protoonkogenen statt, die für das Zellwachstum, die Zellteilung und Zelldifferenzierung wichtig sind, können Onkogene entstehen (Tsuruyama *et al.*, 2016). Steht das Onkogen unter der Kontrolle des viralen Promotors/Enhancers, kann es aufgrund der Expressionssteigerung zu ungebremstem Zellwachstum und letztlich zur Entstehung von Tumoren, wie Leukämie oder Lymphom, kommen. Die Integration von MLV erfolgt in der Nähe von Transkriptions-Startstellen (Tsuruyama *et al.*, 2016). Als Schlüsselfaktor in der spezifischen Integration von MLV wurde kürzlich die zelluläre Bet (*bromodomain and extraterminal domain*)-Proteinfamilie beschrieben, die bevorzugt an acetylierte Histone binden (Gilroy *et al.*, 2016). Durch die Interaktion von Bet-Proteinen mit der MLV-Integrase wird die MLV-DNA zu aktiven Regionen im Chromatin dirigiert (De Rijck *et al.*, 2013; Gilroy *et al.*, 2016; Tsuruyama *et al.*, 2016).

1.2.3 MLV und zelluläre Wirtsfaktoren

Eine effiziente Infektion durch MLV hängt von der Interaktion der MA-Domäne des

Gag-Polyproteins mit IQGAPs (*ras GTPase-activating-like protein*) ab. IQGAPs sind Regulatoren des Zytoskeletts und fungieren als Brücken zwischen Aktin-Filamenten und Mikrotubuli (Noritake *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2006; Goff, 2007). Außerdem benötigt MLV FEZ1 (*fasciculation and elongation protein zeta-1*), das ebenfalls den Zytoskelett-Transport reguliert (Naghavi *et al.*, 2005; Goff, 2007). Für die korrekte Bildung des PIC sind zwei zelluläre Faktoren essentiell: BAF-1 (*barrier to auto-integration factor-1*), ein DNA-bindendes Protein, und LAP2 α (*lamina-associated polypeptide 2*), welches an BAF-1 bindet und die Integration von PIC in die chromosomale DNA der Wirtszelle fördert (Suzuki, Yang & Craigie, 2004; Goff, 2007). Segura-Morales *et al.* (2005) stellten eine Interaktion des MLV Gag-Polyproteins mit Tsg101, Alix und Nedd4-1 über die entsprechenden *late*-Domänen PSAP, LYPAL und PPPY fest. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Clathrin-Adaptorkomplex AP1 bei der Knospung von MLV involviert ist (Camus *et al.*, 2007). AP1 kann mit Tsg101 und Nedd4-1 interagieren und könnte somit MLV mit der ESCRT-Maschinerie vernetzen (Camus *et al.*, 2007). Ubiquitin ist ein wichtiges Sortierungssignal und spielt eine Rolle in der P(S/T)AP- und PPXY-vermittelten Ausschleusung umhüllter Viren (Morita & Sundquist, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass hohe Dosen Ubiquitin in MLV-Virionen inkorporiert sind (Ott *et al.*, 1998) und dass das Gag-Polyprotein an mehreren Stellen ubiquitiniert wird (Ott *et al.*, 2000). Des Weiteren sind Endophiline wichtig für die Abschnürung von MLV, da sie die Membrankrümmung induzieren und außerdem mit Alix interagieren können (Wang *et al.*, 2003; Goff, 2007). Endophiline können dabei direkt an die MA-Domäne des Gag-Polyproteins binden (Wang *et al.*, 2003).

1.3 Hepatitis-B-Virus (HBV)

Das humane Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein umhülltes DNA-Virus und gilt als Prototyp der Familie der *Hepadnaviridae*. Es wurde 1970 zuerst von Dane *et al.* beschrieben. Die *Hepadnaviridae* zeichnen sich durch Hepatropismus, ausgeprägte Speziespezifität und der Fähigkeit, akute und chronische Infektionen hervorzurufen, aus (Glebe & Bremer, 2013). Laut WHO sind derzeit weltweit etwa 257 Millionen Menschen chronisch infiziert (WHO, 2017). HBV kann zu akuten und chronischen Lebererkrankungen führen, die sich unter Umständen zu Leberfibrosen, -zirrhosen und

-karzinomen (HCC) entwickeln können (Zeisel *et al.*, 2015). Eine effektive Immunprophylaxe existiert seit ca. 30 Jahren, dennoch sterben jährlich etwa 1 Million Menschen an den Folgen einer chronischen Hepatitis B-Infektion (Perz *et al.*, 2006). Momentan verfügbare antivirale Therapien umfassen folgende Angriffspunkte: (1) Immunsystem des Wirtes: Interferone stimulieren die Abwehrzellen des Immunsystems, (2) Virus-Eintritt: Blockierung des HBV-Rezeptors durch die Gabe von Peptiden (Gripon *et al.*, 2005), (3) virale Replikation: Nukleos(t)idanaloga (*nucleos(t)ide analogues*, NUCs) stoppen die virale Polymerase/RT durch kompetitive Hemmung (Baumert *et al.*, 2015). Die lebenslange Medikation kann die Virusreplikation nur aufhalten, aber die Infektion nicht heilen. Die chronische Hepatitis C-Infektion galt lange Zeit ebenfalls als unheilbar und kann heute durch eine Kombinationstherapie von Sofosbuvir (Inhibitor der NS5B Polymerase) mit anderen Medikamenten bei bis zu 90% der Patienten geheilt werden (Bhatia *et al.*, 2014). Dies gibt Anlass zur Hoffnung, dass auch eine Heilung der Hepatitis B-Infektion möglich ist. Schon heute befinden sich Medikamente in Entwicklung oder in klinischen Studien, wie Viruseintritt-, cccDNA- oder Kapsid-Inhibitoren (Dawood *et al.*, 2017). Durch das bessere Verständnis der einzelnen Schritte im HBV-Lebenszyklus ergeben sich neue Angriffspunkte für zukünftige antivirale Medikamente.

1.3.1 Genomstruktur und Aufbau des HBV

HBV besitzt mit 3,2 kb eines der kleinsten viralen Genome. Es besteht aus einer partiell-doppelsträngigen, nicht-kovalent geschlossenen zirkulären DNA (rcDNA) (Robinson, 1977). Der Plusstrang ist unvollständig und besitzt kein definiertes 3'-Ende (Glebe & Bremer, 2013). Die zirkuläre Form der rcDNA wird durch eine Überlappung zwischen Plus- und Minusstrang von etwa 240 Basenpaaren zusammengehalten (Glebe & Bremer, 2013). Am 5'-Ende des Minusstrangs ist die Protein-Priming Domäne der viralen Polymerase (im Folgenden P-Protein genannt) kovalent gebunden. Die direkten Sequenzwiederholungen von 11 Nukleotiden (Nt) (*direct repeats*, DR) sind für die Translokation von Primern und Matrizen wichtig (Will *et al.*, 1987). Das HBV-Genom zeigt mit vier überlappenden ORFs eine sehr kompakte und effiziente Organisation: (1) Der längste ORF kodiert für das P-Protein, welches aus der terminalen Protein-Priming Domäne, einer Spacer-Region, der reverse Transkriptase

mit DNA-Polymerase Funktion und der C-terminalen RNase H besteht. (2) Der ORF der Hüllproteine kodiert für das große Hüllprotein (LHB, L), das mittlere Hüllprotein (MHB, M) und das kleine Hüllprotein (SHB, S). Die C-terminale S-Domäne ist in allen Hüllproteinen enthalten, während die PräS2-Domäne nur in M und L und die PräS1-Domäne nur in L vorliegt (Heermann *et al.*, 1984; Glebe & Urban, 2007). (3) PräCore/Core kodiert für das Core-Protein und eine präCore-Sequenz, welche ein Signalpeptid für die Translokation in das ER enthält. Die Expression von PräCore/Core führt zur Synthese und proteolytischen Prozessierung von HBeAg (Hepatitis-B-e-Antigen) (P. D. Garcia *et al.*, 1988; Glebe & Bremer, 2013). (4) Der kleinste ORF kodiert für das X-Protein (HBx), von dem angenommen wird, dass es in der Bildung von HBV-assoziiertem Leberkrebs und der epigenetischen Kontrolle der HBV Transkription involviert ist (Kew, 2011; Glebe & Bremer, 2013). Die Transkription der HBV-Gene wird durch die einzelnen Promotoren für PräCore, PräS1, PräS2 und X-Protein, Enhancer-Elemente (EI und EII) und dem Glukortikoid-Response-Element (GRE), welches eine EI-vermittelte Steigerung der Promotor-Aktivität durch Glukortikoide zur Folge hat, gesteuert (Tur-Kaspa *et al.*, 1986).

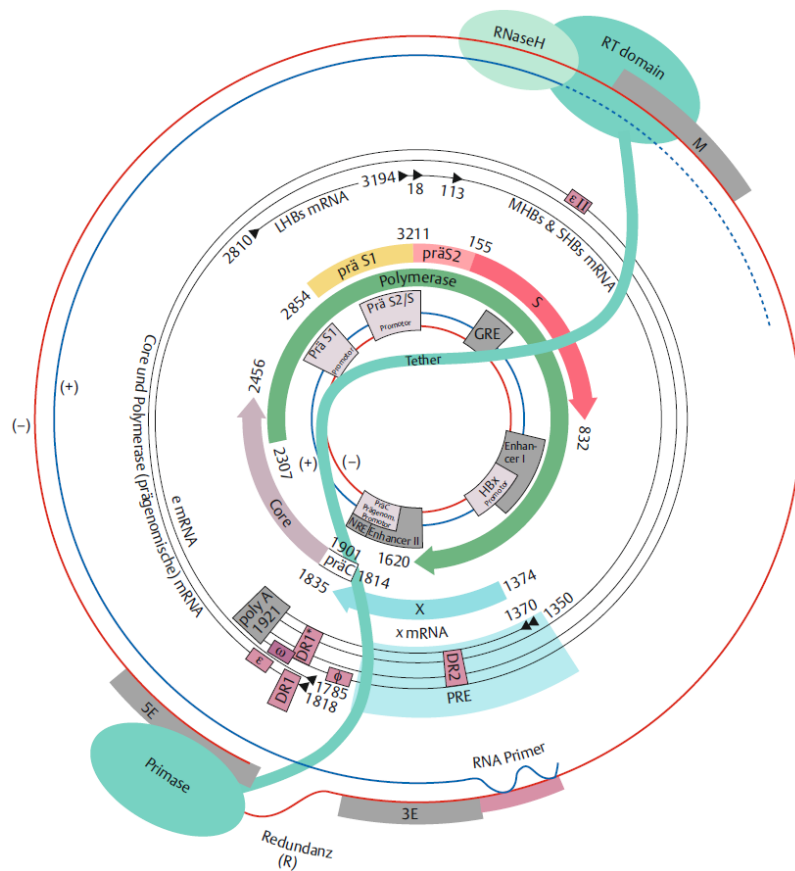


Abb. 6 Genomstruktur von HBV

Die doppelsträngige kovalent-geschlossene zirkuläre DNA (cccDNA, blauer und roter Strang) enthält vier Promotoren für die ORFs (hellgrau) und Enhancerelemente (EI, EII und GRE, dunkelgrau) (Mitte). Struktur der rcDNA (äußere Kreise, Minusstrang (rot) und Plusstrang (blau) mit der kovalent gebundenen Protein-Priming Domäne (Primase) am 5'-Ende des Minusstranges und der reversen Transkriptase (RT) und RNase H Domänen am 3'-Ende des Plusstranges. Alle HBV Transkripte (schwarze Kreise) tragen eine 5'-Cap-Struktur und den gleichen Poly(A)-Schwanz durch eine gemeinsame Polyadenylierungsstelle (grau). Während der Replikation entsteht ein längeres Transkript (prägenomische RNA, pgRNA) (äußerer, schwarzer Kreis). Die pgRNA wird in das PräCore/Core-Protein (HBcAg) translatiert. Außerdem dient die pgRNA der Expression von Core (grau) und dem P-Protein (virale Polymerase) (grün), durch einen überlappenden ORF. Das große (L), mittlere (M) und kleine (S) HBV Hüllprotein und das X-Protein werden von subgenomischen RNAs (schwarze Kreise) translatiert. ▶: Transkriptionsstartstellen; ε: Verpackungssignal in der pgRNA; PRE: posttranslationales Regulationselement; DR1*: 3'-terminaler *direct repeat 1*; DR1 und DR2: *direct repeats* am 3'-Ende des Minusstrangs; GRE: Glukokortikoid-Response-Element; NRE: Negatives regulatorisches Element; εII, ω und Φ: Sequenzelemente für die Genomreifung; 5E, 3E und M: an der Zyklisierung der DNA beteiligt. Verändert nach: Doerr & Gerlich, 2010a.

Virionen haben einen Durchmesser von 42 nm und bestehen aus einem Nukleokapsid, welches die partiell-doppelsträngige, nicht kovalent geschlossene DNA enthält, und einer Lipidhülle. Das ikosaedrische Kapsid enthält 180 ($T=3$) oder 240 ($T=4$) monomere Core-Proteine mit einem Durchmesser von 31 nm bzw. 34 nm (Prange, 2012). In der Lipidhülle sind die drei viralen Hüllproteine S, M und L eingelagert (Prange, 2012). Die drei Hüllproteine sind alle in einem ORF kodiert und werden durch drei unterschiedliche Startstellen und einem gemeinsamen Stoppkodon exprimiert.

Alle Hüllproteine werden ko-translational in die Membran des ERs integriert (Prange, 2012). Das S-Protein ist die Hauptkomponente in Virionen und SVPs und übernimmt eine wichtige Gerüst-bildende Funktion im Aufbau der Virushülle (Prange, 2012). Daneben wirkt S auch beim Viruseintritt und der Ausschleusung in Kombination mit L mit (Prange, 2012). Die Funktion des M-Proteins konnte bisher nicht geklärt werden. Da es in den *Orthohepadnaviridae* hoch konserviert vorliegt, lässt darauf schließen, dass es wichtige Funktionen in der HBV-Infektion übernimmt (Prange, 2012). Die PräS-Domäne verbleibt nach der ko-translationalen Integration von L im Zytoplasma (Prange, 2012). Nach der Synthese von L erfolgt in 50% der L-Proteine eine posttranslationale Translokation der PräS-Domäne durch die ER-Membran (Prange, 2012). In Virionen liegen die PräS-Domänen dann sowohl nach außen als auch nach innen gerichtet vor (Prange, 2012). Während die nach außen gerichtete PräS-Domäne die Rezeptorbindung an Hepatozyten vermittelt, interagiert die nach innen gerichtete PräS-Domäne mit dem Nukleokapsid (Prange, 2012). Die duale Membrantopologie nimmt somit eine sehr wichtige Funktion im viralen Lebenszyklus ein.

Bei der Infektion mit HBV werden neben infektiösen Virionen auch kapsidlose SVPs in Gestalt von Filamenten und Sphären und unbehüllte (Nukleo-)Kapsiden gebildet und ausgeschleust (Prange, 2012). Die SVPs werden im Falle einer Infektion im hohen Überschuss gegenüber Virionen freigesetzt (Heermann *et al.*, 1984). Man nimmt an, dass die erhöhte Freisetzung dazu dient, das Immunsystem des Wirts bei Infektion abzulenken (Bruss, 2007). Sphären haben einen Durchmesser von 20 nm und enthalten 48 S-Dimere, während Filamente den gleichen Durchmesser, aber unterschiedliche Längen besitzen (Patient *et al.*, 2007). Durch die ko-translationale Integration von S in der Membran des ER wird die Bildung von Filamenten initiiert (Patient *et al.*, 2009; Prange, 2012). Dabei lagern sich S-Dimere zusammen, die durch Disulfid-Brücken stabilisiert werden; katalysiert von der Proteindisulfid-Isomerase (PDI), einem ER-Chaperon (Huovila *et al.*, 1992; Prange, 2012). Im Lumen des ER/ERGIC (ER-Golgi-Intermediärkompartiment) werden die Filamente entpackt und zu Sphären konvertiert, die dann über den konstitutiven Sekretionsweg, den Golgi passierend, ausgeschleust werden (Patzner *et al.*, 1986; Prange, 2012). Nackte Kapside können im Serum von HBV-infizierten Menschen nicht nachgewiesen werden (Possehl *et al.*, 1992). Einige Studien konnten die Freisetzung nackter Kapside von

HBV-replizierenden Zellen beobachten (Watanabe *et al.*, 2007; Bardens *et al.*, 2011). Nackte Kapside rufen durch eine hohe Immunogenität eine starke Immunantwort hervor, wodurch sie im Körper des infizierten Patienten vermutlich nur eine geringe Stabilität besitzen (Döring & Prange, 2015).

1.3.2 Lebenszyklus von HBV

Die Anlagerung von HBV an Hepatozyten erfolgt durch eine schwache Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane (Schulze, Gripon & Urban, 2007). Der Viruseintritt wird über den NTCP (*sodium taurocholate co-transporting polypeptide*)-Rezeptor, einen Gallsäure-Transporter, vermittelt (Yan *et al.*, 2012; W. Li, 2015). Nach der Adsorption des Virus an der Zellmembran wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen (Qiao *et al.*, 1994). Der Transport der Nukleokapside zum Zellkern erfolgt über Mikrotubuli (Rabe *et al.*, 2006). Der Kernimport erfolgt über die Bindung von Importin- α und - β an das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) in der C-terminalen Domäne (CTD) des Core-Proteins (Kann *et al.*, 2007). Nach dem *Uncoating* des Nukleokapsids wird die partiell-doppelsträngige, nicht-kovalent geschlossene zirkuläre DNA (rcDNA) in das Kernlumen entlassen (Rabe *et al.*, 2003). Im Zellkern erfolgt die Bildung der kovalent-geschlossenen zirkulären DNA (cccDNA). Der genaue Mechanismus ist noch nicht detailliert bekannt, man weiß aber, dass folgende Schritte erforderlich sind: das kovalent gebundene P-Protein am 5'-Ende des Minusstrangs und der RNA-Primer am 5'-Ende des Plusstrangs des HBV-Genoms müssen entfernt werden (Nassal, 2008). Danach muss der unvollständige Plusstrang durch zelluläre DNA-Polymerasen wieder aufgefüllt und die Enden beider Stränge ligiert werden (Schlicht *et al.*, 1993; Hu & Seeger, 2015). Als episomales Minichromosom mit Histonen verbleibt die cccDNA im Zellkern (Bock *et al.*, 2001). Die cccDNA dient als Matrize für die zelluläre RNA-Polymerase II zur Transkription von der prägenomischen RNA (pgRNA, 3,5 kb), sowie den subgenomischen RNAs PräS1 (2,4 kb), PräS2/S (2,1 kb) und X (0,7 kb) (Nassal, 2008). Alle viralen Transkripte besitzen eine 5'-Cap-Struktur und tragen am 3'-Ende den gleichen Poly(A)-Schwanz durch ein gemeinsames Polyadenylierungssignal (Nassal, 2008). Es existieren zwar Spleiß-Seiten in der viralen RNA, aber es wird angenommen, dass diese von einem posttranslationalen regulatorischen Element (PRE) kontrolliert werden (Glebe & Bremer, 2013). Die pgRNA enthält das komplette

HBV-Genom plus einer terminalen Redundanz von etwa 120 Nt, die zusätzliche Sequenzelemente zur viralen Replikation enthalten (Beck & Nassal, 2007; Glebe & Bremer, 2013). Der pgRNA kommt eine duale Funktion zu, da sie zum einen als Matrize für die reverse Transkription und Genomreifung und zum anderen als Matrize für die Translation der präCore-, Core- und P-Proteine dient (Glebe & Bremer, 2013). Nach dem nukleären Export der viralen RNAs und der Proteinsynthese beginnt die Bildung der ikosaedrischen Nukleokapside im Zytoplasma. Zunächst wird die Verpackung der pgRNA durch die Bindung der Primer-Domäne des P-Proteins an die RNA-Sekundärstruktur des ϵ -Verpackungssignals am 5'-Ende der pgRNA induziert (Glebe & Bremer, 2013). Dabei wird der P-Protein/pgRNA-Komplex zusammen mit 120 Kopien von Core-Dimeren und einer zellulären Proteinkinase in ein unreifes Nukleoapsid verpackt (Bartenschlager & Schaller, 1992). Die Reifung des Genoms hängt von der Phosphorylierung der Core-Proteine an bestimmten Serin-Resten ab (Melegari *et al.*, 2005). Die reverse Transkription wird durch Protein-Priming des P-Proteins am Tyrosinrest 63 mit Hilfe von Chaperonen initiiert. Dabei wird ein kurzer DNA-Primer von vier Nt innerhalb von DR1 synthetisiert (Beck & Nassal, 2007). Es kommt zur Translokation des P-Proteins mit dem DNA-Primer zur DR1-Sequenz am 3'-Ende (Wang & Seeger, 1993; Beck & Nassal, 2007). Daraufhin wird der vollständige DNA-Minusstrang synthetisiert (Wang & Seeger, 1993). Während der Elongation des DNA-Minusstrangs wird die pgRNA-Matrize durch die RNase H-Aktivität des P-Proteins abgebaut, wobei ein RNA-Oligomer aus einer terminalen Redundanz und einer DR1-Sequenz erhalten bleibt (Loeb *et al.*, 1991; Beck & Nassal, 2007). Dieses RNA-Oligomer wird als Primer für die Synthese des DNA-Plusstrangs verwendet (Beck & Nassal, 2007). Nach Translokation des Primers und des P-Proteins an die DR2-Sequenz am 5'-Ende des neu gebildeten DNA-Minusstrangs beginnt die Synthese des DNA-Plusstrangs in Richtung des 5'-Endes des DNA-Minusstrangs (Beck & Nassal, 2007). Die Elongation des DNA-Plusstrangs bricht allerdings vor dem Ende ab, wodurch die partiell-doppelsträngige DNA entsteht (Beck & Nassal, 2007). Reife Nukleokapside werden zu Beginn der Infektion, wenn die Hüllproteine noch nicht ausreichend exprimiert sind, zurück in den Zellkern zur cccDNA-Amplifikation transportiert oder nach der Umhüllung mit viralen Hüllproteine als Virionen ausgeschleust (Blondot *et al.*, 2016).

Obwohl HBV aufgrund seiner Verwandtschaft zu Retroviren auch als Pararetrovirus bezeichnet wird, gibt es starke Unterschiede zwischen den beiden Familien (Rothnie *et al.*, 1994). Die reverse Transkription von HBV erfolgt nach der Synthese von Nukleokapsiden, während Retroviren die DNA-Synthese erst nach der Neu-Infektion vollziehen (Glebe & Bremer, 2013; Hu & Seeger, 2015). Ein weiterer Unterschied besteht in der Bildung einer episomalen cccDNA statt einer retroviralen Integration viraler DNA in die chromosomale DNA (Nassal, 2008).

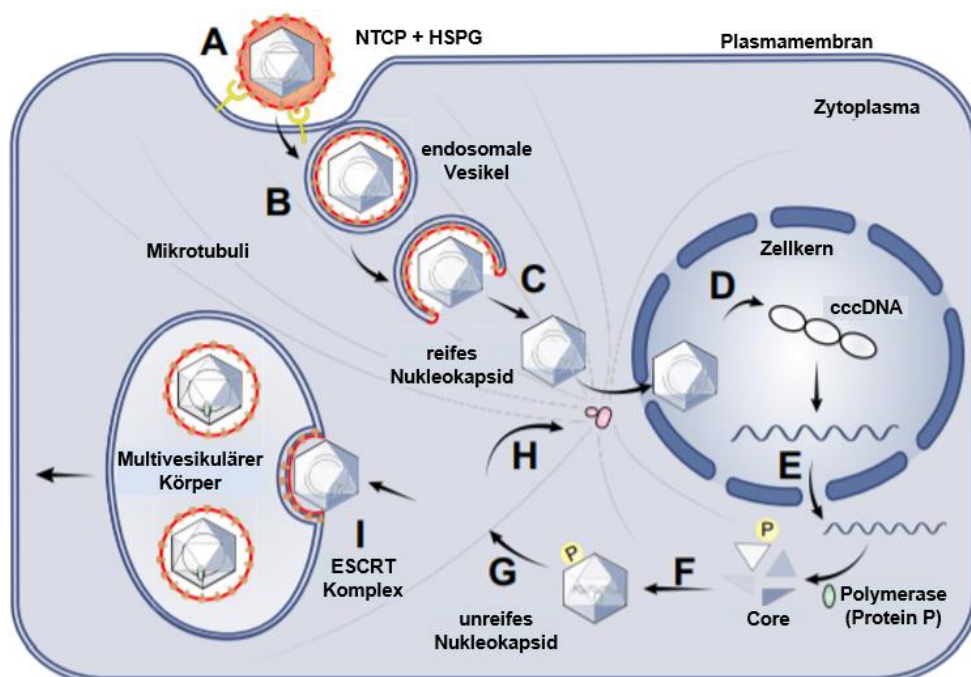


Abb. 7 Replikationszyklus von HBV

Dargestellt ist der Transport von HBV während Viruseintritt und -ausschleusung. (A) Andocken von HBV an Hepatozyten durch Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) und den NTCP (*sodium taurocholate co-transporting polypeptide*)-Rezeptor. (B) Möglicher Transport des Virus über Endosomen entlang von Mikrotubuli. (C) Transport des Kapsids zum Zellkern. (D) Nukleärer Import des Nukleokapsids, *Uncoating* des Nukleokapsids, Bildung der cccDNA. (E) Transkription und Export der viralen RNAs. (F) Translation von Core-Proteinen, virale Polymerase (Protein P), gefolgt von der Phosphorylierung einiger Core-Proteine. Verpackung der prägenomischen RNA (pgRNA), Protein P und zellulären Proteinen in ein unreifes Nukleokapsid. (G) Genomreifung. (H) Transport des reifen Nukleokapsids zurück zum Zellkern zur cccDNA-Amplifikation. (I) Interaktion mit dem L-Hüllprotein und Knospung des Virions mittels der ESCRT-Maschinerie. Verändert nach: Blondot, Bruss & Kann, 2016.

Bei der HBV-Infektion unterscheidet man zwischen der akuten HBV- und der chronischen HBV-Infektion. Die Leberschädigungen sind keine Konsequenz der zytopathischen Wirkung des Virus, sondern treten aufgrund der zellulären Immunantwort auf (Immunpathogenese) (Chisari *et al.*, 2010). HBV bleibt durch verschiedene Mechanismen, wie die Bildung von cccDNA im Zellkern, Bildung viraler mRNA mit 5'-Cap-Struktur und 3'-Poly(A)-Schwanz und Replikation innerhalb des

viralen Kapsids, vom angeborenen Immunsystem unentdeckt, sodass es zu keiner Induktion von Interferon- α/β kommt (Chisari *et al.*, 2010). Die adaptive Immunantwort soll daher für die Eliminierung und die Pathogenese verantwortlich sein (Chisari *et al.*, 2010). Die T-Zell-vermittelte Antwort gegen die HBV-Hüllproteine zeichnet sich durch eine starke, polyklonale und multispezifische Aktivierung von T-Helferzellen ($CD4^+$) und zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) aus (Chisari *et al.*, 2010). Zytotoxische T-Zellen induzieren die Apoptose von infizierten Hepatozyten und steuern die Sekretion von antiviralen und pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Interferon- γ (IFN- γ), welche die HBV-Genexpression und -Replikation inhibieren (Chisari *et al.*, 2010). Bekommt das Immunsystem die Infektion nicht in den Griff, kommt es zur chronischen Hepatitis-B-Infektion. Grund dafür ist eine zu schwache und ineffektive Aktivierung der $CD4^+$ und zytotoxischen $CD8^+$ -Zellen, wodurch die HBV-Replikation nicht gehemmt werden kann (Chisari *et al.*, 2010). Kontinuierliche Zyklen von Entzündung und Regeneration infizierter Hepatozyten ohne Virus-Elimination können dann die Entstehung von Leberfibrose, -zirrhose und HCC fördern (Chisari *et al.*, 2010). Die Bildung von HCC kann durch verschiedene Faktoren begünstigt werden: (1) Integration der HBV-DNA in die chromosomale DNA der Zelle; (2) die transkriptionelle Transaktivator-Aktivität von zellulären Wachstumsfaktoren durch das X-Protein; und (3) die Interaktion des X-Proteins mit Transkriptionsfaktoren, Tumor-Suppressor-Genen und DNA-Reparatur-Proteinen (Chisari *et al.*, 2010).

1.3.3 HBV und zelluläre Wirtsfaktoren

Während Struktur und Genom von HBV bereits detailliert charakterisiert werden konnten, sind einige Schritte des viralen Lebenszyklus und die beteiligten zellulären Wirtsfaktoren noch nicht vollständig entschlüsselt (Baumert *et al.*, 2015). Für den Viruseintritt ist der NTCP-Rezeptor unbedingt notwendig (Blondot *et al.*, 2016). Noch ist unklar, wie genau die weiteren Schritte der Virusaufnahme ablaufen. Es ist jedoch bekannt, dass Rab5 (frühe Endosomen) und Rab7 (späte Endosomen) eine wichtige Rolle bei der HBV-Infektion einnehmen (Macovei *et al.*, 2013). Für den Transport zum Zellkern, den nukleären Import und das *Uncoating* scheint das Virus sich Mikrotubuli und Importinen zu bedienen, aber die detaillierten Mechanismen sind noch unbekannt (Blondot *et al.*, 2016). Die benötigten zellulären Wirtsfaktoren zur Bildung der cccDNA

sind ebenfalls noch nicht im Detail entschlüsselt (Morikawa *et al.*, 2016). Die Transkription der cccDNA wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II ermöglicht (Nassal, 2008). Kapsidbildung, reverse Transkription und rcDNA-Synthese werden von viralen Proteinen durchgeführt (Blondot *et al.*, 2016). In den Kapsiden befinden sich allerdings auch zelluläre Proteine, wie Kinasen, die für die Reifung des HBV-Genoms zuständig sind (Blondot *et al.*, 2016). Drei unabhängige Studien konnten bereits zeigen, dass die Knospung und Ausschleusung von Virionen von ESCRT-III und VPS4 abhängt (Kian Chua *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Prange, 2012). HBV könnte durch ESCRT-assoziierte Proteine, wie dem Ubiquitin-interagierenden Adaptorprotein γ 2-Adaptin und der HECT Ubiquitin-Ligase Nedd4, Zugang zur ESCRT-Kaskade erhalten (Rost *et al.*, 2006, 2008; Döring *et al.*, 2010; Prange, 2012). Nedd4 interagiert mit dem *late*-Domänen-ähnlichen PPAY-Motiv des HBV-Kapsids, während γ 2-Adaptin HBV-Kapside und die Hülle bindet (Hartmann-Stühler & Prange, 2001; Jürgens *et al.*, 2013; M. L. Garcia *et al.*, 2013; Stieler & Prange, 2014). Des Weiteren wird ESCRT-II für die HBV-Morphogenese und Ausschleusung benötigt, während ESCRT-I entbehrlich ist (Stieler & Prange, 2014). Laut einer anderen Studie spielt α -Taxilin ebenfalls eine wichtige Rolle in der Ausschleusung von HBV (Hoffmann *et al.*, 2013). Chou *et al.* (2015) konnten zeigen, dass sowohl HBV-Replikation als auch Ausschleusung von Nukleokapsiden vom Expressionsniveau der ESCRT-0-Untereinheit HRS abhängig sind. Die Autophagie-Maschinerie spielt ebenfalls eine Rolle in der Morphogenese und Ausschleusung von Virionen, da die Inaktivierung von Atg5, Atg7 oder Beclin1 in vermindertem HBV-Export resultierte (Tang *et al.*, 2009; Sir *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass HBV seine Sekretion durch die Aktivierung von Rab7 reguliert, was sich zum einen in der Bildung von tubulären Membranstrukturen in MVBs und Autophagie-Kompartimenten und zum anderen in einem erhöhten Abbau von Virionen durch die Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen äußerte (Bucci *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2015).

Die Ausschleusung von Sphären geschieht über den konstitutiven Sekretionsweg, allerdings sind die Mechanismen und zellulären Wirtsfaktoren noch nicht vollständig verstanden und bekannt (Prange, 2012). Bedingt durch das starke Vorkommen von L in Filamenten scheinen Virionen und Filamente ähnliche Sekretionswege, wie die

ESCRT-vermittelte MVB-Biogenese, zu nehmen (Watanabe *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2016; Hu & Liu, 2017).

Die Ausschleusung von nackten Kapsiden erfolgt ESCRT-unabhängig und wird über Interaktion von Alix vermittelt (Bardens *et al.*, 2011). Döring & Prange (2015) konnten erst kürzlich zeigen, dass HBV durch Rab33B und seinem Effektor Atg5/12/16L1 frühe Schritte der Autophagie-Maschinerie ausnutzt, um Bildung und Ausschleusung von nackten Kapsiden zu fördern.

1.4 Zielsetzung

Viren besitzen keine eigene Replikation und keinen eigenen Stoffwechsel. Daher missbrauchen sie zelluläre Wirtsfaktoren, um ihre Verbreitung zu ermöglichen. In den „späten“ Schritten des viralen Lebenszyklus tragen gezielte Manipulationen von Protein-Maschinerien zum Transport viraler Proteine an den Ort des Zusammenbaus und der Umhüllung, und zur Virionen-Abschnürung bei. Es konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden, dass viele Viren über bestimmte Tetrapeptid-Motive, den *late*-Domänen, ESCRT-Komplexe oder ESCRT-assoziierte Proteine binden und rekrutieren können (Freed, 2002; Bieniasz, 2006). Durch die ESCRT-Maschinerie wird dann die Abschnürung von Virionen vermittelt (Hurley, 2015). Die ersten *late*-Domänen wurden bei Retroviren beschrieben und charakterisiert (Freed, 2002). Das Retrovirus MLV stellt durch seine einfache Genomorganisation ein paradigmatisches Modellsystem zur Untersuchung der ESCRT-Maschinerie dar. Das MLV Gag-Polyprotein enthält drei *late*-Domänen PSAP, LYPAL und PPPY (Yuan *et al.*, 1999; Segura-Morales *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2008), allerdings sind die beteiligten ESCRT-Komponenten für MLV noch nicht beschrieben. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit ESCRT-Komplexe, die in der Morphogenese und Ausschleusung von MLV notwendig sind, identifiziert werden. Zudem könnte ein besseres Verständnis der Morphogenese und Ausschleusung von MLV wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Entwicklung retroviraler Vektoren in der Gentherapie liefern (Thomas *et al.*, 2003). Neben der Beleuchtung der Virus-Wirt-Interaktionen bei MLV, sollte auch der HBV-Lebenszyklus näher untersucht werden. Da die HBV-Infektion immer noch eine globale Bedrohung für die Menschheit darstellt, ist es sehr wichtig, neue Angriffspunkte für die

Entwicklung antiviraler Medikamente zu identifizieren. Viele Schritte im HBV-Lebenszyklus und die beteiligten zellulären Wirtsfaktoren sind unzureichend charakterisiert oder noch unbekannt. In den letzten Jahren konnte die essentielle Bedeutung der ESCRT-Maschinerie für die Ausschleusung von HBV bereits aufgeklärt werden (Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Stieler & Prange, 2014; Chou *et al.*, 2015). Es ist allerdings immer noch unklar, wo der Zusammenbau von Nukleokapsiden und Virionen genau stattfindet und wie die einzelnen viralen Komponenten dorthin transportiert werden. Rab GTPasen sind wichtige Regulatoren im intrazellulären Vesikeltransfer (Stenmark, 2009), was eine Manipulation ihrer Funktion durch HBV wahrscheinlich macht. In der vorliegenden Arbeit sollten Rolle, Funktion und mögliche Mechanismen der Rab GTPasen in der Morphogenese und Ausschleusung von HBV entschlüsselt werden. Neben der Identifikation weiterer notwendiger zellulärer Wirtsfaktoren für HBV könnte diese Studie ebenfalls neue Einsichten in der Komplexität der Rab GTPasen geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Tab. 1 Primär-Antikörper und eingesetzte Verdünnungen in Western Blot (WB), Immunfluoreszenz (IF) und Immunpräzipitation (IP)

Antikörper	Spezies	Verdünnungen			Hersteller
		WB	IF	IP	
α-β-Aktin AC-15	Maus	1:20000	1:1000 (nur MeOH-Fixierung)		Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
α-Atg5 D1G9	Kaninchen	1:1000			Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
α-Atg16L1 D6D5	Kaninchen	1:1000			Cell Signaling
α-Calnexin	Ziege		1:100		Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)
α-EAP20 B-4	Maus	1:750			Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
α-EAP30 D-19	Ziege	1:750			Santa Cruz Biotechnology
α-EAP45 K-18	Kaninchen	1:750			Santa Cruz Biotechnology

Antikörper	Spezies	Verdünnungen			Hersteller
		WB	IF	IP	
α-FLAG M2	Maus	1:10000	1:1000		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
α-GFP JL-8	Maus	1:10000			Clontech (Mountain View, CA, USA)
α-Golgin-97 CDF4	Maus		1:200		Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
α-HA 16B12	Maus	1:10000	1:1000		Covance (Freiburg, Deutschland)
α-HBcAg (gegen HBV Core und Kapside)	Maus		1:200		Dako (Carpinteria, CA, USA)
α-HBcAg 3HB17 (gegen HBV Kapside)	Maus		1:200		HyTest (Turku, Finnland)
α-HRS M-79	Kaninchen	1:1000			Santa Cruz Biotechnology
K1350 (gegen HBV L)	Kaninchen	1:5000	1:250	1,3 µl	Eurogentec (Liège, Belgien)
K38 (gegen HBV S)	Kaninchen		1:100	1,5 µl	

Antikörper	Spezies	Verdünnungen			Hersteller
		WB	IF	IP	
K45 (gegen natives HBV Core-Protein)	Kaninchen			3,5 µl	Rost <i>et al.</i> , 2006
K46 (gegen denaturiertes HBV Core-Protein)	Kaninchen	1:5000			Rost <i>et al.</i> , 2006
MA18/7 (gegen HBV L)	Maus	1:1000	1:100		zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Dieter Glebe (Gießen)
α-Myc 9E10	Maus	1:10000	1:500		Covance
α-Nedd4 H-135	Kaninchen	1:1000			Santa Cruz Biotechnology
α-PDI H-160	Kaninchen		1:100		Santa Cruz Biotechnology
α-Rab1A C-19	Kaninchen	1:500			Santa Cruz Biotechnology
α-Rab6A C-19	Kaninchen	1:1000			Santa Cruz Biotechnology
α-Rab18 D-5	Maus	1:500			Santa Cruz Biotechnology
α-Rab33A/B D-12	Maus	1:500			Santa Cruz Biotechnology

Antikörper	Spezies	Verdünnungen			Hersteller
		WB	IF	IP	
α-Rab33B 6F4	Maus	1:500			Sigma-Aldrich
α-Rab34 E-10	Maus	1:500			Santa Cruz Biotechnology
α-Tsg101 C-2	Maus	1:1000			Santa Cruz Biotechnology

Tab. 2 Sekundär-Antikörper im Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α-Maus-POX	Ziege	1:10000	Dianova (Hamburg)
α-Kaninchen-POX	Ziege	1:10000	Dianova
α-Ziege-POX	Kaninchen	1:10000	Dianova

Tab. 3 Sekundär-Antikörper in der Immunfluoreszenz

Antikörper		Spezies	Verdünnung	Hersteller
α-Kaninchen-Alexa Fluor®	488	Ziege	1:250	Molecular Probes
	546	Ziege	1:250	
	647	Ziege	1:125	
α-Maus-Alexa Fluor®	488	Ziege	1:400	Molecular Probes
	546	Ziege	1:400	
	647	Ziege	1:125	

2.1.2 Bakterienstämme

<i>E. coli DH5α</i>	chemisch kompetente Zellen (konditioniert nach Inoue <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli DH5α</i>	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Ingelheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich bezogen, sofern nicht anders erwähnt.

2.1.4 Enzyme

Tab. 4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase (AAA)	New England Biolabs
DNase I recombinant (RNase frei)	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Q5® HF DNA Polymerase	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	Roche
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Trypsin (2,5% in D-PBS)	PAA Laboratories (Cölbe)

2.1.5 Kits und Reagenzien

Tab. 5 Kits und Reagenzien

Kit	Hersteller
β-Gal Staining Kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Cytotoxicity Detektion Kit^{Plus}	Roche
Direct-zol RNA MiniPrep Kit	Zymo (Irvine, CA, USA)
Fluoprep	bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich)
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche
FastStart Universal Probe Master (Rox)	Roche
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche
LipofectamineTM Reagent	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Lipofectamine[®] RNAiMax Reagent	Life Technologies
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Plasmid DNA Purification, NucleoBond[®] Xtra Midi	Macherey-Nagel (Düren)
PlusTM Reagent	Life Technologies
PureProteomeTM Protein G Magnetic Beads	GE Healthcare Life Sciences (Chicago, IL, USA)
Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs
qScriptTM cDNA Synthesis Kit	Quanta BioSciences (Beverly, MA, USA)
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche

Kit	Hersteller
peqGold TriFast	Peqlab
Western Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer (Waltham, MA; USA)
Western Lightning® Plus-Ultra	PerkinElmer

2.1.6 Lösungen und Puffer

Die Lösungen und Puffer wurden in Anlehnung an die Protokolle nach Ausubel *et al.* (1989) und Sambrook *et al.* (1994) hergestellt. In Tab. 6 sind wichtige Lyse- und Probenpuffer vermerkt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tab. 6 Wichtige Lyse- und Probenpuffer

Name	Herstellung	
Laemmli-Probenpuffer	1x Laemmli-Probenpuffer	4x Laemmli-Probenpuffer
	10% Glycin 10% β -Mercaptoethanol 2% SDS 50 mM Tris-HCl (pH 6,8) Spatelspitze Bromphenolblau	30% Glycin 10% β -Mercaptoethanol 8% SDS 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) Spatelspitze Bromphenolblau
6x Probenpuffer ohne EDTA	50% Glycin Spatelspitze Bromphenolblau Xylencyanol in 6x TA-Puffer	
0,2% Triton-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,2% Triton X-100	

2.1.7 Molekulargewichtsstandards

50 bp <i>DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
1 kb <i>DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific

2.1.8 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden für Reaktionsansätze in der PCR und qPCR eingesetzt. Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Invitrogen by Thermo Fisher Scientific bezogen.

Tab. 7 Oligonukleotide in PCR und qPCR

Primer	Sequenz (5'→3')
CHMP1A.F	GTGTATGCCGAGAACGCCAT
CHMP1A.R	TTGGAGGCCACTGCGTCTA
CHMP1B.F	TGGAAGTTGCGAGGATACACG
CHMP1B.R	CGCGCACTCATTCTCAAGAAAT
CHMP2A.F	CGCGAGCGACAGAACTAGAG
CHMP2A.R	CCCGCATCAATACAACTTGC
CHMP3.F	AAGCATGGACGATCAGGAAGA
CHMP3.R	CTGGAAGGGCATCAGTCACTT
CHMP4A.F	GGGACCAAGAATAAGAGAGCTGC
CHMP4A.R	TGAAACTCCAGGGTGGATAATGT
CHMP4B.F	ATCAGTGGACCCGAAACAGTC

Primer	Sequenz (5'→3')
CHMP4B.R	CCAGCCCAGTTCTCCAATTCC
CHMP5.F	GACACCAAGACCACGGTTGAT
CHMP5.R	GGGTGCCATAACTGCGACTC
CHMP6.F	AAGGCCATCCTGCAACTGAAG
CHMP6.R	TGGCAGCTCTATTTGTTCTG
h-beta_Aktin_RT-F2	TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCC
h-beta_Aktin_RT-R1	AGAAGCATTTGCGGTGGACGAT
HBV-Assay-F	TGTCCTCCAACCTTGTCTGGTT
HBV-Assay-R	AGGCATAGCAGCAGGATGAAGA
HYG-Assay-F	AGCGAGAGCCTGACCTATTGCAT
HYG-Assay-R	AGTTCGGTTTCAGGCAGGTCTT
Rab33B-RT-F2	GGGTGGATTTCCGAGAACGAG
Rab33B-RT-R2	GCTGAACCATGCTCTTTCTGA
TBC1D25_F	CCTACCCCATGTCTTCTCTCC
TBC1D25_R	CTTCTTCCCACTCAAATCAAAGG

2.1.8.1 Probes

Die beiden Probes wurden von der Fa. Metabion (Planegg, Deutschland) gekauft.

Tab. 8 Probes in der TaqMan™-basierten qPCR

Primer	Sequenz (5'→3')
HBV-probe	FAM-ATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTT-BHQ1
HYG-probe	Yakima Yellow-TCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTT-BHQ1

2.1.8.2 Mutageneseprimer

Die Mutageneseprimer wurden bei Invitrogen by Thermo Fisher Scientific gekauft.

Tab. 9 Mutageneseprimer

Primer	Sequenz (5'→3')
MLV.Env.HA.f	CCTTCAGTCACCAAACCATACCCATACGATGTTCCAGATT ACGCTCCCAGTGGGACTGC AGTCTCCCCT
MLV.Env.HA.r	AGGGGAGACTGCAGTCCCCTGGGAGCGTAATCTGGAA CATCGTATGGGTATGGTTTGGT GACTGAAGG
MLV.Gag.FLAG.f	TCCGACAGGGACTATAAGGATGATGACGATAAGCTTGCG GGAGAGGCACCG
MLV.Gag.FLAG.r	CGGTGCCTCTCCCGCAAGCTTATCGTCATCATCCTTATA GTCCCTGTCGGA
Rescue1.f	GCTTGCATGCAAGCTTGTCGTTACATAACTTACGG
Rescue1.r	TCGAACTCCTACCGCCCA
Rescue2.f	ACGGGACTTTAAGCTTTGTCGTAACAACCTC
Rescue2.f	TGATTTTGGTGCCAAAAC
Rab18.S22N.f	GGTGGGCAAGAACAGCCTGCT

Primer	Sequenz (5'→3')
Rab18.S22N.r	CCACTCTCGCCGATGAT
Rab34.T66N.f	CATCAATAGGTTCTGCAAAGACACCTTTG
Rab34.T66N.r	GGCAATTCTTCCCCACCGACAGGT

2.1.8.3 Sequenzierungsprimer

Tab. 10 Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz (5'→3')	Hersteller
CMV forward	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	StarSeq (Mainz)
pEGFP-C1	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	StarSeq
RES.SEQ	CCAGTCACGACGTTGTAA	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

2.1.9 siRNAs

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle siRNAs als Pool mit vier verschiedenen Ziel-Sequenzen verwendet. Als siControl diente die *AllStar Negative Control* von Qiagen, welche „nonsense“ Sequenzen beinhaltet. Alle anderen siRNAs wurden bei Sigma-Aldrich und Thermo Fisher Scientific erworben.

Tab. 11 siRNA

siRNA	sense-Sequenz (5'→3')
siAlix (<i>single</i>)	GCAGUAAUAUGUCUGCUCA
siCHMP1A	GAAGGUCUCCUCAGUGAUG GAGAACGCCAUCCGCAAGA CACCGCGUCUUGCCUUUGU GGUGUUGAGUUUCUGCAA

siRNA	sense-Sequenz (5'→3')
siCHMP1B	GAAGAUUUCUGCUUUGAUG GGAGCAGGAUGAACUGUCU GAUAUGCUGCUCCAGGAAA GAGGAUACACGCCGAAAAU
siCHMP2A	AGGCAGAGAUCAUGGAUUAU GCGCAAGUUUGUAUUGAUG UUAAGAAGAUGGCCAAGCA CAGAUGAGCUGUCGAACCU
siCHMP2A #2 (single)	GCGCAAGUUUGUAUUGAUG
siCHMP2B	GAAGAUGGCUGGAGCAAUG UAAGGAAGCUUGCAAAGUU GCUCGAAGCUUACCAUCUG GCCAGGAUUAUUGUGAAUCA
siCHMP3	UGACAGAAUUCUCUUUGAA GAAGAGCACAGAAGUGAUG GGGCAAAGCACCCAGUAAA AGAACCAGCUCGCGGUCUU
siCHMP4A	CAAGGUAGAUGAACUGAUG UAAGAGAGCUGCCCUACAG GGAAUUGGCCCAGGAGUUG GAAGCAAUACAGAAACUGA
siCHMP4B (single)	GGCUAUGCCGCCAAGGCCA
siCHMP4B	AGGCAGAGAUCAUGGAUUAU GCGCAAGUUUGUAUUGAUG UUAAGAAGAUGGCCAAGCA CAGAUGAGCUGUCGAACCU

siRNA	sense-Sequenz (5'→3')
siCHMP5 (<i>single</i>)	CAGAAAGCCUUGCGAGUUU
siCHMP6	UCACCCAGAUCGAAAUGAA CGCAAUCACUCAGGAACAA GAGUACCAGCGGCAAUAG CGGAUUAACUCUCGACCGA
siEAP20	GUCGAUCCAGAUUGUAUUA GGGAAACUCAUCUAUCAGU GCACAAGGCCGAGAUCAUC CAGAACAACUCCGUCUUUA
siEAP30 #2 (<i>single</i>)	GAAUGGAGGUCUGAUAAACU
siEAP45 #2 (<i>single</i>)	GGAAUAUUGCAGGUGCCUU
siHRS (<i>single</i>)	AGAGACAAGUGGAGGUAAA
siNedd4-1	GGGAUUCUUUGAACUAAUA GGAGGGAACAUACAAAGUA GAUCACAAUCCAGAACGA GAUCACAAUCCAGAACGA
siOATL1 (<i>single</i>)	GGAGCCUUCACUUCGUUUU
siRab1A	GAACAAUCACCUCCAGUUA CAAUCAAGCUUCAAUAUG GGAAACCAGUGCUAAGAAU CAGCAUGAAUCCCGAAUUA
siRab1B	UGCGGUGGGAUUCUGAGUAUUA AUGCCAGCGAGAACGUCAAUA CUGCGGUGGGAUUCUGAGUAUA CGGUUCUGUCAGGGUCCCUAA

siRNA	sense-Sequenz (5'→3')
siRab6A	GAGAAGAUUAUGAUUGACAU GAGCAACCAGUCAGUGAAG AAGCAGAGAAGAUUAUGAUU CCAAAGAGCUGAAUGUUAU
siRab6A 3'UTR (<i>single</i>)	CUUAGAAGUAGAAGAACAU
siRab18	CAAGAGAGGUUUAGAACAU CAAUAGGUGUUGACUUUAA GAAAGUGAGAACCAGAAUA ACGAAAGCAUCCAUGUUA
siRab18 3'UTR (<i>single</i>)	GCUAAGGAAUUAUAGAAUCA
siRab33B	CACAAACCAUUAUUGCUUA GAUAGAAGAAUGCAAACAA GAUAUACCACGGAUUCUUG GGUGGAUUUCCGAGAACGA
siRab34	AGACUUGCCUCAUUAUAG AGAAGAAGCCCACAUGUUG CAGGAGAGGUUCAAAUGCA AGAAUGACCCUCCAGUGU
siTsg101 #4 (<i>single</i>)	CUCAAUGCCUUGAAACGAA

2.1.10 Vektoren

Tab. 12 Vektoren

Vektor	Tag	Quelle
p3xFlag-CMV-14	Flag	Sigma-Aldrich

Vektor	Tag	Quelle
pCEP4ΔCMVΔSV40/1.1xHBV (pHBV)		Dr. Jens T. Stieler (Mainz)
pCL-Eco		zur Verfügung gestellt von: Inder Verma; Addgene #12371 (Naviaux <i>et al.</i> , 1996)
pCL-MFG-LacZ		Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
pCMV.myc	Myc	Clontech
pCMVΔ19-459.myc-Rescue	Myc	Christina Bartusch
pCMVΔ19-459.myc.Rab6A.WT-Rescue	Myc	Christina Bartusch
pCMVΔ19-459.myc.Rab6A.DN-Rescue	Myc	Christina Bartusch
pCMVΔ19-459.myc.Rab33B.WT-Rescue	Myc	Christina Bartusch
pCMV-intron.myc.Rab1A.WT	Myc	Zur Verfügung gestellt von: Terry Hébert; Addgene #46776 (Dupré <i>et al.</i> , 2006)
pCMV-intron.myc.Rab1A.DN (S25N)	Myc	Zur Verfügung gestellt von: Terry Hébert; Addgene #46777 (Dupré <i>et al.</i> , 2006)
pCMV-intron.myc.Rab6A.WT	Myc	Zur Verfügung gestellt von: Terry Hébert; Addgene #46781 (Dupré <i>et al.</i> , 2006)
pCMV-intron.myc.Rab6A.DN (T27N)	Myc	Zur Verfügung gestellt von: Terry Hébert; Addgene #46782 (Dupré <i>et al.</i> , 2006)
pCMV6-XL5.Rab18		Amsbio/ Origene (Rockville, MD, USA)

Vektor	Tag	Quelle
pEGFP-C1.Rab18.WT	GFP	Christina Bartusch
pEGFP-C1.Rab18.DN (S22N)	GFP	Christina Bartusch
pEGFP.Rab33B.WT	GFP	Zur Verfügung gestellt von: Mitsunori Fukuda (Japan)
pEGFP.Rab33B.DN (T47N)	GFP	Zur Verfügung gestellt von: Mitsunori Fukuda (Japan)
pCMV6-Entry.myc-Rab34	Myc	Amsbio/ Origene
pCMV6-Entry.myc-Rab34.DN (T66N)	Myc	Christina Bartusch
pGeneClip™hMGFP	hMGFP	Qiagen (Venlo, Niederlande)
pHBV Δ Env		Dr. Jens T. Stieler (Mainz)
pHBV Δ HP		Dr. Jens T. Stieler (Mainz)
MLV.Gag ^{YFP}	YFP	Zur Verfügung gestellt von: Walther Mothes; Addgene #1813 (Sherer <i>et al.</i> , 2003)
MLV.WT ^{FLAG/HA}	FLAG/HA	Christina Bartusch
pNI2.S.HA	HA	Lambert & Prange, 2001
shC.HA-Bet1	HA	Christina Bartusch
shRab33 #2.HA-Bet1	HA	Christina Bartusch

2.1.11 Zelllinien

HEK 293T (<i>human embryonic kidney cells</i>)	Zur Verfügung gestellt von: PD Dr. Luise Florin (Mainz)
HepG2 (<i>human hepatocellular carcinoma cells</i>)	<i>American Type Culture Collection</i>
HepG2215 (HBV-replizierende Zelllinie)	Zur Verfügung gestellt von: Patrick Gerner (Mainz)
HuH-7 (<i>human hepatocellular carcinoma cells</i>)	<i>Japanese Collection of Research Bioresources</i>
NIH 3T3 (<i>murine fibroblast cells</i>)	Zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Dirk Prawitt (Mainz)

2.1.12 Software

Adobe	Illustrator, Indesign, Photoshop
AxioVision	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena)
Microsoft	Word, Excel, Powerpoint
NEBaseChanger™	New England Biolabs
PlasmaDNA	Angers-Loustau <i>et al.</i> (2007)
TINA	Version 2.09g, 1993, Isotopenmessgeräte GmbH

2.2 Mikrobiologische Methoden

Die Herstellung und Transformation chemokompetenter Bakterien und das Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen wurde in Anlehnung an die Protokolle nach Ausubel *et al.* (1989) und Sambrook *et al.* (1994) durchgeführt.

2.3 DNA- und RNA-Standardmethoden

2.3.1 Isolierung bakterieller DNA

Mini- und Midipräparationen von Plasmid-DNA wurden mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) bzw. dem Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.2 Isolierung viraler DNA

Die Isolierung viraler DNA erfolgte mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit der Fa. Roche nach beiliegendem Protokoll. Im letzten Schritt wurde die Probe in 70 µl Aq. bidest. eluiert.

2.3.3 RNA-Isolierung

Zellen wurden mit peqGOLD TriFast (Peqlab) behandelt, welches die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen erlaubt. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem Direct-zol RNA MiniPrep Kit der Fa. Zymo.

2.3.4 cDNA-Synthese

Zuvor isolierte RNA Proben wurden zunächst am Nanodrop (Peqlab) gemessen und auf eine gleiche Menge eingestellt. Dann erfolgte ein DNase I Verdau (Roche) in einem 20 µl Ansatz:

<i>Incubation buffer</i> (10x)	2 μ l	Thermocycler-Programm: 20 min bei 30°C 10 min bei 75°C
DNase I	0,5 μ l	
RNA	10 μ l	
Aqua bidest.	7,5 μ l	

Nach dem DNase I Verdau wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das qScript™ cDNA Synthesis Kit der Fa. Quanta BioSciences nach beigefügtem Protokoll benutzt. Die gewonnene cDNA wurde, soweit nicht anders beschrieben, 1:10 mit Aq. bidest. verdünnt und bei -80°C gelagert.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese wandern negative DNA-Moleküle durch ein elektrisches Feld zur positiv geladenen Kathode. Abhängig von der Größe des DNA-Moleküls wurde die Porengröße des Agarose-Gels angepasst (0,5%-1,5%). Zur Visualisierung der DNA wurde der Farbstoff Ethidiumbromid (Roth) bei der Vorbereitung eines Agarose-Gels zugegeben. Die DNA Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Das Agarose-Gel wurde in einer Kammer mit 1x TAE-Laufpuffer beladen und bei einer Spannung von 80-150 V für 45 min gefahren. Als Molekulargewichtsstandard wurden entweder 50 bp-Marker oder 1 kb-Marker (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Aufnahme von Gelbildern erfolgte mit einer Geldokumentation der Fa. Biometra unter UV-Licht.

2.3.6 Aufreinigung von DNA

Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen und die Aufreinigung von PCR-Produkten wurden mittels des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.7 Klonierung

Zur Spaltung von DNA wurden Restriktionsenzyme der Fa. New England Biolabs eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verwendet. Abhängig von der

Klonierungsstrategie erfolgte die Modifizierung der Enden eines DNA-Moleküls durch Blunting. Dazu wurde das Klenow Fragment (New England Biolabs) nach Herstellerangaben eingesetzt. Wenn nach der Restriktion kompatible Enden vorlagen, kann dies zu einer Re-Ligation des Vektors führen. Falls dies nicht eintreten sollte, wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt, um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Dazu wurde die Antarctic Phosphatase (New England Biolabs), wie im Protokoll angegeben, benutzt. Durch die T4 DNA Ligase (Roche oder New England Biolabs) wurden die Enden der Ziel-DNA kovalent miteinander verknüpft. Abschließend erfolgte die Transformation im *E. coli*-Stamm *DH5 α* .

2.3.8 Mutagenese

Gerichtete Mutagenesen wurden mit dem Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit der Fa. New England Biolabs nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Primer wurden mit der Software NEBaseChanger[®] (New England Biolabs) designt.

2.3.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der erstellten Konstrukte wurden von der Firma StarSEQ[®] Sequencing Service in Mainz durchgeführt. Die verwendeten Sequenzierungsprimer finden sich im Abschnitt 2.1.8.3.

2.3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation eines spezifischen Nukleotidabschnitts der DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Nach der (initialen) Denaturierung der DNA-Doppelstränge folgt die Bindung synthetisch hergestellter Oligonukleotide (Primer) an die Stränge (*Annealing*). Abhängig von dem Design der Primer können so Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in der DNA-Sequenz eingeführt werden. Unter Verwendung der Q5[®] HF DNA Polymerase (New England Biolabs) wird ausgehend vom 3'-Hydroxylende der Primer ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert (Elongation). Denaturierung, *Annealing* und Elongation werden zyklisch wiederholt und ermöglichen so die exponentielle Vervielfältigung der DNA. In dieser Arbeit wurden Mutagenese-PCRs durchgeführt, um dominant-negative Mutanten der

Proteine Rab18 und Rab34 zu erzeugen.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 25 μ l:

<i>Forward</i> Primer (10 μ M)	1,25 μ l
<i>Reverse</i> Primer (10 μ M)	1,25 μ l
<i>Enhancer</i> (5x)	5 μ l
<i>Reaction Buffer</i> (5x)	5 μ l
dNTPs (10 mM)	0,5 μ l
Q5 [®] HF DNA Polymerase (2x)	0,25 μ l
DNA (10 ng)	0,5 μ l
Aq. bidest.	11,25 μ l

Die PCR fand unter folgenden Bedingungen statt:

- | | | | |
|--------------------------|---------|-------|-------------|
| • Initiale Denaturierung | 98°C | 30 s | |
| • Denaturierung | 98°C | 10 s | } 35 Zyklen |
| • <i>Annealing</i> | 55-65°C | 30 s | |
| • Elongation | 72°C | 30 s | |
| • finale Elongation | 72°C | 2 min | |

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 5 μ l der Amplifikate auf einem Agarose-Gel aufgetrennt.

2.3.11 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Zur Gen-Expressionsanalyse wurden quantitative Echtzeit-PCRs (qPCRs) durchgeführt. Das Prinzip der qPCR basiert auf der Amplifikation einer doppelsträngigen Nukleinsäure und der zeitgleichen Quantifizierung durch Fluoreszenz-Messung eines Farbstoffs. Dabei nimmt das Fluoreszenzsignal proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu. Das Fluoreszenzsignal wird in jedem

PCR-Zyklus gemessen. Die Zykluszahl, bei welcher das Signal den Schwellenwert überschreitet, wird *cycle threshold* (Ct-Wert) genannt. Dabei tritt die Fluoreszenz des PCR-Produkts in diesem Zyklus signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz. Bei optimalen Bedingungen verdoppelt sich die DNA-Menge pro Zyklus (Effizienz = 2). Die Effizienz der qPCR ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Probenqualität oder der Leistung des Mastermix. Die relative PCR-Effizienz liegt bei 1,7 bis 1,9.

2.3.11.1 SYBR Green-basierte qPCR

Bei der SYBR Green-basierten qPCR wurde der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR Green der Fa. Roche verwendet. Der Ansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl:

<i>Forward</i> Primer (10 µM)	1 µl
<i>Reverse</i> Primer (10 µM)	1 µl
SYBR Green Mastermix (2x)	10 µl
cDNA	5 µl
Aq. bidest.	3 µl

Das verwendete Thermocycler-Programm des 7300/7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) lautete wie folgt:

- Aktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase 50°C 2 min
- Aktivierung der *AmpliTaq* DNA-Polymerase 95°C 10 min
- Denaturierung 95°C 15 s } 40 Zyklen
- *Annealing* und Elongation 60°C 60 s }
- 95°C 15 s
- 60°C 60 s Schmelzpunktanalyse
- 95°C 15 s

Die cDNA der Proben wurde 1:10 verdünnt in der qPCR eingesetzt. Die Effizienz der qPCR wurde durch eine Verdünnungsreihe bewertet. Dazu wurde eine Probe in den

drei Verdünnungsstufen 1:5, 1:10 und 1:20 aufgetragen. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde über eine Schmelzpunktanalyse und über eine Größenanalyse im Agarose-Gel verifiziert. Die Expression eines Gens wurde gegen das Referenzgen β -Aktin normalisiert. Die Quantifizierung der Expression erfolgte über die delta-delta-Ct-Wert-Methode ($\Delta\Delta$ Ct-Wert-Methode), bei der die errechneten Δ Ct-Werte der behandelten Zellen nochmal in Bezug zu den Δ Ct-Werten der Kontrollzellen gesetzt werden:

$$\Delta\text{Ct-Wert (behandelte Zellen)} = \text{Ct-Wert Gen} - \text{Ct-Wert Referenzgen}$$

$$\Delta\text{Ct-Wert (Kontrollzellen)} = \text{Ct-Wert Gen} - \text{Ct-Wert Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct-Wert} = \Delta\text{Ct-Wert (behandelte Zellen)} - \Delta\text{Ct-Wert (Kontrollzellen)}$$

$$x \text{ fold change} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct-Wert})}$$

2.3.11.2 TaqMan™-basierte Multiplex-qPCR

Die TaqMan™-basierte qPCR erlaubt die Amplifikation und den spezifischen Nachweis des PCR-Produktes in nur einer Reaktion. Diese PCR basiert auf dem 5'-Nuklease-Assay von Holland *et al.* (1991) und wurde von Lee, Connell & Bloch (1993) weiterentwickelt. Eine TaqMan™ PCR Sonde zeichnet sich durch einen Fluoreszenz-Reporterfarbstoff am 5'-Ende und einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende aus. Befinden sich der Fluoreszenz- und der Quencher-Farbstoff in unmittelbarer Nähe, wird das ausgesendete Fluoreszenz-Signal des Reporterfarbstoffs vom Quencher ausgelöscht. Bei der PCR-Reaktion lagern sich Sonde und der PCR-Primer sequenzspezifisch an. Während der Primer-Extension kommt es zur Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq* Polymerase. Durch die Hydrolyse der Sonde werden Reporterfarbstoff und Quencher-Farbstoff freigesetzt. Das Fluoreszenzsignal wird nicht mehr blockiert und kann gemessen werden. Durch die Verwendung verschiedener Reporterfarbstoffe ist die Detektion unterschiedlicher PCR-Produkte in einer Multiplex-qPCR möglich.

Da die transfizierte HBV Plasmid-DNA (HBV) genetisch identisch mit neugebildeter Virus-DNA ist, wurden zwei Primer/Sonden (*probe*)-Sets benutzt, die entweder gegen das HBV Genom (HBV-Assay Primer/HBV-*probe*) oder das Hygromycin-Resistenzgen des Plasmid-Rückgrads (HYG-Assay Primer/HYG-*probe*) gerichtet waren. Neu

gebildete Virus-DNA wurde mit dem HBV Primer/Sonden-Set und die Plasmid-DNA sowohl mit dem HBV als auch mit dem HYG Primer/Sonden-Set amplifiziert. Die Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve des HBV-Genoms ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^6$ fg/ μ l) für HBV und HYG. Die Menge an neu gebildeter Virus-DNA errechnete sich durch Subtraktion der HYG-Werte von den HBV-Werten der qPCR. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen.

Der Ansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μ l:

HBV Assay_F Primer (10 μ M)	0,4 μ l
HBV Assay_R Primer (10 μ M)	0,4 μ l
HYG Assay_F Primer (10 μ M)	0,4 μ l
HYG Assay_R Primer (10 μ M)	0,4 μ l
HBV-probe (10 μ M)	0,2 μ l
HYG-probe (10 μ M)	0,2 μ l
Probe Mastermix (2x)	10 μ l
DNA	5 μ l
Aq. bidest.	4 μ l

Die qPCR wurde nach folgendem Programm im 7300/7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) gefahren:

- Aktivierung der Uracil-DNA-Glykosylase 50°C 2 min
- Aktivierung der *AmpliTaq* DNA-Polymerase 95°C 10 min
- Denaturierung 95°C 15 s } 40 Zyklen
- *Annealing* und Elongation 60°C 60 s }

2.4 Zellkultur-Techniken

2.4.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM, Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 5 µg/ml Ciprofloxacin, weiterhin als Zellmedium bezeichnet, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das verbrauchte Zellmedium abgenommen und die Zellen kurz mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS/2,5 mM EDTA/0,25% Trypsin für 5 min inkubiert und die Reaktion mit frischem Zellmedium abgestoppt. Von der Zellsuspension wurde 1/10 in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Zellmedium versetzt. Alle zwei Monate wurden kryokonservierte Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und neu kultiviert.

2.4.2 Transiente Transfektion von DNA

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Zelllinien mittels Lipofektion transient transfiziert. Am Tag zuvor wurden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 80% Konfluenz erreichten. DNA, Transfektionsreagenzien Plus™, Lipofectamine™ (Life Technologies) und Optimem® (Life Technologies) wurden wie in Tab. 13 beschrieben eingesetzt und nach Herstellerangaben inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Transfektionsansatz vollständig abgenommen und durch frisches Zellmedium ersetzt. Die transiente Proteinexpression erfolgte über 24 - 72 h.

Tab. 13 DNA-Transfektion

Zellkulturschale	1. Ansatz DNA + Plus™ + Optimem®	2. Ansatz Lipofectamine™ + Optimem®	Optimem®
12-Well	2 µg + 2,4 µl + 40 µl	1,6 µl + 40 µl	0,32 ml
6-Well	4 µg + 6 µl + 100 µl	4 µl + 100 µl	0,8 ml

2.4.3 Transiente Transfektion von siRNA

Zur post-transkriptionellen Genregulation (RNA-Interferenz) werden kleine RNA-Moleküle, wie siRNAs (*small interfering RNAs*), eingesetzt (Fire *et al.*, 1998). Die verwendeten siRNAs sind gegen spezifische Sequenzen innerhalb des ORFs der mRNA des Ziel-Proteins gerichtet. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine etwa 50%-ige Konfluenz aufwiesen. Tab. 14 fasst die eingesetzten Volumina von siRNA, Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent (Life Technologies) und Optimem[®] (Life Technologies) zusammen. Die Transfektion wurde wie im Protokoll des Herstellers angegeben angewandt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM/10% FCS kultiviert. Die Depletionsdauer betrug, soweit nicht anders angegeben, 48 h.

Tab. 14 siRNA-Transfektion

Zellkulturschale	1. Ansatz siRNA (20 µM) + Optimem [®])	2. Ansatz Lipofectamine [®] RNAiMAX + Optimem [®]	DMEM/ 10% FCS
12-Well	0,9 µl + 200 µl	2 µl + 200 µl	1 ml
6-Well	2,25 µl + 250 µl	5 µl + 250 µl	2,5 ml

2.5 Protein-Methoden

2.5.1 Aufarbeitung von Zellen und Überstand der MLV-Proben

Nach einer transienten Transfektion wurde der Überstand zunächst filtriert (Ø 0,45 µm), um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Zur Einkonzentration der MLV VLPs oder Virionen wurde der filtrierte Überstand auf ein 20%-iges Sucrose-Kissen (20% w/v Sucrose, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5) geschichtet und für 4 h bei 40000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert. Die Pellets wurden abschließend in 70 µl 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C gekocht. Die Zellen wurden zweimal mit 1x TBS gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte mit 1x Laemmli-Probenpuffer und die Proben wurden anschließend für 10 min bei 95°C gekocht. Die

Proben wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.5.4) und Western Blot (Kapitel 2.5.5) analysiert.

2.5.2 Aufarbeitung von Zellen und Überstand der HBV-Proben

Der Zellkultur-Überstand wurde nach transienter Expression zunächst abgenommen und für 10 min bei 200 rcf und RT zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Zellen zweimal mit 1x PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen wurden, erfolgte der Aufschluss mit 0,2% Triton-Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,2% Triton X-100) für 15 min auf Eis. Die Zellen wurden durch gründliches Ausspülen vom Boden gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden die Zelllysate für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das klare Zelllysate wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Weiterverarbeitung von Überstand und Zelllysate in der Immunpräzipitation (Kapitel 2.5.3) wurden pro Probe 1000 μl Überstand und 500 μl Zelllysate benötigt. Für die Analyse in SDS-PAGE (Kapitel 2.5.4) und Western Blot (Kapitel 2.5.5) wurden 60 μl Zelllysate mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C gekocht. Daneben erfolgte die Messung der Proteinmenge (mit 1:10 Zelllysate, Kapitel 2.5.6) und die Überprüfung der Zytotoxizität (mit 100 μl Überstand; Kapitel 2.5.7).

2.5.3 Immunpräzipitation der HBV-Proben

Um intrazelluläre Nukleokapside aus dem Zelllysate oder extrazelluläre Virionen aus dem Überstand zu isolieren, wurde eine Kapsid-spezifische oder Hüllprotein-spezifische Immunpräzipitation (IP) mit Hilfe von PureProteome™ Protein G Magnetic Beads (GE Healthcare Life Sciences), im Folgenden Protein G Beads genannt, durchgeführt. Das Protokoll mit allen Angaben bezüglich der Volumina von Probe, Protein G Beads und Antikörpern ist ausführlich in Tab. 15 dargestellt. Die Protein G Beads wurden zunächst der Original-Suspension entnommen und durch Waschen mit 1x PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)/2% FCS vorbereitet. Darauffolgend wurden die Proben zunächst mit vorbereiteten, gewaschenen Protein G Beads für 1 h bei RT im Drehrad vorgereinigt. In einem parallelen Ansatz erfolgte die Beschichtung der vorbereiteten, gewaschenen Protein G Beads mit Antikörpern gegen HBV-Kapside oder HBV-

Hüllproteine, ebenfalls für 1 h bei RT im Drehrad. Dann wurden die Antikörper-beschichteten Protein G Beads dreimal mit 1x PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)/2% FCS gewaschen. Zur IP wurden die gewaschenen, Antikörper-beschichteten Protein G Beads mit der vorgereinigten Probe üN bei 4°C im Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Protein G Beads dreimal mit 1x PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)/2% FCS gewaschen und abschließend in Benzonase-Reaktionspuffer (100 µl Benzonase (10 U/µl), 200 µl 10% Triton X-100, 10 ml 1x PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)/2% FCS) aufgenommen. Der Benzonase-Verdau dauerte 2 h bei 37°C im Überkopfschüttler. Durch die Benzonase werden freie, residuale Nukleinsäuren der Transfektion und der Wirtszelle degradiert, während die virale DNA im Kapsid vor diesem Abbau geschützt bleibt. Als letzte Arbeitsschritte folgten die Isolation der viralen DNA mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) und die Quantifizierung der Nukleokapside und Virionen durch qPCR, wie in Kapitel 2.3.2 und 2.3.11.2 erläutert.

Tab. 15 Immunpräzipitation der HBV-Proben

	pro Zelllysat Probe	pro Überstand Probe
Vorbereitung der Protein G Beads	25 µl der Original-Suspension der Protein G Beads	
	einmaliges Waschen mit 50 µl 1x PBS (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)/2% FCS	
	aufnehmen in 50 µl 1x PBS (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)/2% FCS	
Vorreinigung der Probe	20 µl gewaschene Protein G Beads + 500 µl Zelllysat → 1 h bei RT im Drehrad	20 µl gewaschene Protein G Beads + 1000 µl Überstand → 1 h bei RT im Drehrad
Beschichtung des Antikörpers zur Kapsid-spezifischen IP	30 µl gewaschene Protein G Beads + 3,5 µl K45 Antikörper → 1 h bei RT im Drehrad	30 µl gewaschene Protein G Beads + 3,5 µl K45 Antikörper → 1 h bei RT im Drehrad
Beschichtung des Antikörpers zur Hüllprotein-spezifischen IP	-	30 µl gewaschene Protein G Beads + 1,5 µl K38 Antikörper + 1,2 µl K1350 Antikörper → 1 h bei RT im Drehrad
Waschen der Antikörper-beschichteten Protein G Beads	dreimaliges Waschen mit 30 µl 1x PBS (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)/2% FCS	
	aufnehmen in 30 µl 1x PBS (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)/2% FCS	
IP der Probe	30 µl gewaschene, Antikörper-beschichtete Protein G Beads + 500 µl vorgereinigtes Zelllysat → üN bei 4°C im Drehrad	30 µl gewaschene, Antikörper-beschichtete Protein G Beads + 500 µl vorgereinigter Überstand → üN bei 4°C im Drehrad
Waschen der Protein G Beads nach IP	dreimaliges Waschen mit 30 µl 1x PBS (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)/2% FCS	
	aufnehmen in 200 µl Benzonase-Reaktionspuffer (100 µl Benzonase (10 U/µl), 200 µl 10% Triton X-100, 10 ml 1x PBS (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)/2% FCS) → 2h bei 37°C im Überkopfschüttler	

2.5.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine von Laemmli (1970) beschriebene Methode zur Auftrennung von Proteinen. Die Durchführung erfolgte nach den Protokollen von Ausubel *et al.* (1989) und Sambrook *et al.* (1994).

2.5.5 Western Blot

Nachdem die Proteine durch die SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden sie auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Die beiden Membranen zeichnen sich durch unterschiedliche Eigenschaften aus. PVDF-Membranen haben u.a. eine höhere Proteinbindungskapazität und besitzen dadurch eine höhere Sensitivität. Diese kann allerdings unter Umständen zu einem erhöhten Hintergrund führen. Bei den Experimenten mit MLV wurden Nitrozellulose-Membranen verwendet, während bei den Experimenten mit HBV PVDF-Membranen genutzt wurden. Erwähnenswert ist, dass die PVDF-Membran vor dem Transfer in 100% Methanol äquilibriert wurden. Im Laemmli-Probenpuffer befand sich Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergenz, welches die Proteine denaturiert und überlagert. Beim Anlegen eines elektrischen Felds können die nun negativ geladenen Proteine von der Gelmatrix auf eine Membran übertragen werden. Die Proteine haften aufgrund von hydrophoben und polaren Wechselwirkungen an die Membranoberfläche.

Beim Tank-Blot-System wurden alle Bestandteile zuerst in 1x Tris-Glycin/20% Methanol-Transferpuffer äquilibriert und wie folgt aufeinandergeschichtet: schwarze Kassetten-Platte, Schwamm, 2x Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, 2x Filterpapier, 2x Schwamm, durchsichtige Kassetten-Platte. Es war darauf zu achten, dass beim Schichten keine Luftblasen entstehen. Nachdem die Blot-Sandwich-Kassette in die Blotkammer gesteckt und mit 1x Tris-Glycin/20% Methanol-Transferpuffer gefüllt wurde, erfolgte der Transfer bei 400 mA für 2 h oder bei 150 mA üN. Bei nativen Agarose-Gelen wurde der Kapillartransfer angewendet. Das Agarose-Gel, Whatmanpapier und eine Nitrozellulose-Membran wurden in 10x Natriumchlorid-Natriumcitrat (*standard saline citrat*, SSC)-Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau beim

Kapillartransfer war wie folgt: Filterpapier, Agarose-Gel, Nitrozellulosemembran, 2x Filterpapier, 2x trockenes Filterpapier, Stapel trockener Zellstoff und 1 kg Gewicht zum beschweren. Durch die Kapillarwirkung wurden die Proteine üN auf die Membran transferiert.

Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran nach dem Transferlauf mit Ponceau-S-Lösung (0,1% Ponceau in 3% TCA-Lösung) reversibel angefärbt. Nach der Entfärbung mit 1x PBS wurde die Membran 30 min mit Blockierlösung (5% fettfreiem Magermilchpulver in 1x PBS-T) inkubiert. Die Proteine der Milch sättigen dabei alle freien Bindungsstellen der Membran ab. Danach wurde der primäre Antikörper, wie in 2.1.1 beschrieben, in Blockierlösung verdünnt und für 2 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Durch drei 15-minütige Waschschrte mit 1x PBS-T wurde ungebundener Antikörper entfernt. Nachfolgend wurde der sekundäre Antikörper für 1 h appliziert (Tab. 1). Abschließend wurde die Membran zweimalig mit 1x PBS-T für 15 min und einmalig mit 1x PBS für 15 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper ist an ein Enzym, die Meerrettichperoxidase (POX), gekoppelt. Durch die Kopplung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper, welcher das zu detektierende Protein bindet, kann das Protein mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Für die Reaktion wurde Luminol, das Substrat, und Wasserstoffperoxid der Fa. PerkinElmer im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Bei der Oxidation von Luminol mit Wasserstoffperoxid durch die Meerrettichperoxidase entsteht Lumineszenz, welche auf Filme übertragen wird. Die densitometrische Auswertung der Filme erfolgte mit dem Programm *TINA 2.09 g* der Fa. Raytest Isotopenmessgeräte.

2.5.6 Proteinbestimmung mittels Bradford-Test

Um den Proteingehalt einer Probe zu bestimmen, wurde der Bradford-Test eingesetzt. Der im Bradford-Reagenz (hergestellt nach Bradford (1976)) enthaltene Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 (Serva) bildet Komplexe mit den Aminosäure-Seitenketten der Proteine, welches sich in der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm (rot: ungebundene, kationische Form) nach 595 nm (blau: unprotonierte, anionische Form) äußert. Das zu bestimmende Zelllysate wurde 1:10 in Aq. bidest. verdünnt. Der verwendete 0,2%

Triton-Lysepuffer diente als Negativkontrolle. Rinderserumalbumin (BSA) wurde als Standardprotein verwendet. Ausgehend von einer 1,2 mg/ml BSA-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Je 0/20/50/150 und 200 µl der BSA-Lösung wurden mit Aq. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Pro Well wurden 16 µl der Standard-Verdünnungsreihe oder der unbekanntes Probe mit 120 µl Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption bei 450 nm und 620 nm (Referenz) im Plattenleser gemessen. Der Quotient beider Wellenlinien war das Maß für die Proteinmenge.

2.5.7 Zytotoxizitätsbestimmung mittels LDH-Test

Bei der Zerstörung von Membranstrukturen werden intrazelluläre Moleküle, wie u.a. das Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH), freigesetzt. Der Fortschritt der Zerstörung korreliert mit der Menge an LDH und ist ein Maß für die Zytotoxizität einer Substanz. Zur Analyse einer Probe wurden 100 µl Überstand benötigt. Der LDH-Test wurde mit dem Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (Roche) nach Angaben des Herstellers in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 450 nm und 620 nm (Referenz) in einem Plattenleser. Der LDH-Wert ergibt sich aus der Differenz beider Werte.

2.5.8 Analyse von löslichen und unlöslichen Proteinfractionen

Transient transfizierte HuH-7 Zellen wurden mit Radioimmunpräzipitation (RIPA)-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0,5% Desoxycholat, 0,1% SDS, Proteaseinhibitor) für 30 min auf Eis lysiert. Die löslichen und unlöslichen Proteinfractionen im Zelllysate wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C separiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 und 1% SDS resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl RIPA-Puffer und die Behandlung mit Ultraschall im Ultraschallbad für 20 s.

2.5.9 Immunfluoreszenz

Abhängig von der Transfektionslänge wurden die Zellen für Immunfluoreszenz-Experimente entweder direkt auf Deckgläschen ausgesät oder während der transienten Transfektion auf Deckgläschen gesplittet. Vor dem Fixieren erfolgte die

Zugabe von 1 µg/ml Cycloheximid (AppliChem) für 6 h unter Zellkulturbedingungen zur Synchronisierung der Proteinbiosynthese. Dies wurde im Falle von HBV-replizierenden Zellen nicht gemacht, da der Stoff Cycloheximid als Nebeneffekt zu einer Verstärkung der Autophagie führt, was in diesem Fall unerwünscht war. Die Zellen bei MLV-Experimenten wurden zunächst mit 1x PBS gewaschen und dann für 10 min mit eiskaltem 100% Methanol/2 mM EGTA fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Bei den HBV-Experimenten wurden die Zellen, soweit nicht anders angegeben, nach einmaligem 1x PBS-Waschschritt mit 4% Paramformaldehyd (PFA) für 10 min fixiert und dann dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,2% Triton X-100 für weitere 10 min. Die Zellen wurden erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 1x PBS/1% BSA für 30 min bei RT blockiert. Dann schloss sich die Inkubation des primären Antikörpers für 1 h bei 37°C an. Nach zwei Waschschritten mit 1x PBS und einem Waschschritt mit 1x PBS/1% BSA für je 15 min wurden die Zellen mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Verdünnungen der Primär- und Sekundär-Antikörper sind in Kapitel 2.1.1 zusammengefasst. Die DNA wurde für 10 min mit 1:20000 Hoechst-Farbstoff 33342 (Sigma-Aldrich) gefärbt. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS und einmal mit 1x PBS/1% BSA für je 15 min gewaschen. Zum Eindeckeln der Deckgläschen auf einem Objektträger wurde Fluoprep der Fa. bioMérieux benutzt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 100x (1.4 NA) und einer AxioCam Digitalkamera (Zeiss). Zur Dokumentation wurde die Axiovision Software v4.7.1 (Zeiss) benutzt.

2.5.10 MLV Infektions-Test

Für den MLV Infektions-Test wurden HuH-7 Zellen zunächst für 48 h mit spezifischen siRNAs transfiziert. Danach erfolgte die Ko-Transfektion mit MLV.WT^{FLAG/HA} und dem Reporterplasmid pCL-MFG-LacZ im DNA-Verhältnis 1:1. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und filtriert (Ø 0,45 µm). Einen Tag zuvor wurden 0,4x10⁴ NIH 3T3-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit DMEM/10% FCS/5 µg/ml Ciprofloxacin kultiviert. Die filtrierten HuH-7 Überstände wurden zusammen mit 8 µg/ml Polybren (Sigma) auf die NIH 3T3-Zellen gegeben. Zwei Tage nach Infektion wurde

die MLV Infektiosität mit dem β -Gal Staining Kit (Life Technologies, nach Protokoll) durch die Zugabe von X-Gal auf β -Galactosidase Aktivität in NIH 3T3-Zellen analysiert.

2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Experimente wurde ein unabhängiger Zweistichproben t-test mit Microsoft Office Excel 2016 durchgeführt. Bei einem P -Wert von $*P < 0,05$ war eine Signifikanz und bei $**P < 0,01$ eine hohe Signifikanz gegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Rolle von ESCRT-Komplexen in der Morphogenese und Ausschleusung von MLV

Es ist bekannt, dass sich eine Vielzahl von Viren der zellulären endosomalen Sortieremaschinerie (ESCRT) bedient, um aus der Wirtszelle zu knospen. Die Viren rekrutieren dabei die ESCRT-Komplexe über Tetrapeptid-Motive ihrer sog. *late*-Domänen. Das MLV Gag-Polyprotein trägt drei *late*-Domänen PSAP, LYPAL und PPPY, welche unterschiedliche ESCRT-Proteine oder MVB-Adaptorproteine rekrutieren und binden können (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011).

Das MLV Gag-Polyprotein allein ist fähig Virus-ähnliche Partikel (VLPs) zu bilden und auszuschleusen, selbst in der Abwesenheit der MLV-Hüllproteine (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Komponenten der ESCRT-Maschinerie für die Ausschleusung von VLPs benötigt werden (Bartusch, 2014; Bartusch & Prange, 2016). Die Ergebnisse sind in Tab. 16 zusammengefasst. Die ESCRT-I-Untereinheit Tsg101 und die ESCRT-III-Untereinheiten CHMP2A und CHMP4B sind essentiell, da ihr Knockdown eine starke Reduktion an ausgeschleusten VLPs hervorrief (Bartusch, 2014; Bartusch & Prange, 2016). Das MVB-Adaptorprotein Alix ist ebenfalls an der VLP-Morphogenese beteiligt, während Nedd4-1 nicht unbedingt notwendig ist (Bartusch, 2014; Bartusch & Prange, 2016). In mehreren Studien wurde beschrieben, dass sich VLPs und Virionen hinsichtlich ihrer Anforderungen an zellulären Wirtsfaktoren unterscheiden. Bei der Morphogenese von HBV werden z.B. drei verschiedene Partikeltypen (Virionen, SVPs und nackte Kapside) gebildet, die alle unterschiedliche zelluläre Sekretionswege nutzen (Prange, 2012). Im Falle des Sendai-Virus (SeV) sind nur VLPs von Alix abhängig und Virionen nicht (Gosselin-Grenet *et al.*, 2007). Diese Hinweise führten zu der Überlegung, ob die Ansprüche von VLPs und Virionen bei MLV ebenfalls unterschiedlich sein könnten. Eine Gutachterempfehlung zu einem derzeit eingereichten Manuskript adressierte diesen Punkt ebenfalls, wodurch in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung der ESCRT-Komponenten bei der MLV-Morphogenese untersucht werden sollten.

Tab. 16 Beteiligung von MVB-Adaptorproteinen und ESCRT-Komponenten an der Ausschleusung von subviralen MLV-Partikeln (VLPs)

	Protein	Notwendigkeit für VLP-Morphogenese	Veränderung des VLP-Exports nach Knockdown um
MVB-Adaptorproteine	Alix	beteiligt	-44%
	Nedd4-1	wird nicht benötigt	-25%
ESCRT-I	Tsg101	essentiell	-90%
ESCRT-II	EAP30	wird nicht benötigt	-10%
	EAP45		-15%
ESCRT-III	CHMP1A/B	wird nicht benötigt	CHMP1A: -21% CHMP1B: +11%
	CHMP2A/B	CHMP2A ist essentiell	CHMP2A: -74% CHMP2B: 0%
	CHMP3	wird nicht benötigt	-29%
	CHMP4A/B	CHMP4B ist essentiell	CHMP4A: +26% CHMP4B: -89%
	CHMP5	wird nicht benötigt	+12%
	CHMP6	wird nicht benötigt	-5%

3.1.1 Herstellung des retroviralen Vektors MLV.WT^{FLAG/HA}

Der retrovirale pCL-Eco (ecotrop) Vektor enthält die Mo-MLV offenen Leserahmen (ORFs) für Gag/Polymerase (Pol) und Hülle (*Envelope*, Env) unter der Kontrolle des frühen CMV-Promotors. Da kein Antikörper gegen MLV zur Verfügung stand, sollte das Konstrukt mit einem FLAG-Epitop in Gag und einem HA-Epitop in Env durch Mutagenese markiert werden. Aufgrund der pCL-Eco Vektorgröße von über 12 kb

wurden die Mutagenesen in zwei Schritten in jeweils kleineren Vektoren durchgeführt. Zunächst sollte die Aminosäuresequenz GNGGEAT der p12-Domäne durch YKDDDDK substituiert werden, wie von Yueh & Goff (2003) beschrieben. Diese Mutagenese wurde in dem MLV.Gag^{YFP} Vektor durchgeführt und durch Umklonierung mit AflIII in den pCL-Eco Vektor eingefügt. Für die Insertion des HA-Tags wurde Env in einen 3xFLAG-CMV-14 Vektor über Clal umkloniert. Anschließend erfolgte die Insertion des HA-Tags (YPYDVPDYA) zwischen den Aminosäuren 294 und 295 von Env. Die Insertion befindet sich in einer Prolin-reichen Region, welche die N-terminale Rezeptor-bindende-Domäne und die C-terminale Transmembran-Domäne verbindet. Eine frühere Studie konnte bereits zeigen, dass die erwähnte Prolin-reiche Region Insertionen toleriert (Erlwein *et al.*, 2003). Die Rückklonierung des modifizierten Env wurde wieder über Clal durchgeführt. Der fertige pCL-Eco Vektor mit beiden Tags wurde in MLV.WT^{FLAG/HA} umbenannt (Abb. 8).

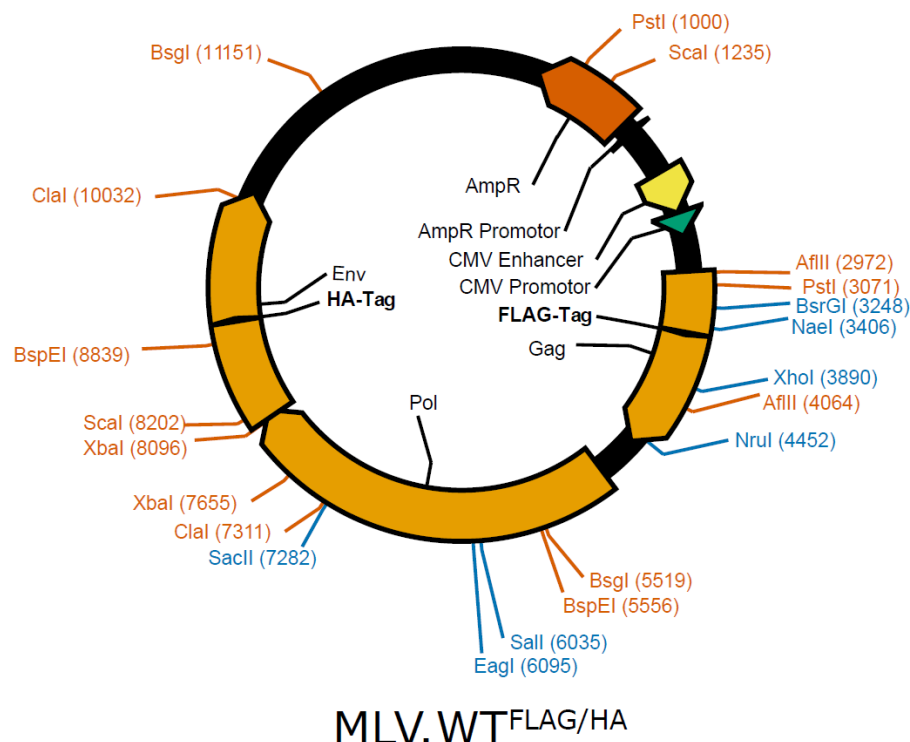


Abb. 8 Schematische Darstellung des MLV.WT^{FLAG/HA} Vektors

Dargestellt ist der Vektor MLV.WT^{FLAG/HA}, der für die Gene Gag, Polymerase (Pol) und Hülle (Env) kodiert (orange). Alle Gene stehen unter Kontrolle des CMV Enhancers/Promotors (gelb/grün). Der Vektor ist gegen Ampicillin resistent (dunkles orange). Zusätzlich sind Restriktionsenzyme dargestellt, die entweder einfach (blau) oder zweifach (orange) in der Vektorsequenz schneiden. Die Vektorkarte wurde mit dem Programm PlasmaDNA erstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere MLV-Konstrukte verwendet, die in Abb. 9 zusammengefasst sind. Der retrovirale Vektor pCL-Eco enthält das MLV-Genom mit den Gag-, Pol- und Env-ORFs. In MLV.Gag ist die Domänen-Organisation des Gag-Polypeptids beschrieben. Das Gag-Polypeptid enthält die Matrix (MA)-, p12-, Kapsid (CA)- und Nukleokapsid (NC)-Domäne. Außerdem kodiert das Protein für die drei *late*-Domänen PSAP, LYPAL und PPPY. MLV.WT^{FLAG/HA} zeigt das modifizierte MLV-Genom mit einem FLAG-Tag in der p12-Domäne und einem HA-Epitop im Env-ORF.

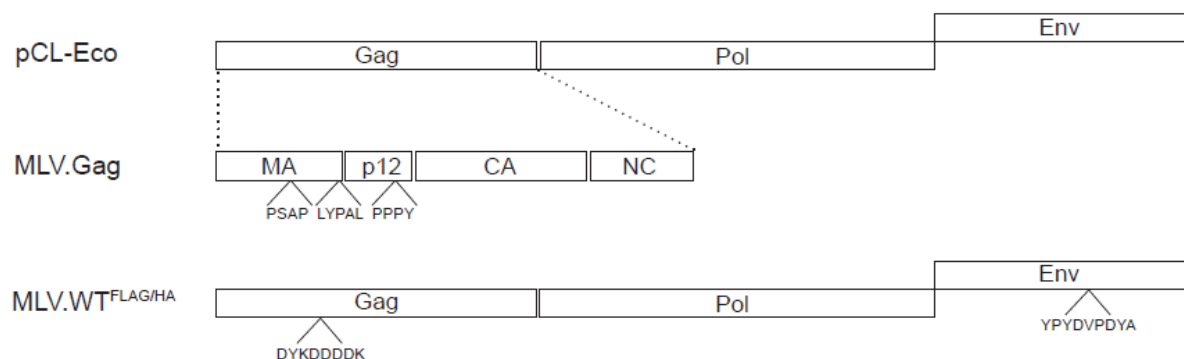


Abb. 9 Schematische Darstellung der MLV-Konstrukte

Der retrovirale Vektor **pCL-Eco** kodiert für die Gag, Polymerase (Pol) und Hülle (Env) von MLV. **MLV.Gag** enthält dagegen nur das Gag-Polypeptid, welches sich aus der Domänen-Struktur Matrix (MA), p12, Kapsid (CA) und Nukleokapsid (NC) zusammensetzt. Weiterhin sind die *late*-Domänen PSAP und LYPAL in MA und PPPY in p12 angezeigt. Das **MLV.WT^{FLAG/HA}** Konstrukt besteht aus dem vollständigen MLV Genom (pCL-Eco) mit zwei zusätzlichen Tags, dem FLAG-Epitop in Gag und dem HA-Epitop (YPYDVPDYA) in Env. Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

3.1.2 Die Rolle von MVB-Adaptoren und ESCRT-I bei der Reifung und Ausschleusung von MLV

Zunächst wurde die Notwendigkeit von ESCRT-I und MVB-Adaptorproteinen für die Synthese und Ausschleusung von MLV Virionen untersucht. Zu diesem Zweck wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA, einer siRNA gegen Tsg101 oder Alix, oder einem siRNA Pool gegen Ned4-1 behandelt. Nach 48 h erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem MLV.WT^{FLAG/HA} Konstrukt. Dieses Konstrukt ist zweifach getaggt, wobei sich das FLAG-Epitop im Gag/Pol-ORF und das HA-Epitop im Env-ORF befindet. Die Zellen und Überstände wurden nach 24 h transients Transfektion aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen in 1x Laemmli-Probenpuffer lysiert. Nach dem Pelletieren der Überstände wurden diese ebenfalls in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die

Synthese und Ausschleusung von MLV.WT^{FLAG/HA} wurde mit Antikörpern gegen FLAG und HA im Western Blot (WB) analysiert. Um die Virionen im Überstand zu quantifizieren wurden die Gag- und Env-spezifischen Signale densitometrisch ausgewertet und addiert. Die Depletionskontrollen zeigten im WB einen effizienten Knockdown aller verwendeten siRNAs (Abb. 10A).

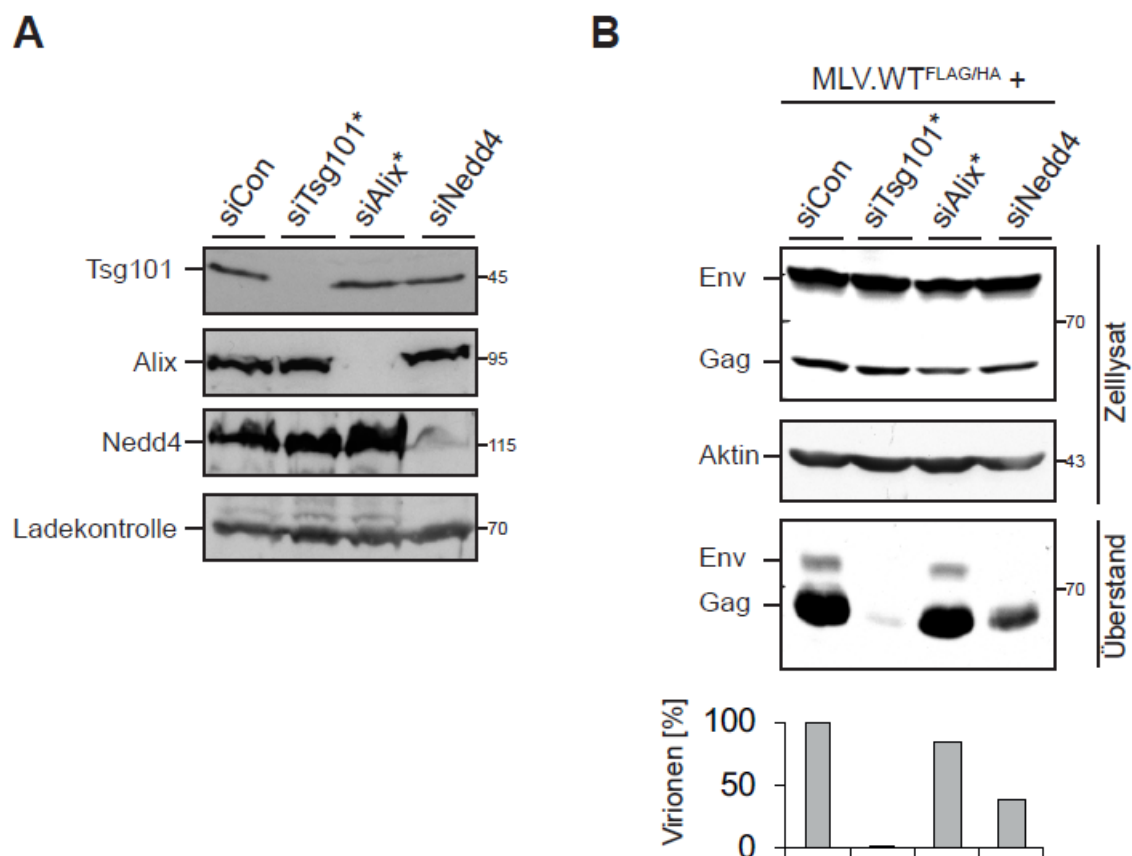


Abb. 10 Die Rolle von ESCRT-I, Alix und Nedd4-1 bei der Reifung und Ausschleusung von MLV

(A, B) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon), einzelner siRNAs gegen Tsg101 oder Alix, oder einem siRNA Pool gegen Nedd4-1 behandelt. 48 h später wurden die Zellen mit MLV.WT^{FLAG/HA} re-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen in 1x Laemmli-Probenpuffer lysiert. Die Überstände wurden zunächst ultrazentrifugiert und dann ebenfalls in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. (A) Die Effizienzüberprüfung der Depletionen wurde mit Tsg101-, Alix- und Nedd4-1-spezifischem Antikörper im WB evaluiert. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande eines Antikörpers. (B) Die Synthese (Zelllysate) und Ausschleusung (Überstand) von MLV.WT^{FLAG/HA} wurde mit Antikörpern gegen FLAG und HA im WB untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Um die Virionen im Überstand zu quantifizieren, wurden die Gag- und Env-spezifischen Signale densitometrisch analysiert und addiert. Die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle gezeigt. (*: *single* siRNA). Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

Eine Analyse der Zelllysate mit FLAG- und HA-spezifischen Antikörpern ergab, dass die Synthese der Gag- und Env-Proteine in depletierten Zellen nicht beeinträchtigt ist (Abb. 10B). Die Inaktivierung von Tsg101 wiederum führte zu einem ähnlichen Phänotyp wie bei MLV.Gag^{YFP}, da auch hier die Mengen an Virionen-assoziierten Gag-

und Env-Proteinen drastisch reduziert wurden (Abb. 10B). Der Knockdown von Nedd4-1 führte zu einem ähnlich starken inhibitorischen Effekt, während es in Alix-depletierten Zellen nur zu einer mäßigen Verminderung an ausgeschleusten Virionen kam (Abb. 10B). Interessanterweise waren die Effekte der Nedd4-1- und Alix-Depletion bei der Virionen-Ausschleusung genau umgekehrt zu denen beim VLP-Export (siehe Kapitel 3.1). Dies deutete ebenfalls darauf hin, dass die notwendigen zellulären Wirtsfaktoren tatsächlich zwischen VLPs und Virionen variieren.

3.1.3 Die Rolle von ESCRT-II bei der Reifung und Ausschleusung von MLV

Nächstfolgend wurde die Notwendigkeit des ESCRT-II-Komplexes in der Ausschleusung viraler MLV-Partikel beleuchtet. ESCRT-II besteht aus einem Heterotetramer-Komplex mit jeweils einer Untereinheit EAP30 und EAP45, sowie zwei Untereinheiten EAP20. Im Kontext mit HBV wurde beschrieben, dass die Inaktivierung einer Untereinheit durch RNAi zur Ko-Depletion der anderen Untereinheiten führt, was auf einen Zerfall des ganzen Komplexes hindeutet (Stieler & Prange, 2014). Dieses Phänomen sollte im Fall der MLV-Morphogenese ebenfalls geprüft werden. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit einer Kontroll siRNA oder einer siRNA gegen EAP30 oder EAP45 depletiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben (3.1.2) aufgearbeitet. Die WB-Analyse mit Antikörpern gegen EAP20, EAP30 und EAP45 zeigte, dass die Knockdowns von EAP30 und EAP45 erfolgreich waren, und gleichzeitig die Ko-Depletion der anderen Untereinheiten zur Folge hatten (Abb. 11A). Es ist also ausreichend, einen einzigen Komplexpartner zu depletieren. Zur Untersuchung der Synthese und dem Export von MLV.WT^{FLAG/HA} wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA oder einem siRNA Pool gegen EAP20 depletiert, um dann mit MLV.WT^{FLAG/HA} retransfiziert zu werden. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem Standardprotokoll (3.1.2). Die Untersuchung der Zelllysate und Überstände mit FLAG- und HA-spezifischen Antikörpern im WB ergab keine Änderung in der Synthese und Ausschleusung von MLV.WT^{FLAG/HA} im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 11B). Somit ist der ESCRT-II-Komplex für die MLV-Morphogenese entbehrlich. Dies deckt sich mit Ergebnissen einer früheren Arbeit, in der gezeigt wurde, dass ESCRT-II keine Rolle bei der Bildung und Ausschleusung von MLV.Gag^{YFP} hat (Bartusch, 2014).

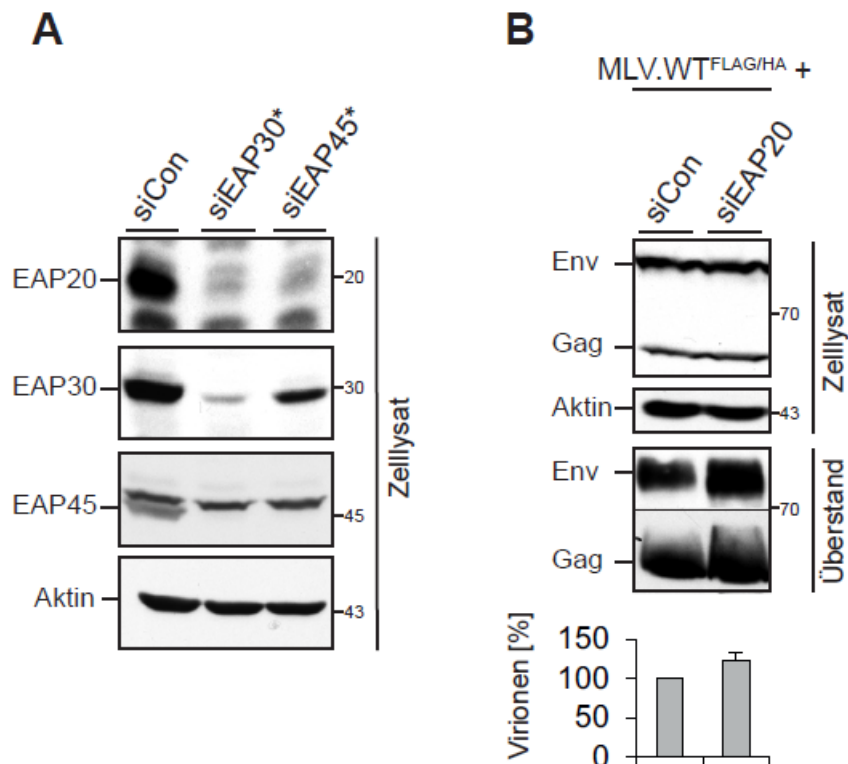


Abb. 11 Die Rolle von ESCRT-II bei der Reifung und Ausschleusung von MLV

(A,B) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA, einzelner siRNAs gegen EAP30 oder EAP45, oder einem siRNA Pool gegen EAP20 depletiert und mit MLV.WT^{FLAG/HA} re-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte nach oben beschriebenen Standardprotokoll (Abb. 10). (A) Um die Depletionseffizienz der siRNAs zu bestimmen, wurden die Zellysate im WB mit Antikörpern gegen EAP20, EAP30 und EAP45 behandelt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. (B) Die WB-Analyse der Zellysate und Überstände erfolgte mit FLAG-, HA und β -Aktin-spezifischen Antikörpern. Die Ergebnisse der Virionen-Quantifizierung sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$). (*: *single* siRNA). Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

3.1.4 Die Rolle von ESCRT-III bei der Reifung und Ausschleusung von MLV

Folgend sollte untersucht werden, welche Komponenten des ESCRT-III-Komplexes eine Rolle bei der MLV-Morphogenese spielen. Der ESCRT-III-Komplex besteht aus den vier „Kern“-Untereinheiten CHMP6, CHMP4 (A, B, C), CHMP3 und CHMP2 (A, B) und mehreren assoziierten Proteinen (CHMP1 (A, B), CHMP5, CHMP7 und IST1). Es sollte ein systematischer RNAi-Screen mit ESCRT-III-Komponenten durchgeführt werden. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit einer Kontroll siRNA, siRNA Pools gegen CHMP1A, CHMP1B, CHMP2B, CHMP3, CHMP4A, CHMP4B oder CHMP6, oder einzelnen siRNAs gegen CHMP2A, CHMP4B oder CHMP5 depletiert. Nach Re-Transfektion mit MLV.WT^{FLAG/HA} wurden Zellen und Überstände wie oben beschrieben (3.1.2) aufgearbeitet. Zur Überprüfung der Depletionseffizienz standen keine

funktionierenden Antikörper zur Verfügung. Daher wurden die Zellen mit TRIzol aufgeschlossen und die RNA isoliert. Nach der Umschreibung in cDNA erfolgte die Quantifizierung mittels qPCR unter der Verwendung spezifischer CHMP-Primer. Abb. 12 zeigt, dass alle siRNAs ihr Zielprotein erfolgreich depletierten.

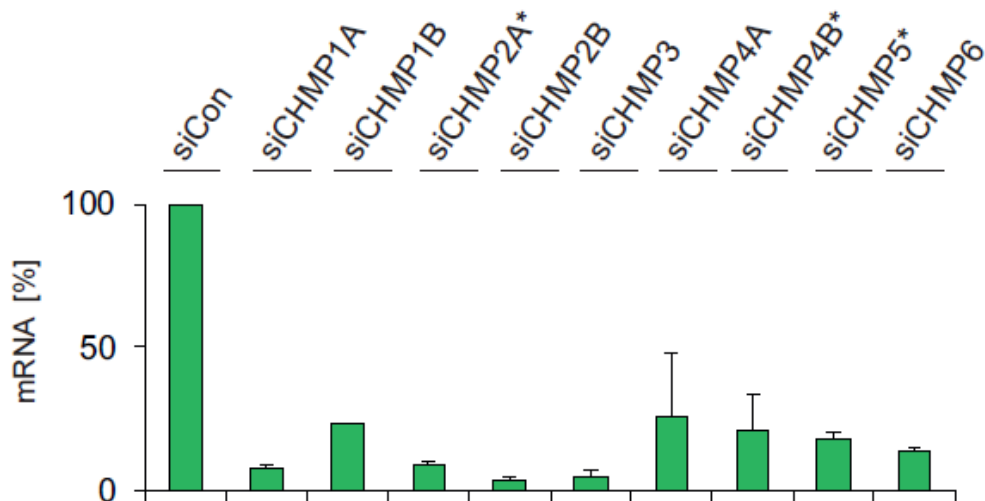


Abb. 12 Überprüfung der Spezifität der CHMP siRNAs

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder siRNAs gegen ESCRT-III-Komponenten depletiert. Nach 48 h erfolgte eine *mock* Re-Transfektion. Einen Tag später folgten der Aufschluss der Zellen mit TRIzol, die Isolierung der RNA, die Umschreibung in cDNA und die quantitative Analyse mittels SYBR Green-basierter qPCR. Als Referenz diente das Haushaltsgen β -Aktin. Die Menge an CHMP-Transkripten wurde durch die $\Delta\Delta$ Ct-Wert Methode ermittelt und die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$), die in Duplikaten gemessen wurden. Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

Die WB-Analysen mit FLAG- und HA-spezifischen Antikörpern zeigten keine Änderung in der Expression von MLV.WT^{FLAG/HA} in CHMP2B-, CHMP3-, CHMP4A-, CHMP4B-, CHMP5- und CHMP6-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 13). Dagegen führte die Inaktivierung von CHMP1A zu einer erheblichen Verringerung der intrazellulären Menge des Gag-Proteins, während die Depletion von CHMP1B und CHMP2A eine gemäßigte Reduktion der intrazellulären Menge des Env-Proteins zeigten (Abb. 13). Die Expression der ORFs von Gag/Pol und Env stehen beide unter der Kontrolle des frühen CMV-Promotors im MLV.WT^{FLAG/HA} Konstrukt. Aus diesem Grund waren die Schwankungen in der Gag- und Env-Proteinmenge innerhalb einer Probe mehr der Proteinstabilität als der Proteinsynthese zuzuschreiben. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von MLV.Gag^{YFP} (Bartusch, 2014) zeigte die Untersuchung der Überstände, dass CHMP2A und CHMP4B zur Ausschleusung von

MLV-Virionen benötigt werden (Abb. 13). In beiden Fällen konnten die Isoformen CHMP2B und CHMP4A das Fehlen von CHMP2A und CHMP4B funktionell nicht substituieren.

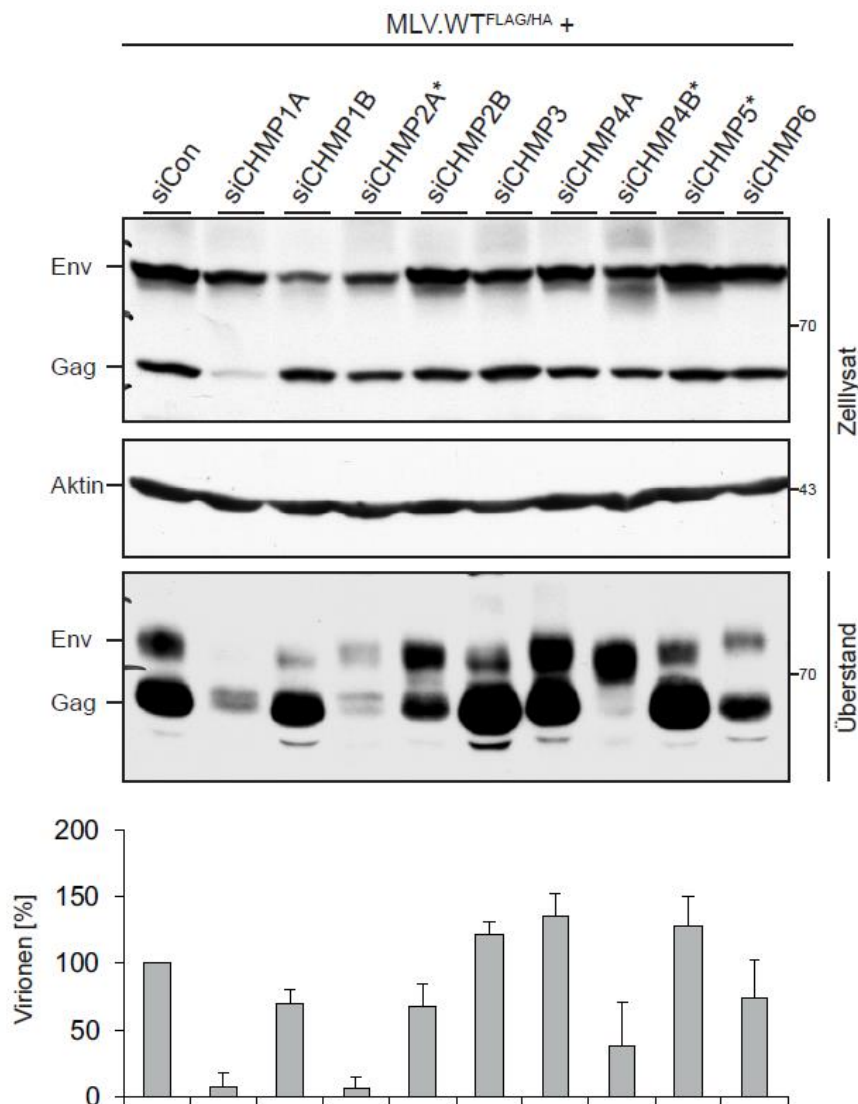


Abb. 13 Die Rolle von ESCRT-III bei der Reifung und Ausschleusung von MLV

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder siRNAs gegen ESCRT-III-Komponenten transfiziert und mit MLV.WT^{FLAG/HA} re-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände wurde wie oben beschrieben durchgeführt (Abb. 10). Die Synthese und Ausschleusung von MLV.WT^{FLAG/HA} wurde mit FLAG-, HA- und β -Aktin-spezifischen Antikörpern im WB untersucht. Die Ergebnisse der Virionen-Quantifizierung sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$). (*: *single* siRNA). Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

Der Vergleich der Gag- und Env-Proteinmengen zeigte überraschend, dass beim Knockdown von CHMP4B mehr Env-Protein und weniger Gag-Protein im Vergleich zu den Kontrollzellen enthalten war (Abb. 13). Möglicherweise werden nach dem Ausfall

von CHMP4B weniger Gag-Polyproteine in die Virionen sortiert. Den auffälligsten Phänotyp zeigte die Depletion von CHMP1A, die zu einer fast gänzlichen Blockierung des Virionen-Exports führte (Abb. 13). Die Isoform CHMP1B konnte den Verlust von CHMP1A nicht kompensieren. Das Phänomen der ausbleibenden Kompensation durch eine andere Isoform war bereits bei CHMP2A/B und CHMP4A/B zu beobachten (siehe oben).

Um auszuschließen, dass die verwendeten siRNAs gegen CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B ihre Isoformen ko-depletieren, wurde isolierte mRNA der relevanten Proben auf die Menge an Transkripten der Isoform per qPCR getestet. Die Ergebnisse in Abb. 14 bestätigten die Isoform-Spezifität der verwendeten siRNAs. Damit entspricht dies nicht dem Phänomen der Ko-Depletion, wie im Falle von ESCRT-II.

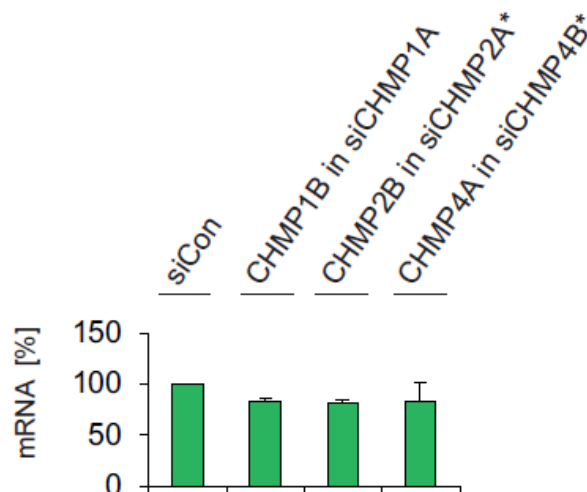


Abb. 14 Überprüfung der Isoform-Spezifität der CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B siRNAs

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon), einem siRNA Pool gegen CHMP1A oder einzelner siRNAs gegen CHMP2A oder CHMP4B depletiert und *mock* re-transfiziert. Die Isolierung der RNA und die quantitative Analyse erfolgten nach dem oben beschriebenen Protokoll (Abb. 12). Die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$), die in Duplikaten gemessen wurden.

3.1.5 Die Rolle von ESCRT-III bei der Prozessierung des Gag-Polyproteins von MLV

Um die kritischen Rollen von CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B in der MLV-Morphogenese weiterführend zu klären, wurde deren Effekt auf die Gag-Polyprotein Prozessierung näher untersucht. Dazu wurden Zelllysate und Überstände von Zellen,

die mit siRNAs und MLV.WT^{FLAG/HA} transfiziert worden waren, einzig mit dem FLAG-spezifischen Antikörper im WB untersucht. In Kontrollzellen (Abb. 15B, oben) ließen sich drei Produkte beobachten: das Gag-Vorläuferprotein bei 65 kDa und zwei Gag-Spaltprodukte bei 55 und 25 kDa. Bei der Reifung der Viruspartikel wird das Gag-Vorläuferprotein durch die virale Protease prozessiert und in die MA-, p12-, CA- und NC-Proteine gespalten (Abb. 15A). Da das MLV.WT^{FLAG/HA}-Konstrukt in der p12-Domäne das FLAG-Tag trägt, könnte die 55 kDa Spezies MA-p12-CA oder p12-CA-NC Spaltprodukte darstellen, während die 25 kDa Spezies möglicherweise ein MA-p12 Zwischenprodukt repräsentiert. In CHMP1B-, CHMP2B-, CHMP3-, CHMP4A- und CHMP5-depletierten Zellen entsprach das Prozessierungsmuster dem der Kontrollzellen (Abb. 15B, oben). Hingegen führten Depletionen von CHMP2A und CHMP4B, die für die MLV Morphogenese essentiell sind, sowie von CHMP6 zu einer deutlichen Verringerung der Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins (Abb. 15B, oben). Im Falle der CHMP1A-Inaktivierung konnten kaum noch Spaltprodukte des Gag-Vorläuferproteins im WB detektiert werden (Abb. 15B, oben). Die Analyse der Überstände lieferte entsprechende Ergebnisse, da die Mengen des 25 kDa Spaltprodukts in CHMP1A-, CHMP2A- und CHMP4B-depletierten Zellen signifikant erniedrigt waren (Abb. 15B, unten). Erwähnenswert ist hier, dass keine Spaltprodukte mehr in den CHMP1A-depletierten Zellen festgestellt werden konnten, obwohl die Menge an sezerniertem Gag-Vorläuferprotein in CHMP1A-depletieren Zellen im Vergleich zu CHMP4B-depletierten Zellen größer war (Abb. 15B, unten). Folglich könnte CHMP1A neben seiner ESCRT-III-spezifischen Funktion noch weitere Aufgaben während der MLV-Morphogenese ausüben.

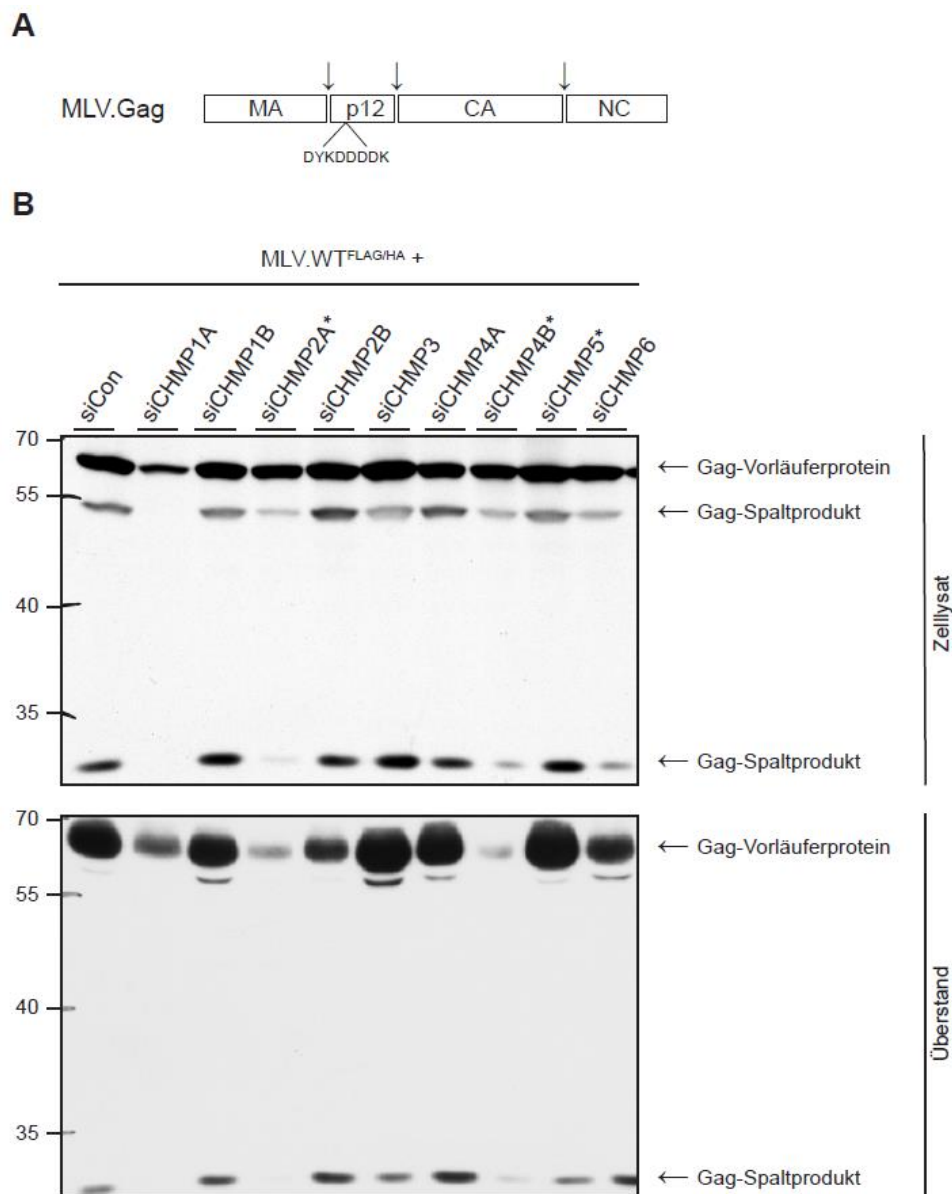


Abb. 15 Die Rollen von ESCRT-III-Untereinheiten während der MLV Gag-Polyprotein Prozessierung

(A) Schematische Darstellung des MLV Gag-Polyproteins und mögliche Spaltstellen der viralen Protease (Pfeile). (B) HuH-7 Zellen wurden – wie in Abb. 13 beschrieben – mit den ESCRT-III-spezifischen siRNAs behandelt und mit dem MLV.WT^{FLAG/HA} re-transfiziert. Zelllysate (**oben**) und Überstände (**unten**) wurden mit einer FLAG-spezifischen WB-Analyse untersucht. Die Pfeile (rechts) zeigen das Gag-Vorläuferprotein und Gag-spezifische Spaltprodukte an und die Zahlen (links) verweisen auf Molekulargewichtstandards in kDa. Der Versuch wurde wiederholt durchgeführt und ein Ergebnis ist repräsentativ dargestellt ($n = 2$). Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

3.1.6 Die besondere Rolle der ESCRT-III-Untereinheit CHMP1A bei der Reifung und Ausschleusung von MLV

Bei der Morphogenese von Virionen ist CHMP1A essentiell, während die VLP-Morphogenese von CHMP1A unabhängig ist (Bartusch, 2014). Der Ausfall von

CHMP1A konnte nicht von der Isoform CHMP1B kompensiert werden, was die Bedeutung von CHMP1A unterstreicht. Die Untersuchung der Prozessierung des Gag-Polyproteins in CHMP1A-depletierten Zellen hat gezeigt, dass keine Spaltung mehr stattfinden konnte. Es scheint, dass CHMP1A in dem Reifungsprozess des Gag-Polyproteins involviert ist und auch andere Funktionen abseits der konventionellen ESCRT-Maschinerie wahrnehmen kann.

Es sollte zunächst untersucht werden, ob dieser Effekt von CHMP1A Zelltyp-spezifisch ist. Im Falle von HIV-1 kann die Beteiligung zellulärer Wirtsfaktoren abhängig vom Zelltyp variieren (Langelier *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2015). Ob dies auch auf MLV zutreffen könnte, sollte in HEK 293T Zellen überprüft werden. Dazu wurden die Zellen mit Kontroll siRNA oder siRNA Pools gegen CHMP1A oder CHMP1B depletiert und mit MLV.WT^{FLAG/HA} re-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände wurde nach dem Standardprotokoll ausgeführt (3.1.2). Die Menge an intra- und extrazellulären Env- und Gag-Proteinen wurde mit HA- und FLAG-spezifischen Antikörpern im WB bestimmt. Der Knockdown von CHMP1A, aber nicht von CHMP1B, führte zu einer starken Reduktion im MLV-Export und bestätigte den Phänotyp der HuH-7 Zellen (Abb. 16A). Es ist bekannt, dass die Reifung der MLV-Virionen eine Voraussetzung ihrer Infektiosität darstellt (Houzet *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Rein, 2011). Demnach ist die Menge an ausgeschleusten MLV-Virionen kein Maßstab für die Infektiosität, da sich sowohl reife als auch unreife MLV-Virionen im Überstand befinden können. Es sollte daher untersucht werden, inwieweit die Inhibierung der Prozessierung durch CHMP1A die Infektiosität von MLV-Virionen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA oder siRNA Pools gegen CHMP1A oder CHMP1B für 48 h behandelt. Dann erfolgte die Ko-Transfektion von MLV.WT^{FLAG/HA} mit dem Reporterplasmid pCL-MFG-LacZ für weitere 24 h. Der Überstand wurde abgenommen und zusammen mit Polybren auf die murinen Zielzellen NIH 3T3 gegeben. Nach zwei Tagen wurden die Zellen gefärbt und auf β -Galactosidaseaktivität untersucht. Bei NIH 3T3 Zellen, welche mit Überstand von CHMP1A-depletierten Zellen behandelt worden waren, waren wenig angefärbte Zellen zu beobachten (Abb. 16B). Diese schwache Infektion der NIH 3T3 Zellen war auf die geringe Virionenmenge im Überstand der HuH-7 Zellen zurückzuführen. Im Vergleich dazu reduzierte die Inaktivierung von CHMP1B nicht die Infektiosität von

MLV.WT^{FLAG/HA} (Abb. 16B).

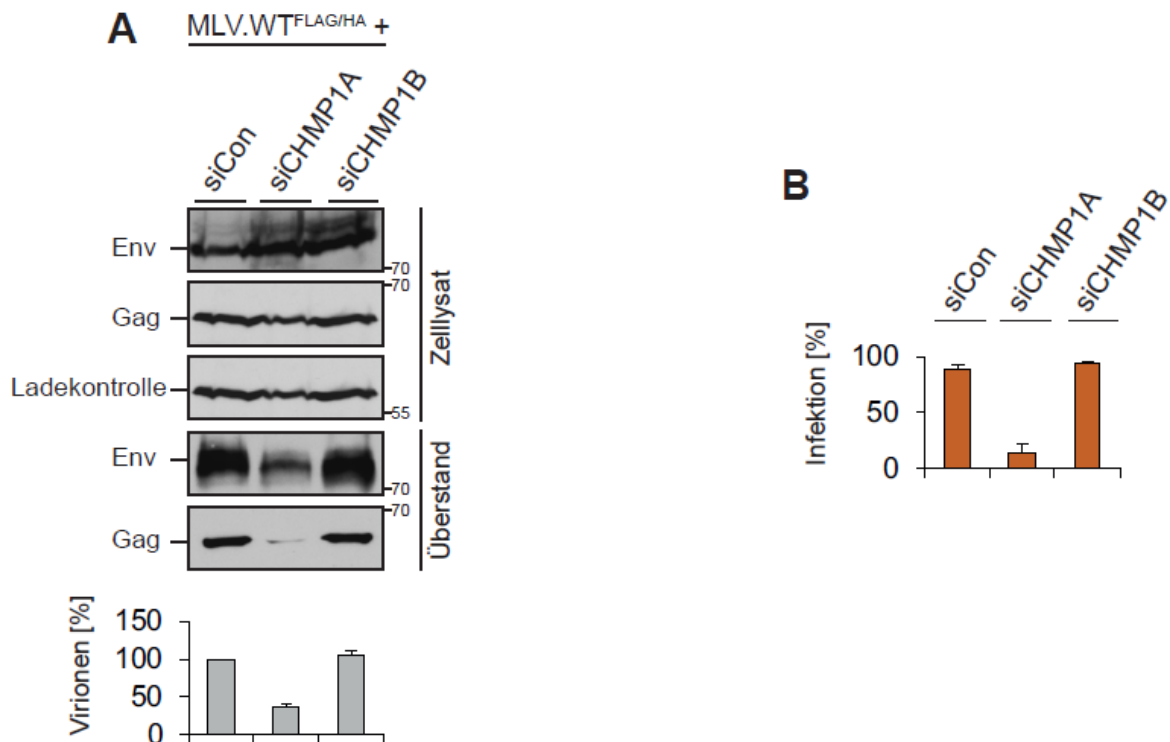


Abb. 16 Die ESCRT-III-Untereinheit CHMP1A, jedoch nicht CHMP1B, hemmt die Ausschleusung von MLV

(A) HEK 293T Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder siRNA Pools gegen CHMP1A oder CHMP1B depletiert und mit MLV.WT^{FLAG/HA} re-transfiziert. Die Zellen und Überstände wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet (Abb. 10). Die Menge an intra- und extrazellulären Env- und Gag-Proteinen wurde mittels WB-Analyse bestimmt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Die Ergebnisse der Virionen-Quantifizierung sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$). (B) HuH-7 Zellen behandelt mit Kontroll siRNA (siCon), siCHMP1A oder siCHMP1B wurden nach 48 h mit MLV.WT^{FLAG/HA} und dem Reporterplasmid pCL-MFG-LacZ ko-transfiziert. Nach 24 h wurde der infektiöse Überstand mit den Virionen abgenommen und auf murine NIH 3T3 Zellen gegeben. Die Zellen wurden zur Bestimmung der Infektiosität nach zwei Tagen auf β -Galaktosidase Aktivität gefärbt und quantifiziert. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$). Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

Abschließend sollte die intrazelluläre Verteilung von Gag beleuchtet werden, wenn die Ausschleusung von MLV-Virionen durch den Knockdown von CHMP1A blockiert ist. Zum Vergleich wurde CHMP4B ebenfalls hinsichtlich der Gag-Verteilung untersucht, da der Knockdown sowohl auf beide MLV-Partikeltypen, Virionen und VLPs, Einfluss hatte. Dazu wurden HuH-7 Zellen auf Deckgläschen mit Kontroll siRNA und siRNA Pools gegen CHMP1A oder CHMP4B depletiert, gefolgt von der Re-Transfektion mit MLV.WT^{FLAG/HA}. Vor der Fixierung und Permeabilisierung mit 100% Methanol/2 mM EGTA wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt, um die Proteinsynthese zu synchronisieren. Die Färbung der Zellen erfolgte mit FLAG-spezifischem Antikörper, der gegen das FLAG-Epitop in Gag gerichtet ist. In Kontrollzellen war eine punktuelle

Verteilung von Gag im gesamten Zytoplasma zu beobachten (Abb. 17). Das Gag-Verteilungsmuster in CHMP1A-depletierten Zellen glich dem der Kontrollzellen (Abb. 17). Beim Knockdown von CHMP4B dagegen akkumulierte Gag mehr in der Zellperipherie, was auf eine membranöse Verteilung hindeutete (Abb. 17). Die Virionen scheinen am Knospungsort angekommen zu sein, werden allerdings nicht mehr abgeschnürt. Im Falle der Inaktivierung von CHMP1A war keine periphere Gag-Akkumulation zu beobachten, weil möglicherweise kein korrekter Transport zur Plasmamembran mehr stattfinden kann.

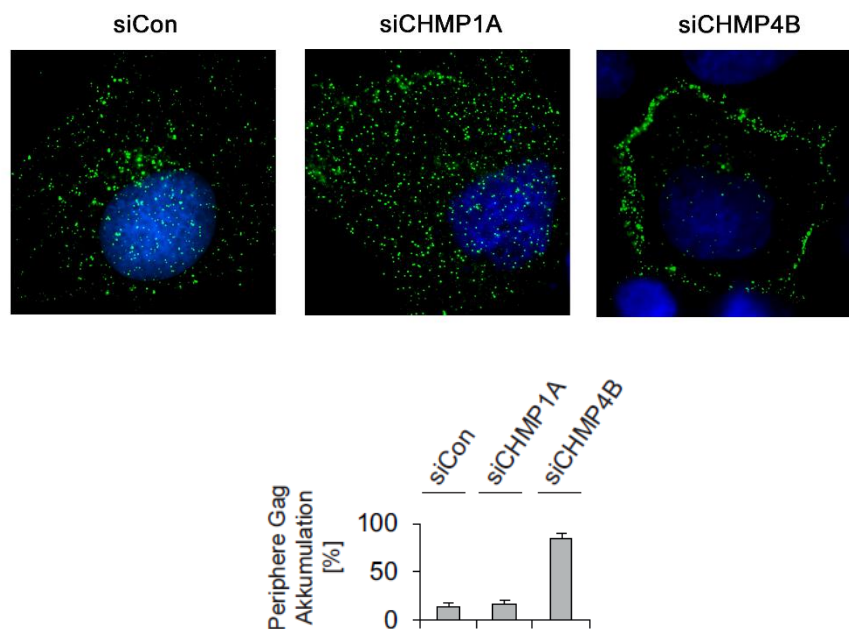


Abb. 17 Die ESCRT-III-Untereinheit CHMP1A beeinträchtigt den intrazellulären Transport von MLV

HuH-7 Zellen auf Deckgläschen wurden mit Kontroll siRNA (siCon), siCHMP1A oder siCHMP4B behandelt und nach 48 h mit MLV.WT^{FLAG/HA} re-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen zunächst mit Cycloheximid zur Hemmung der Proteinsynthese und somit zur Proteinsynchronisation behandelt und dann mit 100% Methanol/2 mM EGTA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit FLAG-Antikörper, welcher gegen den FLAG-Tag in MLV.Gag gerichtet ist, inkubiert und mit einem Alexa-Fluor 488-konjugiertem Antikörper Fluoreszenz markiert. MLV.Gag ist in grün und der Zellkern ist in blau gezeigt. Das Verteilungsmuster von MLV.Gag wurde in etwa 50 verschiedenen Zellen untersucht. Die Quantifizierung zweier unabhängiger Experimente ist in dem Graph zusammengestellt ($n = 2$). Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

3.1.7 Zusammenfassung zur Rolle von ESCRT-Komplexen in der Reifung und Ausschleusung von MLV

Für die Reifung und Ausschleusung von subviralen und viralen MLV-Partikeln werden gezielt ESCRT-Komponenten manipuliert. Die funktionelle Analyse der MLV-Morphogenese ergab, dass die ESCRT-I-Untereinheit Tsg101 und die ESCRT-III-Untereinheiten CHMP2A und CHMP4B essentiell sind, wie auch bereits für die VLP-Morphogenese gezeigt (Bartusch, 2014). Die MVB-Adaptorproteine Alix und Nedd4-1 werden ebenfalls in beiden Partikeltypen benötigt, allerdings spielt Nedd4-1 eine entscheidendere Rolle bei MLV, was bei VLPs genau umgekehrt ist. Im Unterschied zu VLPs, ist die Funktionalität der ESCRT-III-Untereinheit CHMP1A unbedingt notwendig. Der Knockdown von CHMP1A führte zu einer stark reduzierten Ausschleusung von Virionen. Zusätzlich beeinflusste der Ausfall von CHMP1A die Prozessierung des Gag-Polyproteins negativ, wodurch sich auch die Infektiosität minderte. CHMP1A spielt offenbar eine entscheidende Rolle in der Reifung und Ausschleusung von MLV.

3.2 Untersuchungen zur Rolle von Rab GTPasen in der Morphogenese und Ausschleusung von HBV

Viele Schritte in der Morphogenese und Ausschleusung von HBV sind bis *dato* noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige Studien konnten die Bedeutung der ESCRT-Maschinerie für die Ausschleusung von HBV zeigen (Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Stieler & Prange, 2014; Chou *et al.*, 2015). Eine zentrale Fragestellung betrifft aber immer noch den genauen Knospungsort. Des Weiteren ist nicht geklärt, wie die einzelnen viralen Komponenten zwischen den Orten der Synthese, Knospung und Ausschleusung transportiert werden. Als mögliche zelluläre Wirtsfaktoren, die im Transport involviert sein könnten, rückten die Rab GTPasen in den Fokus. Diese Proteine regulieren den Membrantransport, indem sie für Vesikelknospung, -transport und -fusion verantwortlich sind. Um Hinweise zu erlangen, ob und welche Rab-Proteine bei der Morphogenese und Ausschleusung von HBV beteiligt sind, wurde ein *Screen* mit einer siRNA-Bibliothek gegen Rab-Proteine in stabilen HBV-replizierenden HuH-7 Zellen von Herrn Dr. Jens T. Stieler durchgeführt. Dabei fielen einige Rab-Proteine auf, die einen antiviralen oder proviralen Effekt auf die HBV-Morphogenese und Ausschleusung hatten. Für weiterführende Experimente stellte sich die Kultivierung der stabil HBV-replizierenden HuH-7 Zellen allerdings als nicht ideal heraus, was sich in einem verlangsamten Zellwachstum und einer schlechten Transfizierbarkeit äußerte. Infolgedessen wurden Experimente in dieser Arbeit, soweit nicht anders erwähnt, mit transient HBV-produzierenden HuH-7 Zellen durchgeführt. Durch Transfektion eines HBV-Replikon können die Schritte nach Infektion im viralen Lebenszyklus von HBV untersucht werden. Das HBV-Replikon enthält ein 1.1-faches HBV-Genom des Subtyps *ayw* (Genotyp D) und einen humanen Metallothionein (hMT)-IIA-Promotor, welcher dem viralen Core/Pol Promotor vorangeschaltet ist. Der ORF der Hüllproteine steht unter der transkriptionellen Kontrolle der viralen Promotoren. Das HBV-Genom ist 1.1-fach enthalten, da die Transkripte sonst nicht polyadenyliert werden würden, wie in Abb. 18 verdeutlicht. Erwähnenswert ist, dass die Zelllinie HuH-7 den HBV-spezifischen NTCP-Rezeptor nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Eine Re-Infektion der Zellen mit neugebildeten Virionen ist daher nicht möglich und erlaubt ausschliesslich exozytotische Ereignisse zu beleuchten. Im

Vordergrund standen Untersuchungen zur Rolle von proviral wirkenden Rab-Proteinen.

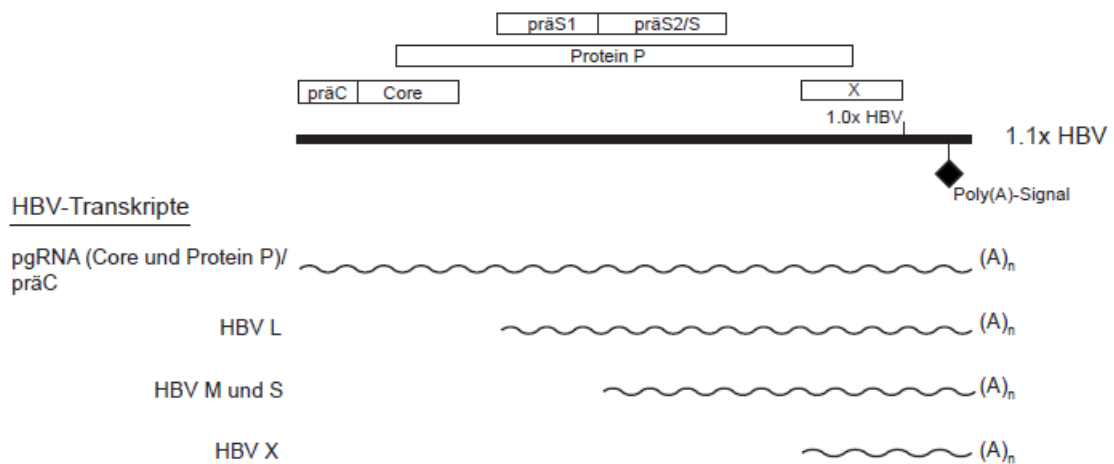


Abb. 18 Struktur des 1.1-fachen HBV-Genoms

Schematische Darstellung des 1.1-fachen HBV-Genoms mit terminalem Poly(A)-Signal (1.1x HBV). Die Boxen zeigen die HBV-ORFs. Zusätzlich sind die HBV-Transkripte angezeigt. Auch ist die Stelle markiert, an der das 1.0x HBV-Genom endet. Verändert nach: Nassal, 1992.

3.2.1 Rollen der Rab GTPasen Rab1A, Rab18 und Rab34 bei der Reifung und Ausschleusung von HBV: RNA-Interferenz- und Überexpressionsstudien

Zunächst sollten die Rollen der Rab-Proteine Rab1A, Rab18 und Rab34 in der HBV-Morphogenese untersucht werden. Die physiologische Funktion von Rab1A besteht in der Regulation des anterograden Proteintransports vom ER zum Golgi-Komplex (Haas *et al.*, 2007). Weitere Studien zeigten außerdem, dass Rab1A in der Bildung und Elongation von Phagophoren involviert ist (Zoppino *et al.*, 2010). Die Rab GTPase Rab18 ist an der Bildung von Lipidtropfen beteiligt (Ozeki *et al.*, 2005). Zudem gilt Rab18 als positiver Modulator der Makroautophagie (Feldmann *et al.*, 2017). Bei Rab34 ist bekannt, dass das Protein den Transport innerhalb des Golgi-Komplexes kontrolliert und zudem eine Rolle im multivesikulären Körper (MVB)-Signalweg spielt (Goldenberg *et al.*, 2007).

Um Einblick in die Wirkweise dieser Rab-Proteine in der HBV-Morphogenese und Ausschleusung zu erhalten, wurden HuH-7 Zellen zunächst mit Kontroll siRNA oder einem siRNA Pool gegen Rab1A, Rab18 oder Rab34 für 48 h depletiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem HBV-Replikon re-transfiziert. Nach drei Tagen erfolgte die

Aufarbeitung der Zellen mit 0,2% Triton-Lysepuffer. Zur Quantifizierung der Synthese (Zelllysate) und Ausschleusung (Überstand) von HBV-Partikeln wurde zunächst eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei wurden intrazelluläre Nukleokapside mit Kapsid-spezifischen und extrazelluläre Virionen mit Hüllprotein-spezifischen Antikörpern gefällt. Da intrazelluläre Nukleokapside sehr schnell umhüllt und ausgeschleust werden, ist es aufgrund der Kinetik nicht möglich intrazelluläre Virionen zu fällen. Anschließend erfolgte die Isolation viraler DNA und die Bestimmung der Menge an Nukleokapsiden und Virionen mittels Multiplex-qPCR. Abb. 19 fasst die Ergebnisse zusammen und zeigt, dass die Inaktivierung von Rab1A und Rab18 zu einem ähnlichen Phänotyp führten. Dabei waren sowohl die intrazellulären Nukleokapside als auch die extrazellulären Virionen im Vergleich zu den Kontrollzellen stark verringert (Abb. 19A,B, oben). Im Falle des Knockdowns von Rab34 war ebenfalls eine starke Reduktion in der Menge an ausgeschleusten Virionen zu beobachten, allerdings gab es im Vergleich zu den Kontrollzellen kaum eine Änderung in der Menge der intrazellulären Nukleokapside (Abb. 19C, oben). Zusätzlich wurden die Zelllysate im Western Blot (WB) auf Expressionsstärke und Stabilität der HBV-Proteine untersucht. Zur Depletionskontrolle wurden Antikörper gegen Rab1A, Rab18 und Rab34 im WB angewandt. Alle verwendeten siRNAs depletierten ihr entsprechendes Zielprotein sehr effizient (Abb. 19A-C, unten). Die Depletionskontrolle von Rab34 wurde von Herrn Dr. Jens T. Stieler ausgeführt. Das L-Hüllprotein, welches in der nicht-glykosylierten Form p39 und in der glykosylierten gp42 Form vorliegt, blieb von der Inaktivierung von Rab1A, Rab18 und Rab34 unbeeinflusst (Abb. 19A-C, unten). Die Menge an Core war jedoch beim Knockdown von Rab1A und Rab18 geringer, wobei der Effekt in Rab18-depletierten Zellen wesentlich stärker war (Abb. 19A,B unten). Bei der Betrachtung der Abb. 19C (unten) fällt auf, dass Core in Rab34-Knockdown Zellen nicht beeinträchtigt war. Dementsprechend sind Rab1A und Rab18 möglicherweise in der Bildung, dem Transport und der Ausschleusung von HBV involviert, während Rab34 vermutlich erst in späteren Schritten des HBV-Lebenszyklus, wie bei der Ausschleusung von Virionen, benötigt wird.

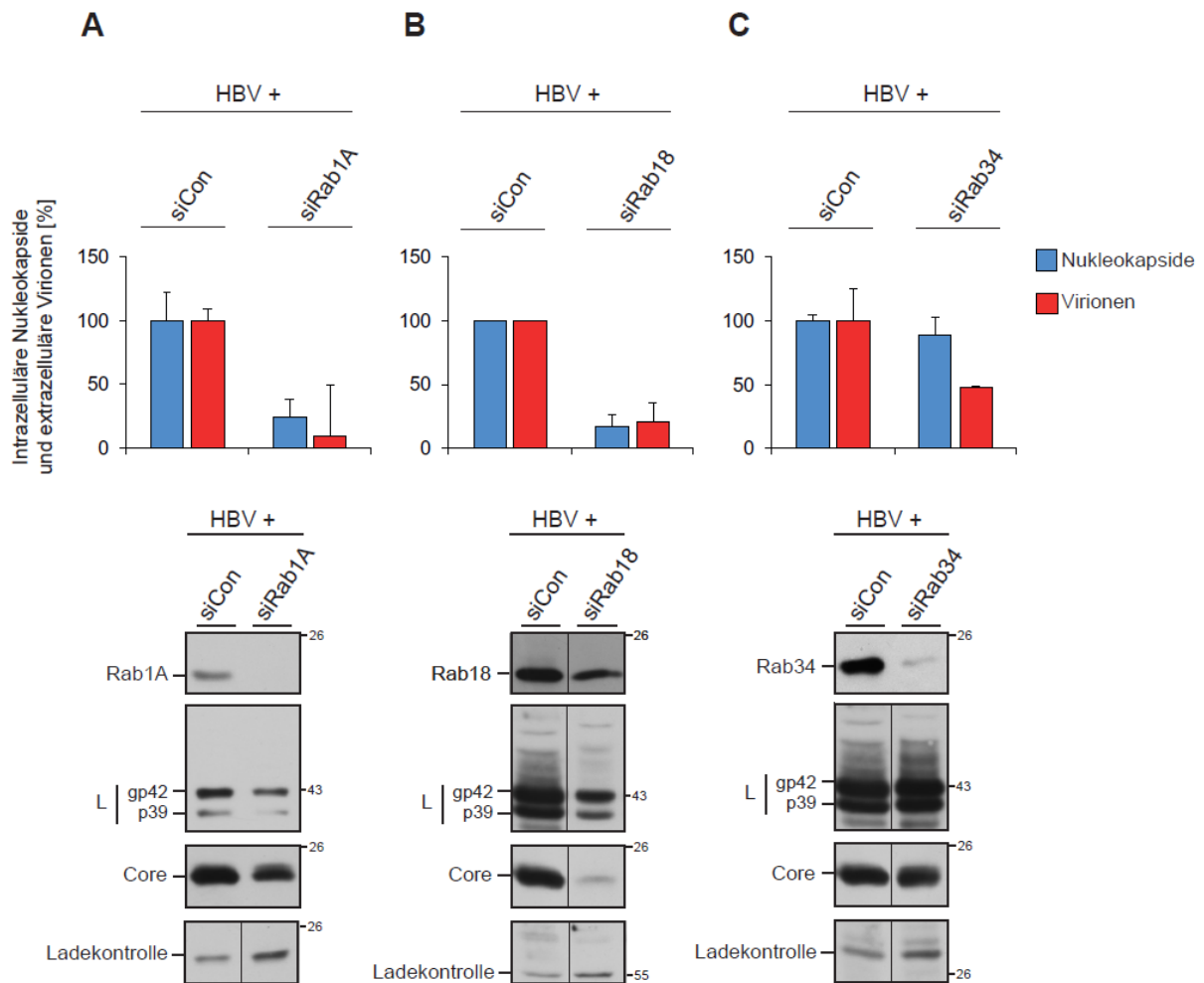


Abb. 19 Effekte der Depletion von Rab1A, Rab18 und Rab34 auf die Reifung und Ausschleusung von HBV

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder siRNA Pools gegen Rab1A (A), Rab18 (B) oder Rab34 (C) für 48 h transfiziert. Danach erfolgte die Re-Transfektion mit dem HBV-Replikon für weitere drei Tage. Anschließend wurden die Zellen mit 0,2% Triton-Lysepuffer aufgeschlossen. Intrazelluläre Nucleokapside (Zellysat) wurden durch eine Kapsid-spezifische, extrazelluläre Virionen (Überstand) durch eine Hüllprotein-spezifische IP gefällt. Es folgten die Isolierung viraler DNA und die Quantifizierung von Nucleokapsiden und Virionen mittels Multiplex-qPCR. (A, B, C oben) Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 2$). (A, B, C unten) Die Zellysate wurden zusätzlich im WB untersucht. Die Effizienz der Rab1A (A)-, Rab18 (B)- und Rab34 (C)-Depletion wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Rab1A, Rab18 und Rab34 validiert. Die Synthese der HBV- und Rab-Proteine wurden im WB mit Core-, und L-spezifischen Antikörpern überprüft. Als Ladekontrollen dienten unspezifische Banden der verwendeten Antikörper. Gezeigt sind die nicht-glykosylierte (p39) und glykosylierte Form (gp42) von L (links) und der Molekulargewichtsstandard in kDa (rechts).

Durch Überexpression von dominant-negativen (DN) Mutanten ist es möglich, die physiologische Funktion eines Proteins zu inaktivieren. Die DN Rab-Proteine sind funktionell nicht in der Lage GTP zu binden und liegen in der GDP-gebundenen, inaktiven Form vor. In diesem Zustand können sie nicht mit ihren Effektorproteinen interagieren und folglich ihre Funktion nicht mehr ausüben. HuH-7 Zellen wurden daher mit dem HBV-Replikon und einem Leervektor oder einem Myc-/GFP-getaggten Rab1A.DN (S25N)-, Rab18.DN (S22N)- oder Rab34.DN (T66N)-Konstrukt im DNA-Verhältnis von 3:1 ko-transfiziert. Die Zellen und Überstände wurden wie oben beschrieben (3.2.1) aufgearbeitet und immunpräzipitiert. Anschließend wurde die virale DNA isoliert und die Menge an Nukleokapsiden und Virionen mittels qPCR quantifiziert. Parallel hierzu wurde die Expression der DN Rab-Konstrukte durch Myc-/GFP-spezifische WB-Analysen überprüft und bestätigt (Abb. 20A-C, unten). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Rab1A-Depletion bewirkte die Rab1A.DN-Überexpression eine Hemmung der Nukleokapsid- und Virusproduktion, wenn auch in geringerem Maße (Abb. 20A, oben). Dies könnte auf kompensatorischen Effekte der Rab1B Isoform beruhen. Hingegen spiegelten die Effekte der Rab18.DN- und Rab34.DN-Überexpression nahezu vollkommen die entsprechenden Knockdown-Phänotypen wider, da beide Mutanten die Bildung und Ausschleusung von Virionen reduzierten (Abb. 20B,C, oben). Dies deutet an, dass HBV auf katalytisch-aktives Rab18 und Rab34 angewiesen ist. Während die ektopisch-exprimierten Rab1A.DN- und Rab34.DN-Proteine die Synthese der HBV L und Core-Proteine nicht beeinträchtigten, führte die Inaktivierung mit Rab18 (Depletion und DN Überexpression) zu einer verminderten Expression/Stabilität der HBV-Proteine (Abb. 20A-C, unten).

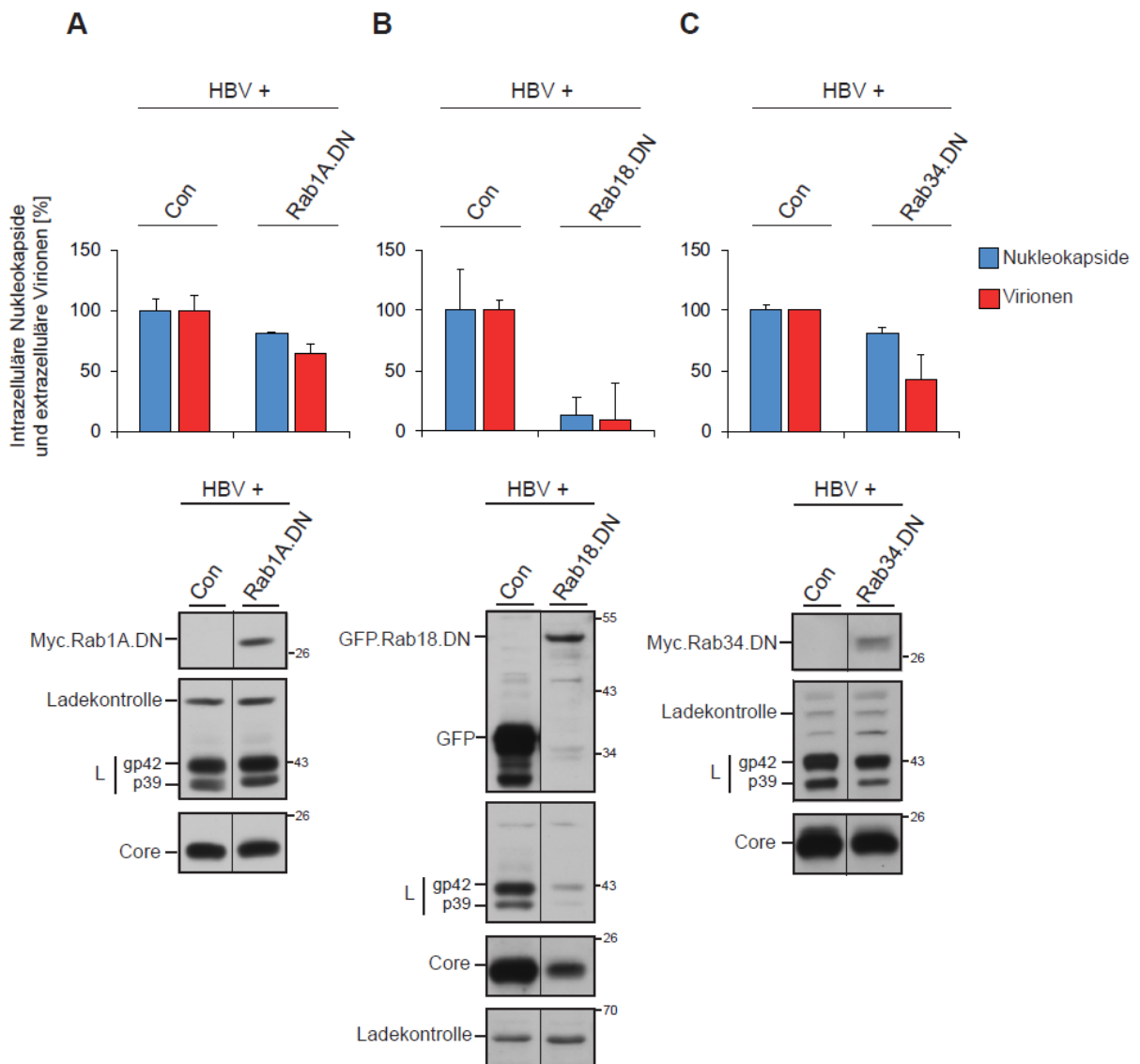


Abb. 20 Effekte der Überexpression von Rab1A.DN, Rab18.DN und Rab34.DN auf die Reifung und Ausschleusung von HBV

HuH-7 Zellen wurden mit dem HBV-Replikon und einem Myc-Leervektor (Con) im Falle von Rab1A.DN und Rab34.DN bzw. einem GFP-Leervektor (Con) im Falle von Rab18.DN oder einem GFP-/Myc-getaggten DN Rab-Konstrukt Rab1A.DN (A), Rab18.DN (B), Rab34.DN (C) im DNA-Verhältnis von 3:1 ko-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte wie in Abb. 19 beschrieben. (A, B, C oben) Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 2$). (A, B, C unten) Zusätzlich zu den qPCR-Daten sind die WB-Analysen dargestellt. Die Synthese der HBV- und DN Rab-Proteine wurde durch Verwendung mit Core-, L-, Myc- und GFP-spezifischen Antikörpern untersucht.

3.2.2 Die Rolle der Rab GTPase Rab6A bei der Reifung und Ausschleusung von HBV: RNA-Interferenz-, Überexpressions- und Immunfluoreszenzstudien

Der initiale Rab-Screen in stabil HBV-replizierenden HuH-7 Zellen lieferte Hinweise, dass auch Rab6A die HBV-Morphogenese positiv reguliert. Rab6A reguliert *per se* den retrograden Transportweg vom Golgi-Komplex zum ER (Starr *et al.*, 2010). Zur Verifizierung in transient HBV-produzierenden Zellen wurden HuH-7 Zellen mit einer Kontroll siRNA und einem siRNA Pool gegen Rab6A depletiert und mit dem HBV-Replikon re-transfiziert. Die Analysen von Synthese und Ausschleusung von HBV-Partikeln wurden wie oben beschrieben (3.2.1) durchgeführt. Wie in Abb. 21A (oben) gezeigt ist, führte die Inaktivierung von Rab6A zu einer Erhöhung der intrazellulären Nukleokapside und zu einer starken Verminderung der extrazellulären Virionen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das Expressionsniveau und die Stabilität der HBV-Proteine wurden zusätzlich im WB untersucht. Für die Kontrolle der Depletion wurde ein Rab6A-spezifischer Antikörper im WB eingesetzt und die Depletionseffizienz von siRab6A somit verifiziert (Abb. 21A, unten). Das L-Hüllprotein und Core waren von der Rab6A-Inaktivierung nicht beeinflusst (Abb. 21A, unten). Mittels Überexpression einer Rab6A.DN (T27N)-Mutante sollte das Rab6A-Protein ebenfalls inaktiviert werden. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit HBV-Replikon und dem Leervektor oder Myc-getaggten Rab6A.DN im DNA-Verhältnis von 3:1 ko-transfiziert. Die Überexpression führte lediglich zu einer moderaten Erhöhung der intrazellulären Nukleokapside und zu einer schwachen Reduktion der extrazellulären Virionen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 21B, oben). Möglicherweise könnte die Rab6B Isoform die Inaktivierung von Rab6A kompensieren. Bei der Analyse der HBV-Proteine im WB waren für L und Core, wie auch im Falle des Knockdown-Experiments, keine Änderungen in den Proteinmengen in Rab6A-überexprimierten Zellen zu beobachten (Abb. 21B, unten). Auch wenn die Überexpression den Knockdown-Phänotyp nicht in gleichem Maß widerspiegelte, konnte dennoch bestätigt werden, dass Rab6A essentiell für die Ausschleusung von HBV essentiell ist.

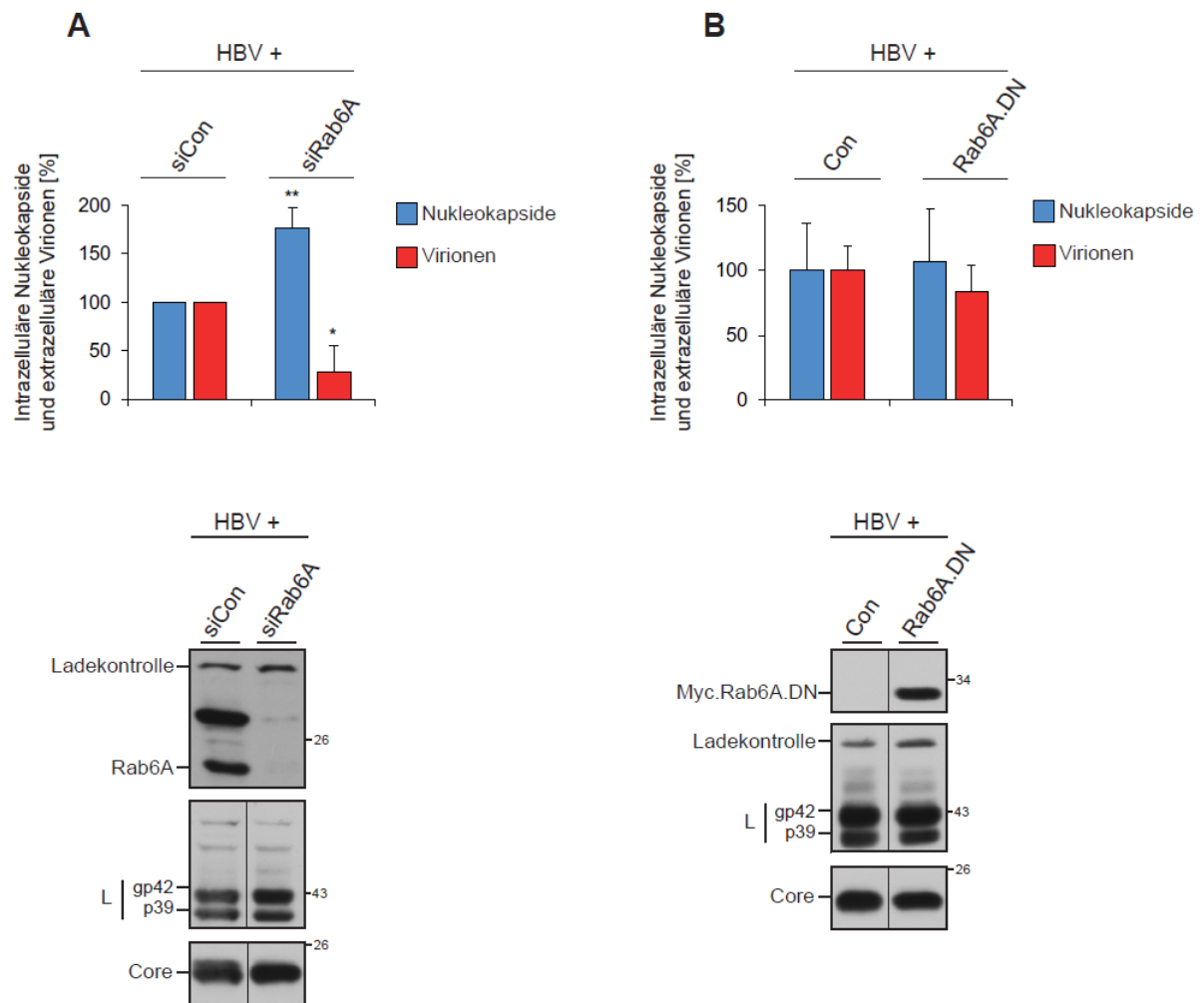


Abb. 21 Effekte der Depletion von Rab6A und Überexpression von Rab6A.DN auf die Reifung und Ausschleusung von HBV

(A) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder einem siRNA Pool gegen Rab6A depletiert und mit dem HBV-Replikon re-transfiziert. (B) Parallel dazu wurden HuH-7 Zellen mit dem HBV-Replikon und dem Myc-Leervektor (Con) oder Myc-getaggten Rab6A.DN Konstrukt im DNA-Verhältnis von 3:1 ko-transfiziert. Zellen und Überstände wurden wie oben beschrieben (Abb. 19) aufgearbeitet und immunpräzipitiert. (A, B oben) Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 3$ (A), $n = 2$ (B)). Zur statistischen Analyse wurde ein unabhängiger Zweistichproben t-test durchgeführt. $**P < 0,01$. (A, B unten) Zusätzlich zu den qPCR Daten ist die WB-Analyse gezeigt. Die Depletionseffizienz von siRab6A wurde mit Rab6A-spezifischem Antikörper bestimmt (A). Die Synthese der HBV- und Rab6A-Proteine wurde durch Core-, L- (A, B) und Myc- (B) spezifischen Antikörpern untersucht. Als Ladekontrolle dienten unspezifische Banden der verwendeten Antikörper.

Um weitere Hinweise zur Wirkweise von Rab6A zu gewinnen, wurden Immunfluoreszenz (IF)-Analysen in Rab6A-depletierten, HBV-produzierenden Zellen durchgeführt. Abweichend wurde hier eine sog. 3'UTR siRNA gegen Rab6A eingesetzt (3.2.3). Eine Rab6A-spezifische WB-Analyse der Zelllysate zeigt, dass auch diese siRNA das Rab6A Zielprotein wirksam ausschaltete (Abb. 22A). Die Zellen wurden dann auf Deckgläschen mit 4% PFA fixiert und anschließend mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen L, Core, Calnexin (CNX) und Golgin. Der Core-Antikörper von der Fa. Dako erkennt neben Core Mono-/Dimeren auch Kapside, während der Core-Antikörper 3HB17 spezifisch für Kapside ist. In den Kontrollzellen zeigte Core ein typisches ringförmiges, perinukleäres Muster einhergehend mit einer partiellen Lokalisation im Zellkern (Abb. 22B). Das L-Protein war ähnlich perinukleär lokalisiert und zeigte eine starke Ko-Lokalisation mit Core (Abb. 22B). Die Ko-Lokalisation könnte auf den Ort des Zusammenbaus von Nukleokapsiden bzw. deren Umhüllung andeuten. Die Kapsid-spezifische Färbung mit 3HB17 äußerte sich in einer punktuellen, perinukleären Verteilung mit einer partiellen Ko-Lokalisation mit L. Bei der Inaktivierung von Rab6A änderte sich das Verteilungsmuster von Core drastisch. Während die ringförmige, perinukleäre Lokalisation von Core diffuser wurde, akkumulierte das Protein nun auch vermehrt in der Zellperipherie (Abb. 22C). Zeitgleich war die Core/L Ko-Lokalisation im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert (Abb. 22C). Bei der Detektion der Kapside war eine verminderte punktuelle Verteilung in Rab6A-depletieren Zellen festzustellen (Abb. 22C). Zur Kontrolle der Zellvitalität und -morphologie wurden die Zellorganellen ER und Golgi mit entsprechenden Markern Calnexin (CNX) und Golgin analysiert. Die spezifischen Färbungen ergaben keinen Unterschied zwischen Kontroll- und Rab6A-depletieren Zellen (Abb. 22B,C). Die Daten geben Grund zur Annahme, dass der Knockdown von Rab6A die Umhüllung von Nukleokapsiden inhibiert.

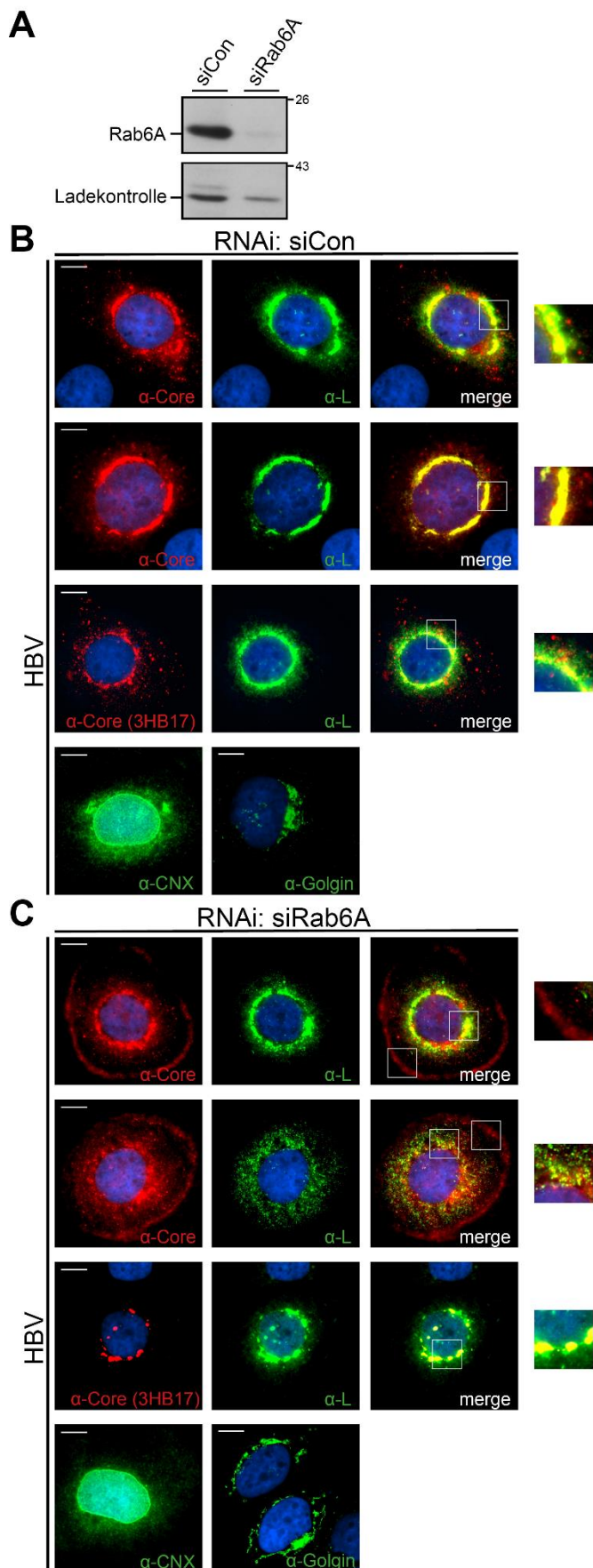


Abb. 22 Effekt der Depletion von Rab6A auf das intrazelluläre Verteilungsmuster von HBV

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) und einer 3'UTR siRNA gegen Rab6A für 48 h depletiert. Dann wurden die Zellen mit dem HBV-Replikon für weitere 48 h re-transfiziert. **(A)** Zur Depletionskontrolle wurden Zellen mit 1x Laemmli-Probenpuffer lysiert und im WB mit einem Antikörper gegen Rab6A analysiert. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande des Antikörpers. **(B, C)** Für die IF-Analyse wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit 0,2% Triton-X 100 permeabilisiert. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Core und Kapside (α -Core von Dako), gegen Kapside (α -Core von Hytest: 3HB17), gegen L (MA18/7), Calnexin (CNX) und Golgin inkubiert, bevor sie mit Alexa-Fluor 546-konjugierten und Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundär-antikörpern markiert wurden. Die Core-Färbung ist in rot, die L-, CNX- und Golgin-Färbungen in grün und die Zellkern-Färbung in blau dargestellt. Maßstabsbalken: 10 μ m. In den Mischbildern (*merge*) sind Kästchen angezeigt, welche in Vergrößerung ganz rechts abgebildet sind. (RNAi: RNA Interferenz).

3.2.3 Etablierung eines Rescue-Protokolls zur Validierung von Depletions-Effekten anhand der Rab6A GTPase

Mit Hilfe von *Rescue*-Experimenten wird das depletierte Protein re-exprimiert, wodurch der Knockdown-Phänotyp umgekehrt und die Spezifität der siRNA bestätigt werden kann. Diese Methode stellt also eine wichtige Validierung der Depletions-Ergebnisse dar. Ein *Rescue*-Protokoll sollte anhand von Rab6A etabliert werden. Um die Spezifität des Knockdown-Phänotyps von Rab6A zu bestätigen, sollte die Re-Expression eines Rab6A-Konstrukts den beobachteten Effekt umkehren. Da das verfügbare Rab6A-Konstrukt das humane Rab6A-Gen enthält, würde die in Abb. 21 verwendete siRNA auch die Re-Expression eines *Rescue*-Konstrukts unterbinden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine siRNA benutzt, die spezifisch die 3'UTR Region der endogenen Rab6A-mRNA tangiert. Die Funktionalität der siRab6A (3'UTR) wurde im WB verifiziert. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA, dem siRNA Pool oder der 3'UTR siRNA gegen Rab6A für 48 h transfiziert. Dann erfolgte die Re-Transfektion mit einem Myc-getaggten Rab6A-Konstrukt für weitere 72 h. Anschließend wurden die Zellen mit 1x Laemmli-Probenpuffer aufgeschlossen und im WB mit einem Rab6A-Antikörper analysiert. Wie erwartet, depletierte der siRNA Pool sowohl das endogene als auch das exogene Rab6A-Protein (Abb. 23). Bei Verwendung der 3'UTR siRNA wurde dagegen nur das endogene Rab6A-Protein depletiert (Abb. 23). Für die Etablierung des *Rescue*-Protokolls konnte somit die 3'UTR siRNA benutzt werden. Jedoch war zu beobachten, dass die Mengen an exogenem zu endogenem Rab6A-Protein nicht völlig übereinstimmten (Abb. 23), obwohl mit 0,2 µg nur eine geringe DNA-Menge transfiziert wurde. Morita *et al.* (2012) beschrieben in einer Studie, dass die Re-Expression eines Proteins oft nicht mit der endogenen Menge konform ist. Eine Verringerung der transfizierten DNA-Menge des Expressionsvektors geht zudem meist auf Kosten der Transfektionsrate. Zu diesem Zweck entwickelte die Arbeitsgruppe einen Vektor, der die exogene Proteinexpression genau steuern lässt. Die Attenuierung der Proteinexpression wurde durch Deletionen innerhalb des CMV Enhancers/Promotors erreicht, wodurch wichtige Bindestellen von Transkriptionsfaktoren eliminiert wurden (Morita *et al.*, 2012). In Anlehnung an dieses Prinzip sollte ein *Rescue*-Vektor hergestellt werden.

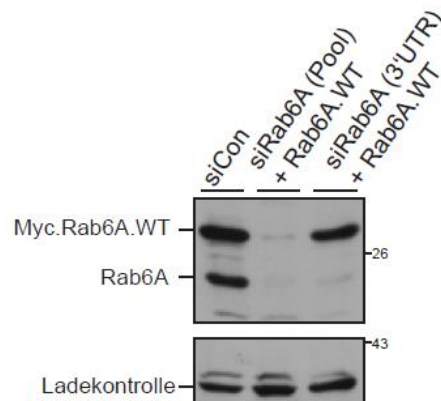
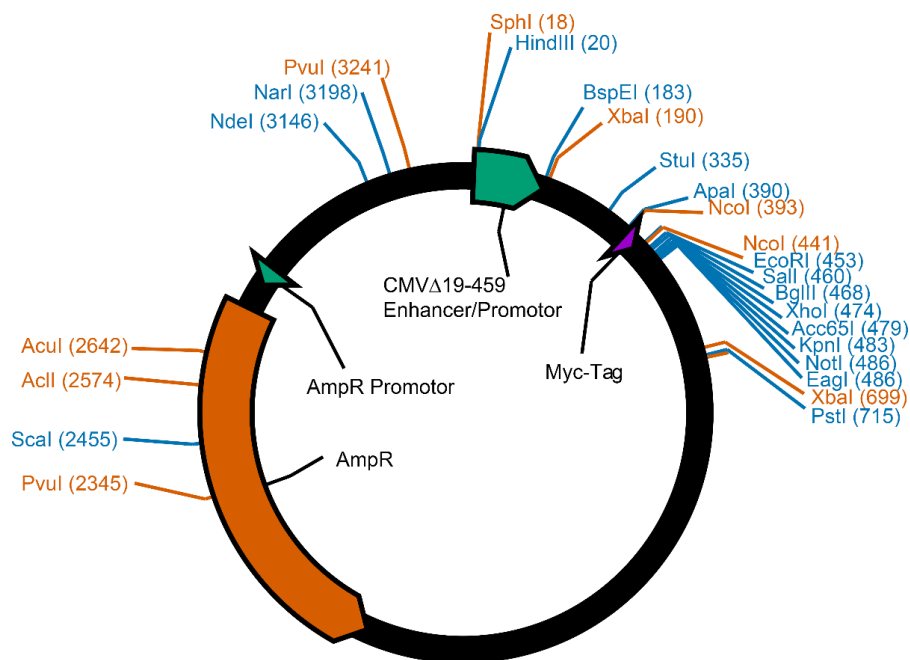


Abb. 23 Rab6A-Depletion und -Rekonstitution: Protein-Expressionsanalysen

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon), einem spezifischen siRNA Pool (siRab6A (Pool)) oder einer spezifischen 3'UTR siRNA (siRab6A (3'UTR)) für 48 h depletiert. Danach erfolgte die Re-Transfektion mit einem Myc-getaggten Rab6A Konstrukt (Rab6A.WT, WT = Wildtyp) (0,2 µg) für weitere 72 h. Die Zellen wurden durch 1x Laemmli-Lyse aufgeschlossen und im WB mit Rab6A-spezifischem Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande des Antikörpers.

Dazu wurden in der CMV-Promotorregion eines pCMV.myc Vektors zwei HindIII-Schnittstellen durch Mutagenesen eingefügt. Zunächst wurde eine HindIII-Schnittstelle an Nt-Position 19 im CMV-Promotor mit den Mutagenese-Primern *Rescue1.f* und *Rescue1.r* eingeführt. Für die zweite Mutagenese an der Nt-Position 459 im CMV-Promotor wurden die Mutagenese-Primer *Rescue2.f* und *Rescue2.r* angewendet. Anschließend erfolgte die Restriktion mit HindIII, wodurch die Nt-Sequenzen 19-459 entfernt wurden. Abb. 24 zeigt den attenuierten pCMV Δ 19-459.myc-*Rescue* Vektor, weiterhin als *Rescue*-Vektor betitelt. Durch Umklonierung wurden die jeweiligen Rab-Gene, wie das humane Rab6A-Gen, ins Leseraster der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) des Vektors eingefügt, sodass N-terminal Myc-getaggte Konstrukte erzeugt wurden.



pCMV Δ 19-459.myc-Rescue

Abb. 24 Schematische Darstellung des *Rescue*-Vektors zur attenuierten Proteinexpression

Dargestellt ist der Vektor pCMV Δ 19-459.myc-Rescue für eine attenuierte Expression von Proteinen durch die Deletion der Nt 19-459 im CMV Enhancer/Promotor. Die Promotoren sind in grün, der Myc-Tag in lila und die Ampicillin-Resistenz in dunklem orange gezeigt. Zusätzlich sind Restriktionsenzyme dargestellt, die entweder einfach (blau) oder zweifach (orange) in der Vektorsequenz schneiden. Diese Vektorkarte wurde mit dem Programm PlasmaDNA erstellt.

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder der 3'UTR Rab6A siRNA depletiert. Danach erfolgte die Ko-Transfektion mit dem HBV-Replikon und dem FLAG-Leervektor oder dem Myc-getaggten Rab6A-*Rescue*-Konstrukt im DNA Verhältnis 8:1 oder 40:1. Der Nachweis von Nukleokapsiden und Virionen erfolgte durch spezifische IP und qPCR, wie oben beschrieben (3.2.1). Abb. 25 (oben) bestätigte zunächst den zuvor beschriebenen Knockdown-Phänotyp von Rab6A (siehe Abb. 21), der sich in einer Erhöhung von intrazellulären Nukleokapsiden und einer starken Reduktion von extrazellulären Virionen äußerte. Bei der Re-Expression des Rab6A-*Rescue*-Konstrukts war jedoch keine Reversion des Knockdown-Phänotyps zu beobachten, unabhängig von den transfizierten DNA-Verhältnissen (Abb. 25, oben). Zusätzlich wurden die Zelllysate im WB auf Expressionsstärke und Stabilität der HBV-Proteine untersucht. Die Behandlung mit Rab6A-spezifischem Antikörper bestätigte die Depletion des endogenen Rab6A-Proteins und die exogene Expression des Rab6A-*Rescue*-Konstrukts (Abb. 25, unten). Das höhere Molekulargewicht des Rab6A-*Rescue* ist bedingt durch den fusionierten Myc-Tag. Die transfizierte Menge von 0,25 µg des *Rescue*-Konstrukts lieferte ähnliche Mengen wie das endogene Rab6A und wurde daher in Folgeexperimenten ebenso eingesetzt. Da sich der Knockdown-Phänotyp nicht umkehren ließ, sollte ein alternatives Protokoll getestet werden, bei dem anstelle einer Ko-Transfektion, die Re-Transfektion von Rab6A-*Rescue* einen Tag vor der Re-Transfektion mit dem HBV-Replikon erfolgte. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass sich zunächst ein Grundproteinniveau an Rab6A in der Zelle bilden kann, bevor die HBV-Produktion angeschaltet wird.

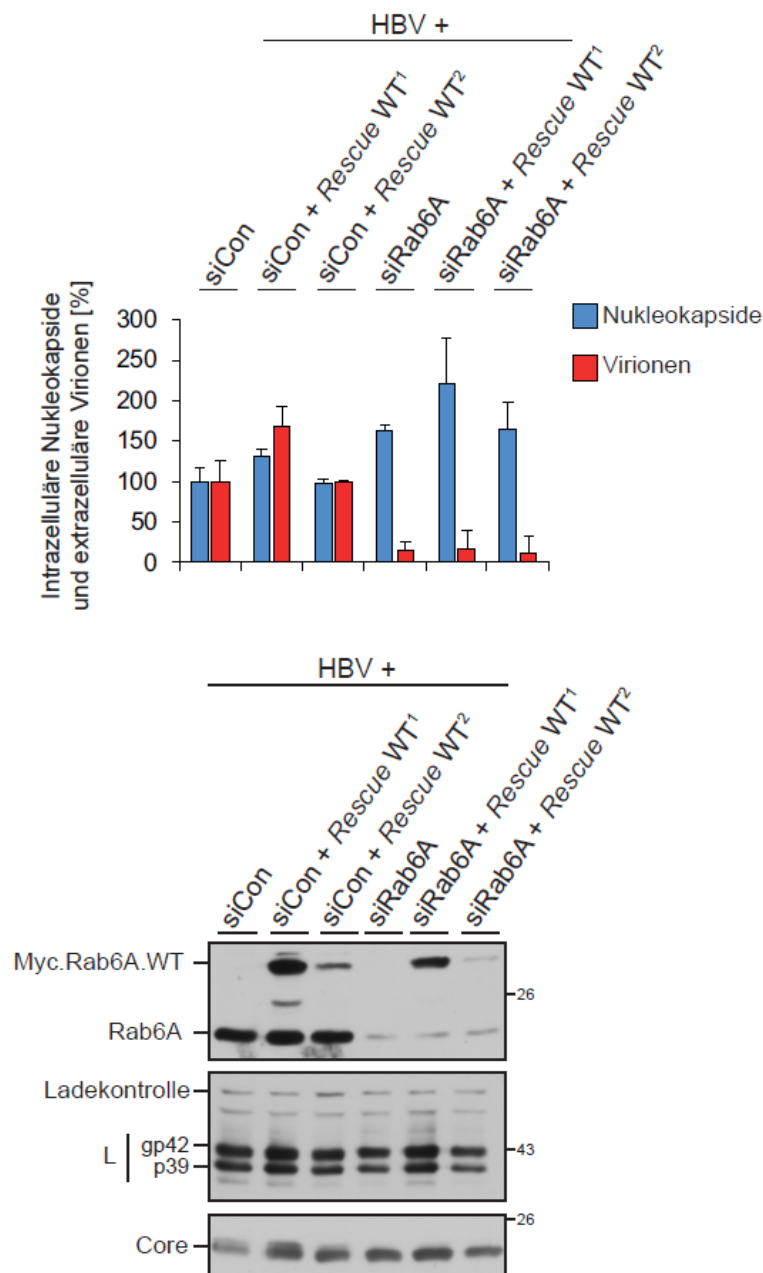


Abb. 25 Rab6A-Depletion und -Rekonstitution: HBV-Replikationsanalysen

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder der 3'UTR Rab6A siRNA (siRab6A) depletiert. Danach erfolgte die Ko-Transfektion mit dem HBV-Replikon und dem FLAG-Leervektor oder dem Myc-getaggten Rab6A-Rescue-Konstrukt (*Rescue* WT, WT = Wildtyp) (¹ = 0,25 µg, ² = 0,05 µg). Die Verarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte wie oben beschrieben (Abb. 19). (**oben**) Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 2$). (**unten**) Die Synthese von HBV- und Rab6A-Proteinen wurden mit Core-, L- und Rab6A-spezifischen Antikörpern im WB überprüft. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande eines Antikörpers. Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und repräsentative Ergebnisse sind dargestellt.

Zu diesem Zweck wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA und der 3'UTR siRNA Rab6A für 48 h depletiert. Danach erfolgte die Re-Transfektion mit dem FLAG-Leervektor oder dem Myc-getaggen Rab6A-*Rescue* WT-Konstrukt bzw. Rab6A-*Rescue* DN-Konstrukt für weitere 24 h. Erst dann wurde das HBV-Replikon retransfiziert. 72 h später wurden die Zellen und Überstände nach dem Standardprotokoll (3.2.1) aufgearbeitet. In Abb. 26A (oben) ist gezeigt, dass bei der Re-Expression von Rab6A-*Rescue* WT der Knockdown-Phänotyp umgekehrt werden konnte. Die Ausschleusung von extrazellulären Virionen war nun nicht länger blockiert. Dieser Effekt blieb bei der Re-Expression von Rab6A-*Rescue* DN aus (Abb. 26B oben). Dies verdeutlicht, dass funktionell aktives Rab6A notwendig ist, um den „normalen“ Phänotyp der Kontrollzellen wiederherzustellen. Die Zellysate wurden zudem im WB mit Core-, L-, und Rab6A-spezifischen Antikörpern auf die Synthese von HBV- und Rab6A-Proteinen überprüft. Die Menge an L war in Rab6A-depletierten Zellen mit oder ohne Re-Expression von Rab6A-*Rescue* WT oder DN im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht beeinträchtigt (Abb. 26A,B unten). Die Core-Menge in Rab6A-depletierten Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht erhöht (Abb. 26A,B unten).

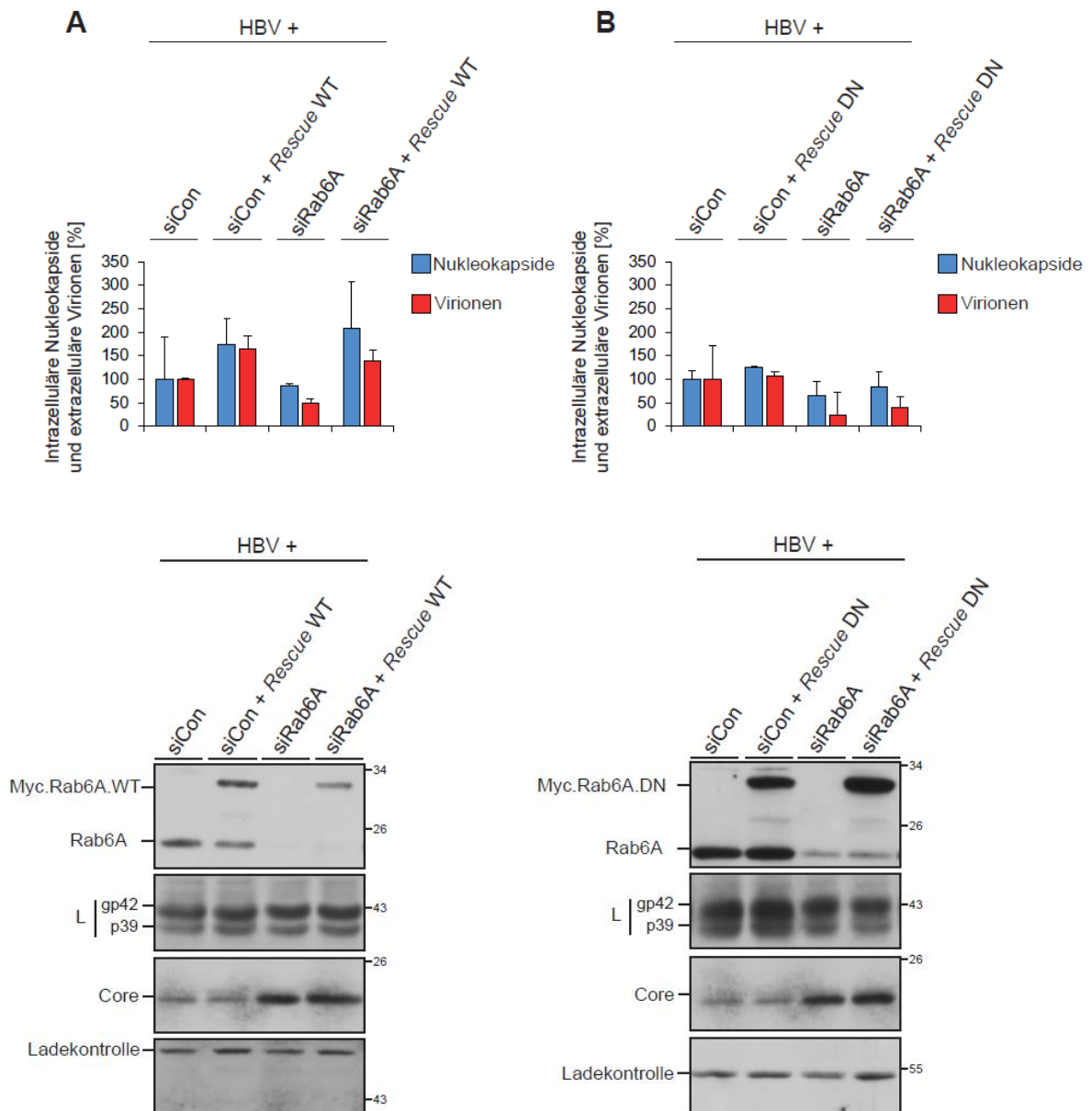


Abb. 26 Optimierung der Rab6A-Depletion und -Rekonstitution: HBV-Replikationsanalysen

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) und der 3'UTR Rab6A siRNA (siRab6A) für 48 h depletiert. Danach erfolgte die Re-Transfektion mit dem FLAG-Leervektor oder dem Myc-getaggten Rab6A-Rescue WT-Konstrukt (*Rescue WT*) (**A**) bzw. dem Rab6A-Rescue DN-Konstrukt (*Rescue DN*) (**B**). Nach weiteren 24 h wurde das HBV-Replikon re-transfiziert. 72 h später wurden die Zellen und Überstände nach dem Standardprotokoll (Abb. 19) aufgearbeitet. (**A, B oben**) Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten, in Duplikaten gemessen ($n = 2$). (**A, B unten**) Die Synthese von HBV- und Rab6A-Proteinen wurden mit Core-, L- und Rab6A-spezifischen Antikörpern im WB überprüft. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande der verwendeten Antikörper. Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und repräsentative Ergebnisse sind dargestellt.

3.2.4 Die Rolle der Rab GTPase Rab33B bei der Reifung und Ausschleusung von HBV

Rab33B ist ein Regulator im retrograden Transport vom Golgi-Komplex zum ER (Starr *et al.*, 2010). Außerdem ist bekannt, dass Rab33B möglicherweise in dem Zellprozess der Autophagie involviert ist (Itoh *et al.*, 2008). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Bildung und Ausschleusung nackter HBV-Kapside von Rab33B und dessen Effektorprotein Atg5/12/16L1 abhängig ist (Döring & Prange, 2015). Ob und welche Funktion(en) Rab33B in der Morphogenese von HBV-Virionen spielt, sollte nun entschlüsselt werden.

3.2.4.1 Rab33B-Inaktivierung hat keinen Einfluss auf die Bildung und Ausschleusung subviraler HBV-Partikel

Zuerst sollte untersucht werden, ob die Depletion von Rab33B Auswirkungen auf den konstitutiven Sekretionsweg hat. Das kleine Hüllprotein von HBV (S) diene dabei als Reporter. Die Verpackung in subvirale, leere Hüllpartikel (*subviral empty envelope particles*, SVPs) wird durch die Integration von S in die Membran des ER initiiert. SVPs knospen in das Lumen des ER/ERGIC Kompartiments, durchqueren den Golgi Komplex und werden abschließend in den extrazellulären Raum sezerniert (Eble *et al.*, 1986; Huovila *et al.*, 1992; Prange, 2012). HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder einem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 h depletiert. Es folgte die Re-Transfektion mit einem HA-getaggen S-Konstrukt (S.HA) für weitere 72 h. Die Zellen wurden mit 1x Laemmli-Probenpuffer lysiert, während die Überstände ultrazentrifugiert wurden, um SVPs zu pelletieren. Die Experimente wurden zusammen mit Herrn K. Sorousch durchgeführt. Die WB-Analyse mit HA-spezifischen Antikörpern zeigte keine Änderung in der Synthese und Ausschleusung von S.HA nach Knockdown von Rab33B im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 27). Das N-Glykosylierungsmuster von S.HA unterschied sich außerdem nicht (Abb. 27). Die N-Glykosylierung im ER ist eine ko-translationale Modifikation von Proteinen, die u.a. kritisch für die korrekte Proteinfaltung, Stabilität und Funktion kritisch sein kann (Julithe *et al.*, 2014). An etwa die Hälfte der S-Proteine wird ein N-Glykan an Aminosäure 146 (Asn, Asparagin) angehängt (gp27, extrazellulär: gp28), während die andere Hälfte der S-Proteine unglykosyliert (p24) bleibt. Die glykosylierte Form ist wichtig für die Sekretion von

Virionen und die unglykosylierte Form für die HBV-Infektiosität (Julithe *et al.*, 2014). Um die Depletionseffizienz von Rab33B zu überprüfen, wurden die Zelllysate mit Rab33B-spezifischem Antikörper im WB untersucht. Die Funktionalität der siRNA konnte bestätigt werden (Abb. 27). Daher ist Rab33B für die Morphogenese von SVPs nicht essentiell.

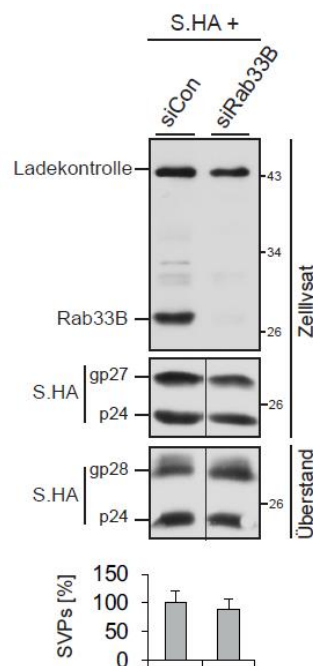


Abb. 27 Effekt der Depletion von Rab33B auf die Reifung und Ausschleusung subviraler HBV-Partikel

HuH-7 Zellen wurden 48 h mit Kontroll siRNA (siCon) oder einem siRNA Pool gegen Rab33B behandelt und dann mit einem HA-getaggenen HBV-S-Konstrukt (S.HA) für weitere 72 h re-transfiziert. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte durch Laemmli-Lyse, während die Überstände durch Ultrazentrifugation zunächst pelletiert und dann ebenfalls in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen wurden. Um die Depletion zu überprüfen, erfolgte die WB-Analyse mit einem Antikörper gegen Rab33B. Die Synthese (Zelllysate) und Ausschleusung (Überstand) von S.HA wurde durch einen HA-spezifischen Antikörper im WB überprüft. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande des Rab33B-Antikörpers. Gezeigt sind die nicht-glykosylierten (p24) und glykosylierten Formen (gp27, gp28) von S.HA (links) und Molekulargewichtsstandards in kDa (rechts). Die Menge an ausgeschleusten subviralen Partikeln (SVPs) wurde densitometrisch quantifiziert und die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle abgebildet ($n = 3$). Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

Die Verwendung von siRNAs kann unter Umständen unerwünschte Nebeneffekte, wie Zytotoxizität, zur Folge haben, die dann zu Änderungen in der Zell-Morphologie und zum Zelltod führen. Ob sich die Zell-Morphologie in Rab33B-depletierten Zellen änderte, sollte durch IF überprüft werden. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA oder dem siRNA Pool gegen Rab33B für vier Tage depletiert. Da kein funktionierender Antikörper gegen Rab33B in der IF zur Verfügung stand, wurden Zellen in 1x Laemmli-Probenpuffer lysiert und zur Depletionskontrolle mit Rab33B-

spezifischem Antikörper im WB analysiert (Abb. 28A). Zeitgleich wurden Zellen auf Deckgläschen mit 100% Methanol/2 mM EGTA fixiert und permeabilisiert. Als Fixierungsmethode wurde Methanol verwendet, da nicht alle verwendeten Antikörper in PFA-fixierten Zellen reagieren. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen folgende Zellkompartimente angefärbt: ER = α -Calnexin (CNX), Intermediärkompartiment (IC) = α -Proteindisulfid-Isomerase (PDI), Golgi Komplex = α -Golgin-97 und Plasmamembran (PM) = α - β -Aktin. Die Depletionskontrolle und die IF wurden experimentell von Frau T. Döring durchgeführt. Abb. 28B zeigt keine Änderungen in der Zell-Morphologie zwischen Kontroll- und Rab33B-depletierten Zellen. Die verwendete siRNA gegen Rab33B hatte somit keinerlei Auswirkung auf die Zell-Morphologie.

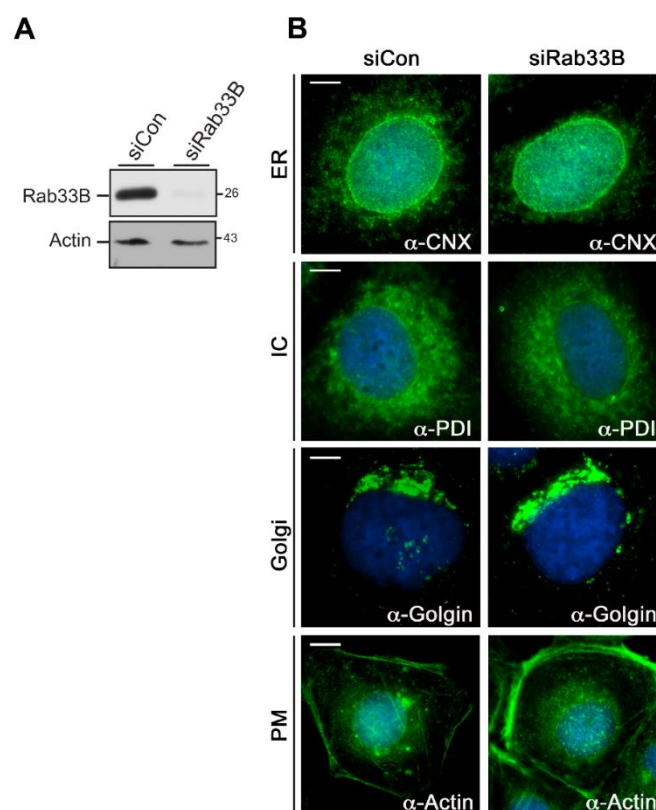


Abb. 28 Effekt der Depletion von Rab33B auf die Zell-Morphologie

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder siRab33B für 4 Tage depletiert. (A) Zur Depletionskontrolle wurden Zellen in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen mit Rab33B-spezifischem Antikörper im WB untersucht. (B) Für die IF-Analyse wurden die Zellen zunächst mit 100% Methanol/2 mM EGTA fixiert und permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern für folgende Zellkompartimente: ER = α -Calnexin (CNX), Intermediärkompartiment (IC) = α -Proteindisulfid-Isomerase (PDI), Golgi = α -Golgin-97 und Plasmamembran (PM) = α - β -Aktin. Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit Fluorophor-markierten Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Maßstabsbalken: 10 μ m. Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

3.2.4.2 Rab33B-Inaktivierung hemmt die Bildung und Ausschleusung viraler HBV-Partikel

Da der konstitutive Sekretionsweg nicht von Rab33B abhängig ist, sollte die Funktion der Rab GTPase in der Morphogenese von HBV näher beleuchtet werden. HuH-7 Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und dem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 h depletiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem HBV-Replikon re-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte nach dem Standardprotokoll (3.2.1). Abb. 29A (oben) zeigt, dass der Knockdown von Rab33B zu einer starken Reduktion von intrazellulären Nukleokapsiden und extrazellulären Virionen im Vergleich zu den Kontrollzellen führte. Zusätzlich wurden die Zellysate im WB auf Expressionsstärke und Stabilität der HBV-Proteine untersucht. Zur Depletionskontrolle wurde ein Antikörper gegen Rab33B im WB angewandt und bestätigte die Effizienz der siRNA (Abb. 29A, unten). Das L-Hüllprotein, welches in der nicht-glykosylierten Form p39 und in der glykosylierten gp42 Form vorliegt, war nicht beeinflusst von der Rab33B-Inaktivierung (Abb. 29A, unten). Überraschenderweise war die Menge an Core in depletierten Rab33B-Zellen deutlich weniger im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 29A, unten). Daher sollte zunächst untersucht werden, ob die RNAi-Methode einen Effekt auf die Zellvitalität hatte. Einen ersten Hinweis darauf gab die Ladekontrolle, welche eine unspezifische Bande eines Antikörpers war. Es konnte kein Unterschied zwischen Kontroll- und depletierten Zellen festgestellt werden, was für keine Schädigung der Zelle durch die siRNA sprach (Abb. 29A unten). Des Weiteren sollten Bradford- und Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Tests diese Annahme bestätigen. Im Bradford-Test wird der Proteingehalt durch die Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau mit den Aminosäuren-Seitenketten der Proteine bestimmt. Als Maß für die Zytotoxizität bestimmter Substanzen dient das Enzym LDH, welches bei Zerstörung von Membranstrukturen verstärkt freigesetzt wird. Sowohl die Proteinexpression (Abb. 29B) als auch die Zytotoxizität (Abb. 29C) ergaben, dass die eingesetzte siRNA keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hatte.

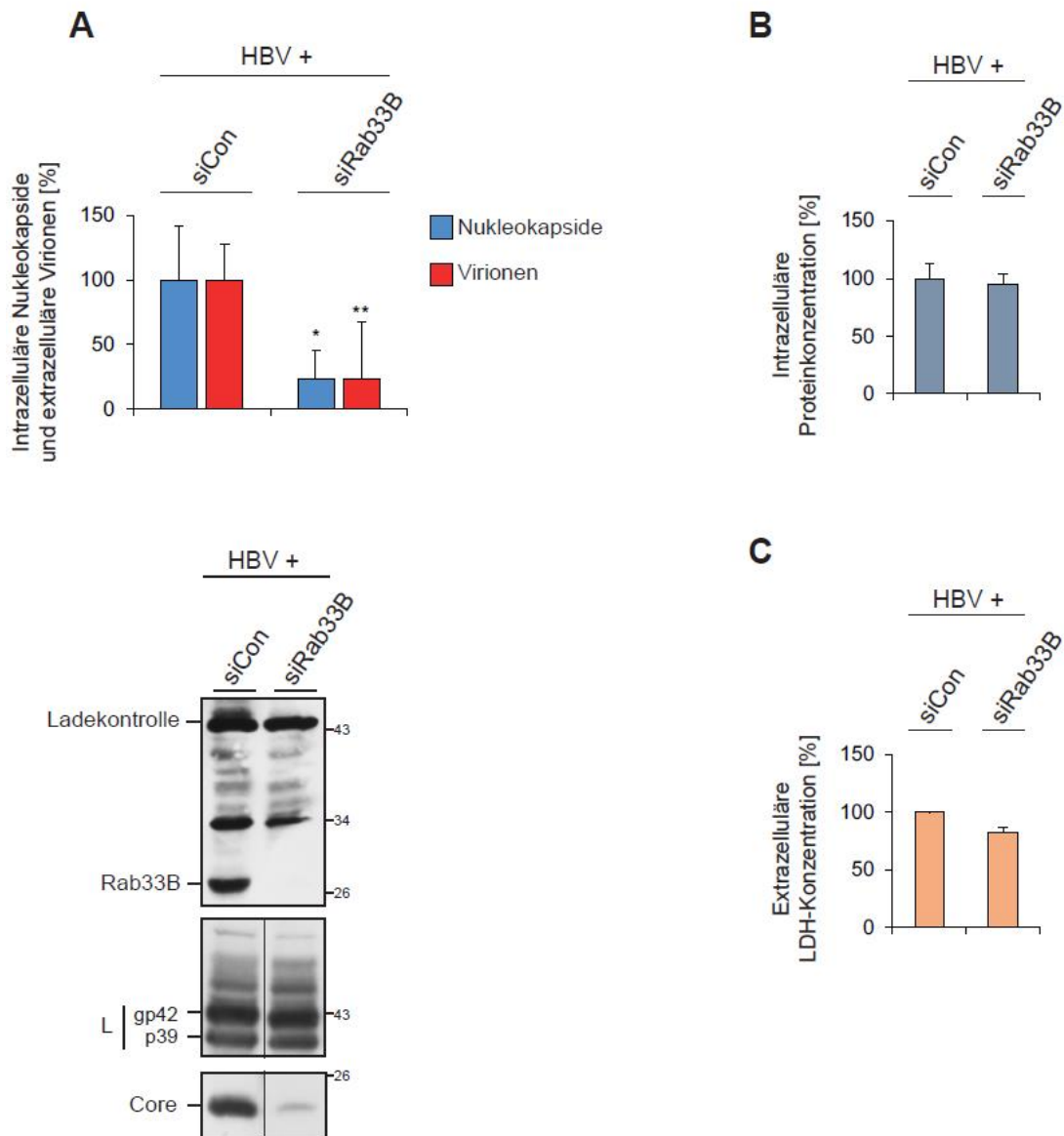


Abb. 29 Effekt der Depletion von Rab33B auf die Reifung und Ausschleusung viraler HBV-Partikel

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder dem siRNA Pool gegen Rab33B depletiert. Danach erfolgte die Re-Transfektion mit dem HBV-Replikon. Zellen und Überstände wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet und immunpräzipitiert (Abb. 19). **(A oben)** Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 4$). Zur statistischen Analyse wurde ein unabhängiger Zweistichproben t-test durchgeführt. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$. **(A unten)** Die Synthese der HBV-Proteine wurde mit Core- und L-spezifischen Antikörpern im WB untersucht. Die Depletionseffizienz von siRab33B wurde mit Rab33B-spezifischem Antikörper bestimmt. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande des Rab33B-Antikörpers. **(B)** Die totale Proteinkonzentration der Zelllysate von siCon- und siRab33B-behandelten Zellen wurde mittels Bradford-Test bestimmt und die Ergebnisse in Prozent relativ zur Kontrolle präsentiert ($n = 2$). **(C)** Um eine Zellschädigung durch die verwendeten siRNAs auszuschließen, wurde der LDH-Test genutzt. Zu diesem Zweck wurde die Menge an Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Überstand gemessen und in Prozent relativ zur Kontrolle gezeigt ($n = 2$). Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

3.2.4.3 Rab33B-Inaktivierung und Rescue: Phänomen einer Ko-Depletion

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 erwähnt, sind *Rescue*-Versuche ein wichtiges Werkzeug, um die Spezifität der siRNA zu validieren. Es sollte daher untersucht werden, ob sich der Knockdown-Phänotyp von Rab33B durch die Re-Expression eines siRNA-resistenten Rab33B-Konstrukts umkehren lässt. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA oder dem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 depletiert. Dann erfolgte die Ko-Transfektion mit dem HBV-Replikon und dem FLAG-Leervektor oder einem murinen Myc-getaggen Rab33B-*Rescue*-Konstrukt im DNA-Verhältnis 8:1 für weitere 72 h. Das murine Konstrukt trägt keine Zielsequenzen des verwendeten siRNA Pools gegen Rab33B. Das *Rescue*-Konstrukt zeichnet sich durch eine Attenuierung der Expression von Rab33B aus, die durch eine Depletion im CMV-Promotor bedingt ist (siehe Kapitel 3.2.3). Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll (3.2.1). Mit Rab33B-spezifischem Antikörper im WB konnte eine erfolgreiche Depletion des endogenen Rab33B nachgewiesen und die exogene Expression des Rab33B-*Rescue*-Konstrukts gezeigt werden, welches durch den Myc-Tag ein höheres Molekulargewicht besitzt (Abb. 30). Bei der Analyse der HBV-Proteine durch L- und Core-spezifische Antikörper im WB war wiederholt keine Änderung in der Menge an L festzustellen (Abb. 30). Allerdings erhöhte sich die stark reduzierte Menge an Core trotz der Re-Expression von Rab33B in Rab33B-depletierten Zellen nicht (Abb. 30). Folglich konnten die verminderten Mengen von intrazellulären Nukleokapsiden und extrazellulären Virionen im Rab33B-Knockdown ebenfalls nicht wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es verblieb daher die Fragestellung, warum der Depletionseffekt von Rab33B nicht umkehrbar ist. Die verwendete siRNA gegen Rab33B richtet sich gegen das humane Rab33B-Gen, während das *Rescue*-Konstrukt das murine Rab33B-Gen exprimiert. Beide Gensequenzen sind hoch konserviert und es kann ausgeschlossen werden, dass sich die siRNA gegen das murine Rab33B-Gen richtet. Eine weitere Überlegung schloss das bereits oben erwähnte Phänomen der Ko-Depletion mit ein. Die Depletion von Rab33B könnte gleichzeitig weitere Komplexpartner, wie z.B. den Autophagie-Komplex Atg5/12/16L1, depletieren. Dieses Phänomen wurde bereits bei ESCRT-II Komplexpartnern gezeigt (Stieler & Prange, 2014, Kapitel 3.1.3). Dabei führte die Inaktivierung von einem Komplexpartner zum Zerfall des kompletten Komplexes, da

zunächst die Stöchiometrie und dadurch die Stabilität gestört war. Zu diesem Zweck wurden die Zelllysate mit Atg5- und Atg16L1-spezifischen Antikörpern untersucht. Tatsächlich konnte in beiden Fällen eine Ko-Depletion beobachtet werden, wenn Rab33B depletiert wurde (Abb. 30). Somit reicht die alleinige Re-Expression des Rab33B-*Rescue*-Konstrukts nicht aus, um den Phänotyp der Kontrollzellen herzustellen. Das *Rescue*-Experiment ist dadurch bei Rab33B nicht realisierbar, da hier nicht nur Rab33B, sondern auch dessen Komplexpartner Atg5/12/16L1 in dem richtigen stöchiometrischen Verhältnis re-exprimiert werden müssten. Eine Änderung des *Rescue*-Protokolls durch die Re-Expression des Rab33B-*Rescue*-Konstrukts vor der Re-Transfektion mit HBV, wie am Beispiel von Rab6A etabliert (siehe Kapitel 3.2.3), hätte demzufolge auch keinen Erfolg.

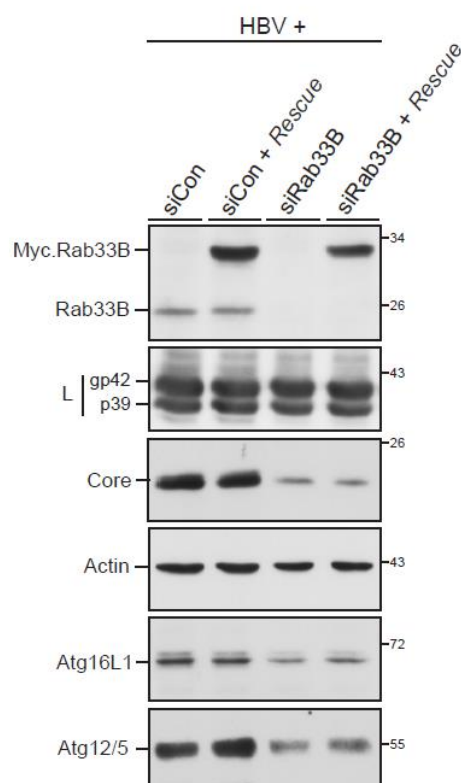


Abb. 30 Rab33B-Depletion und -Rekonstitution: Ko-Depletion von Effektor-Proteinen

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder dem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 h transfiziert. Danach erfolgte die Ko-Transfektion mit dem HBV-Replikon und dem FLAG-Leervektor oder einem murinen Myc-getaggen Rab33B-*Rescue*-Konstrukt (*Rescue*) im DNA-Verhältnis 8:1 für weitere 72 h. Der Aufschluss der Zellen erfolgte wie oben beschrieben (Abb. 19). Die Synthese von HBV-, Rab33B- und Atg-Proteinen wurden mit Core-, L-, Rab33B-, Atg16L1- und Atg5-spezifischen Antikörpern im WB überprüft. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und repräsentative Ergebnisse sind dargestellt. Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

3.2.4.4 Rab33B-Inaktivierung beeinflusst die Bildung/Stabilität von HBV-Kapsiden

Die Inaktivierung von Rab33B in HBV-produzierenden HuH-7 Zellen führte zu einer drastischen Verringerung der Core-Menge in den Zelllysaten. Neben dem Core-Protein allein sollte auch dessen Zusammenbau in ikosaedrische Kapside im Kontext von Rab33B analysiert werden. Zelllysate der Knockdown-Experimente (siCon und siRab33B) wurden daher auf Kapside hin untersucht. Zur Kontrolle wurde gereinigtes Core mit aufgetragen. Dabei handelt es sich um ein aus *E. coli* gewonnenes rekombinantes HBV Core-Protein (Fa. MoBiTec). Die Zelllysate wurden mit 6x Probenpuffer ohne EDTA versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden durch einen Kapillarblot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Im Anschluss an den Kapillartransfer wurde ein Antikörper gegen Kapside (α -Core von Dako) appliziert. Abb. 31 zeigt, dass die Signalintensität von Kapsiden in Rab33B-inaktivierten Zelllysaten im Vergleich zu den Kontrollzellen stark reduziert war.

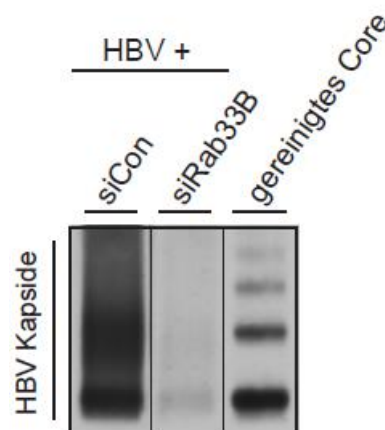


Abb. 31 Effekt der Depletion von Rab33B auf den Zusammenbau/Stabilität von HBV-Kapsiden

Zelllysate der Knockdown-Experimente in HBV-replizierenden HuH-7 Zellen wurden in einem nativen Agarose-Gel aufgetrennt. Der Proteintransfer erfolgte durch Kapillarwirkung und die Analyse erfolgte mit einem Antikörper gegen Kapside (α -Core von Dako) im Kapillarblot.

3.2.4.5 Rab33B-Inaktivierung durch dominant-negative Mutanten hemmt die Bildung und Ausschleusung von HBV

Durch die exogene Überexpression einer Rab33B.DN (T47N)-Mutante kann endogenes Rab33B ebenfalls inaktiviert werden (Itoh *et al.*, 2008). HuH-7 Zellen

wurden mit dem HBV-Replikon und dem GFP-Leervektor oder GFP-getaggen Rab33B.DN-Konstrukt im DNA-Verhältnis von 3:1 ko-transfiziert. Die Zellen und Überstände wurden wie oben beschrieben (3.2.1) aufgearbeitet und immunpräzipitiert. Die Ko-Expression führte zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären Nukleokapside und extrazellulären Virionen (Abb. 32, oben). Zudem zeigte die Analyse der HBV-Proteine im WB keine Änderung in der Proteinmenge von L, jedoch abermals eine starke Reduktion der Core-Menge in Rab33B.DN-überexprimierenden Zellen (Abb. 32, unten). Die Überexpression bestätigte die gewonnenen Ergebnisse des RNAi-vermittelten Experiments. Infolgedessen wird für die Bildung, den Transport und/oder die Ausschleusung von HBV katalytisch-aktives Rab33B benötigt.

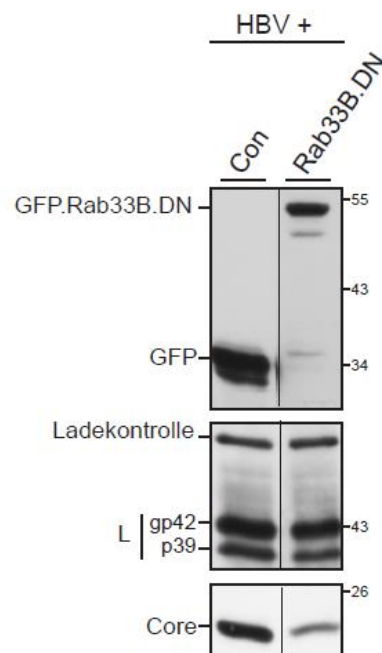
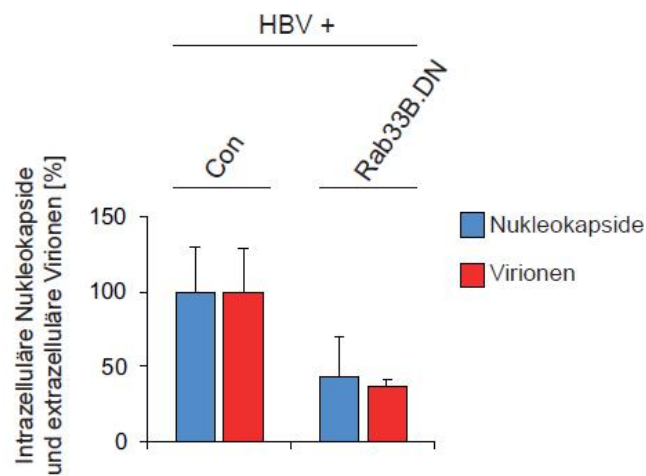


Abb. 32 Effekte der Überexpression von Rab33B.DN auf die Reifung und Ausschleusung von HBV

HuH-7 Zellen wurden mit dem HBV-Replikon und dem GFP-Leervektor (Con) oder einem GFP-getaggen Rab33B.DN-Konstrukt im DNA-Verhältnis von 3:1 ko-transfiziert. Die Analysen zur Synthese und Ausschleusung von HBV-Partikeln wurden wie oben beschrieben (Abb. 19) durchgeführt. Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 2$). Die Synthese der HBV- und Rab33B-Proteine wurde mit Core-, L-, GFP-spezifischen Antikörpern im WB untersucht. Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

3.2.4.6 Rab33B-Expression wird durch die HBV-Replikation positiv reguliert

Nachdem eine essentielle Rolle von Rab33B für HBV festgestellt werden konnte, sollte untersucht werden, ob die HBV-Replikation einen Einfluss auf die Expression von Rab33B nimmt. Hierzu wurden HuH-7 Zellen mit dem leeren FLAG-Vektor oder dem

HBV-Replikon für 72 h transfiziert. Es folgte die RNA-Extraktion durch TRIzol, die Umschreibung in cDNA und abschließend die quantitative Analyse mittels SYBR Green-basierter qPCR mit spezifischen Primern gegen Rab33B. Abb. 33A zeigt, dass die HBV-Replikation zu einer Hochregulierung der Rab33B Gen-Transkription führte. Auf Proteinebene konnte dieses Ergebnis nicht eindeutig beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies war vermutlich zum einen der weniger sensitiven WB-Methode und zum anderen der geringen DNA-Transfektionseffizienz von etwa 20% geschuldet. Um das Problem der Transfektionseffizienz zu lösen, wurde die Proteinmenge von Rab33B in stabilen HBV-replizierenden HepG2215 analysiert. Als Kontrollzellen diente die karzinome Leberzelllinie HepG2. Gleiche Zellmengen wurden in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mit Rab33B-spezifischem Antikörper im WB untersucht. Wie in Abb. 33B dargestellt, war die Menge an Rab33B in HepG2215 im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich erhöht.

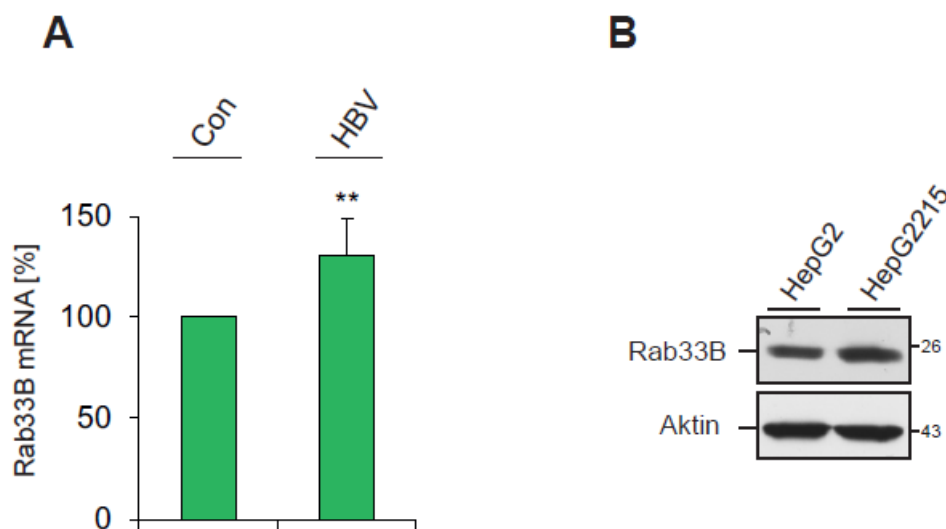


Abb. 33 Die HBV-Replikation erhöht die Transkription und Translation von Rab33B

(A) HuH-7 Zellen wurden nur mit dem FLAG-Leervektor (Con) oder dem HBV-Replikon für 72 h transfiziert. Danach folgten der Aufschluss der Zellen mit TRIzol, die Isolierung der RNA, die Umschreibung in cDNA und die quantitative Analyse mittels SYBR Green-basierter qPCR. Als Referenz diente das Haushaltsgen β -Aktin. Die Menge an Rab33B-Transkripten wurde durch die $\Delta\Delta$ Ct-Wert Methode errechnet und die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten ($n = 5$), die in Duplikaten gemessen wurden. Zur statistischen Analyse wurde ein unabhängiger Zweistichproben t-test durchgeführt. $**P < 0,01$. (B) Vor der Zelllyse wurden die Zellzahlen von HepG2 und HepG2215 bestimmt und gleiche Mengen in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Zelllysate wurden im WB mit Rab33B-spezifischem Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

3.2.4.7 Rab33B-Inaktivierung und HBV-Replikationszyklus: Untersuchungen zur Transkription, Translation und Löslichkeit der Virusproteine

Um einen Einblick zu erhalten, in welcher Weise der Rab33B-Knockdown die Synthese oder Stabilität von Core und letztlich die HBV-Replikation stört, sollten verschiedene Experimente hinsichtlich der Beeinflussung der Transkription, Expression und Löslichkeit der HBV-Proteine durchgeführt werden. Zunächst wurde die HBV-Transkription in Rab33B-depletierten und Rab33B.DN-überexprimierenden HuH-7 Zellen untersucht. Das HBV-Replikon enthält ein 1.1-faches HBV-Genom und einen hMT-IIA-Promotor, welcher dem viralen Core/Pol-Promotor vorangeschaltet ist. Da der hMT-IIA-Promotor die Transkriptionsanalyse beeinflussen könnte, wurde ein modifiziertes HBV-Konstrukt mit einer Deletion des hMT-IIA-Promotors (HBV Δ HP) benutzt. Die Funktionalität des Konstrukts konnte in einer früheren Arbeit bereits gezeigt werden (Stieler & Prange, 2014). HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder dem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 h behandelt und dann mit HBV Δ HP re-transfiziert. Nach 72 h erfolgte der Aufschluss der Zellen. In einem parallelen Ansatz wurden HuH-7 Zellen mit dem GFP-Leervektor oder dem GFP-getaggten Rab33B.DN-Konstrukt und HBV Δ HP für 72 h ko-transfiziert. Die RNA wurde durch Extraktion mittels TRIzol und anschließender RNA-Isolierung gewonnen. Nach der Umschreibung in cDNA erfolgte die Quantifizierung durch qPCR unter der Verwendung spezifischer HBV-Primer (HBV-Assay-F/R) gegen pgRNA-, Core/Pol- und Hüllprotein-Transkripte. Wie in Abb. 34A zu erkennen ist, war die HBV-Transkription durch die Inaktivierung von Rab33B nicht beeinflusst.

Nachfolgend sollte die Löslichkeit von Core näher untersucht werden. In den vorigen Versuchen wurden die Zellen mit 0,2% Triton-Lysepuffer aufgeschlossen, welcher mit Triton X-100 ein mildes Detergenz enthielt. Diese Bedingungen führten möglicherweise zum Verlust schwer löslicher Proteine. Daher sollte der stärkere Radioimmunpräzipitation (RIPA)-Puffer, der zudem das denaturierende Detergenz SDS beinhaltet, verwendet werden. Die löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurden durch Zentrifugation separiert. Bei der Inspektion von L war kein Unterschied in den Proteinmengen zwischen löslichen und unlöslichen L-Fractionen in Kontroll- oder Rab33B-depletierten Zellen zu erkennen (Abb. 34B). Im Gegensatz dazu waren

die Mengen an löslichem und unlöslichem Core in Rab33B-inaktivierten Zellen stark verringert (Abb. 34B). Folglich könnte der Knockdown von Rab33B die Bildung, den Transport und/oder die Stabilisierung von Nukleokapsiden negativ beeinflussen.

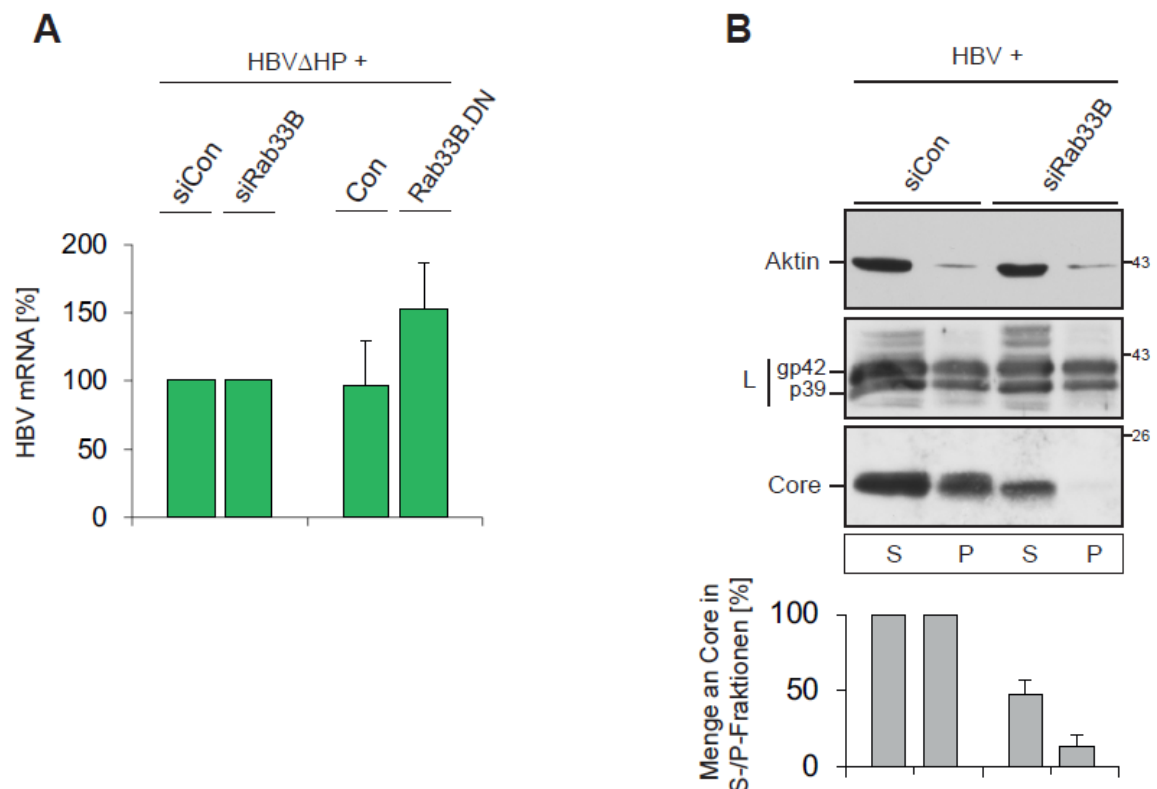


Abb. 34 Effekte der Rab33B Depletion auf die Transkription, Proteinexpression und Löslichkeit von HBV

(A) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder dem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 h transfiziert und mit einem HBV-Replikon ohne hMT-IIA-Promotor (HBV Δ HP) für weitere 72 h re-transfiziert. Parallel dazu, wurden HuH-7 Zellen mit HBV Δ HP und dem GFP-Leervektor (Con) oder dem GFP-getaggten Rab33B.DN-Konstrukt für 72 h ko-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben (Abb. 33). Die Menge an HBV-Transkripten wurde durch die $\Delta\Delta$ Ct-Wert Methode errechnet und die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von jeweils zwei Experimenten, in Duplikaten gemessen ($n = 2$). (B) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder dem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 h behandelt. Es erfolgte die Re-Transfektion mit dem HBV-Replikon. Nach drei weiteren Tagen wurden die Zellen mit RIPA-Puffer versetzt und in Detergenz lösliche (*soluble* = S) und unlösliche (Pellet = P) Fraktionen separiert. Die Fraktionen wurden in der WB-Analyse mit L- und Core-spezifischen Antikörpern untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Die Menge an HBV-Proteinen wurde densitometrisch analysiert und ist in dem Graph relativ zur Kontrolle dargestellt ($n = 4$). Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

3.2.4.8 Rab33B-Inaktivierung durch *short hairpin* RNA-Interferenz

Bei Experimenten auf Einzelzell-Ebene ist es wichtig festzustellen, dass die untersuchte Zelle tatsächlich Rab33B-depletiert ist. Da kein funktionierender Rab33B-Antikörper in der IF zur Verfügung stand, sollte eine alternative RNAi-Methode mit *short hairpin* (sh) RNAs angewendet werden. Dabei wird ein Expressionsvektor, der

für eine bestimmte shRNA Sequenz kodiert, transfiziert. Die shRNA wird exprimiert, faltet sich in einen *short hairpin* und wird von Proteinen der RNAi Maschinerie verarbeitet (Paddison *et al.*, 2002). Dazu wurde das SureSilencing™ shRNA Kit (pGeneClip™hMGFP) der Fa. Qiagen erworben. In dem Kit waren ein Vektor mit einer Kontroll shRNA Sequenz (shC.hMGFP) und vier Vektoren mit verschiedenen shRNA Sequenzen gegen Rab33B (shRab33B.hMGFP) enthalten. Der Vektor kodiert für eine shRNA Sequenz unter der Kontrolle eines U1 Promotors und für das Reportergen humanes Monster GFP (hMGFP) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Zunächst sollten die verschiedenen shRNA Sequenzen gegen Rab33B auf Funktionalität getestet werden. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit shC.hMGFP oder einem der vier shRab33B.hMGFP Vektoren für vier Tage transfiziert. Da nur eine Transfektionseffizienz von etwa 10% vorlag, konnte die Depletion auf Proteinebene im WB nicht verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Depletionseffizienz mit der sensitiveren SYBR Green-basierten qPCR ausgewertet. Abb. 35 zeigt, dass alle shRab33B Sequenzen die Expression von Rab33B um etwa 45% reduzierten. Für Folgeexperimente sollte die shRab33B #2 benutzt werden.

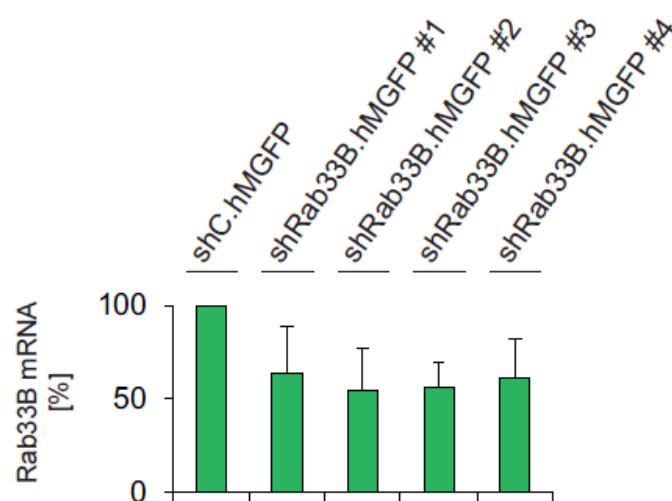


Abb. 35 Rab33B-Depletion durch *short hairpin* RNA-Interferenz

HuH-7 Zellen wurden mit shC.hMGFP oder einem der vier shRab33B.hMGFP Vektoren für vier Tage transfiziert. Danach wurden die Zellen mit TRIzol lysiert und die RNA isoliert. Es folgte die Umschreibung in cDNA und die Analyse der Proben mit spezifischen Primern gegen Rab33B mittels SYBR Green-basierter qPCR. Als Referenz diente das Haushaltsgen β -Aktin. Die Menge an Rab33B-Transkripten wurde durch die $\Delta\Delta Ct$ -Wert Methode errechnet und die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$), die in Duplikaten gemessen wurden.

Bei der Analyse der transfizierten HuH-7 Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop erwies

sich die Expression des hMGFP als schädigend für die Morphologie von HuH-7 Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher sollte das hMGFP-Gen durch ein anderes Reportergen ersetzt werden. Nach dem Austesten möglicher Reportergene, welche nicht mit der Morphogenese von HBV interferieren, fiel die Wahl auf das HA-getaggte Bet1 (*blocked early in transport*). Durch Umklonierung wurde HA-Bet1 in shC und shRab33B eingefügt (Abb. 36).

Auch die sh.HA-Bet1-Konstrukte erreichten nur eine DNA-Transfektionseffizienz von etwa 10%, wodurch sehr wenige HA-Bet1 markierte und folglich wenige depletierte HuH-7 Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden konnten. Die DNA-Transfektionsrate des shRNA Konstrukts ließ auf die Depletionsrate schließen. Entgegen den Erwartungen war bei dem Vergleich von Kontrollzellen zu Rab33B-depletierten Zellen kein Unterschied zwischen den Expressions- und Verteilungsmustern der HBV-Proteine auszumachen (Daten nicht gezeigt). Die beobachteten Zellen waren zwar HA-Bet1 markiert, offenbar reichte die Depletionseffizienz der verwendeten shRab33B #2 Sequenz aber nicht aus, um genügend Rab33B zu inaktivieren. Daher war diese Methode für die immunhistochemische Analyse ungeeignet. Alternativ müsste eine validierte shRab33B Sequenz aus bekannten Arbeiten in den sh.HA-Bet1 Vektor kloniert werden, um eine bessere Depletionseffizienz zu erlangen. Dennoch stellt dieses neu etablierte IF-Transfektionsprotokoll eine wichtige Methode zur Überprüfung von Depletionen dar, wenn kein spezifischer Antikörper in der IF zur Verfügung steht.

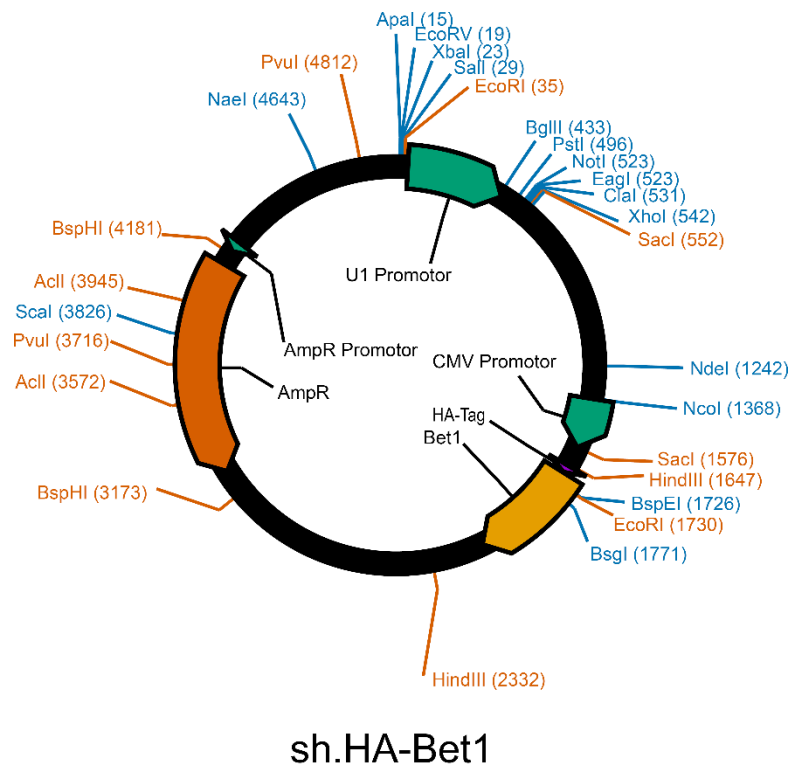


Abb. 36 Schematische Darstellung des sh.HA-Bet1 Vektors

Dargestellt ist der Vektor sh.HA-Bet1, welcher entweder für eine Kontroll shRNA (shC.HA-Bet1) oder eine shRNA Sequenz gegen Rab33B (shRab33B.HA-Bet1) unter der Kontrolle eines U1 Promotors (grün) und das Reportergen HA-Bet1 (in orange) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (grün) kodiert. Der Vektor ist gegen Ampicillin resistent (dunkles orange). Zusätzlich sind Restriktionsenzyme dargestellt, die entweder einfach (blau) oder zweifach (orange) in der Vektorsequenz schneiden. Die Vektorkarte wurde mit dem Programm PlasmaDNA erstellt.

3.2.4.9 Rab33B-Inaktivierung und intrazelluläres Verteilungsmuster von HBV

Weiterführend sollte der Depletionseffekt von Rab33B auf das Core-Protein in einzelnen Zellen immunhistochemisch charakterisiert werden. Da das neu etablierte Transfektionsprotokoll mit den zur Verfügung stehenden shRNAs gegen Rab33B nicht die gewünschte Depletionseffizienz zeigte (siehe Abb. 35), wurde für künftige IF die bisherige RNAi-Methode mit siRNA gewählt. Dazu wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA oder dem siRNA Pool gegen Rab33B für 48 h depletiert. Es folgte die Re-Transfektion mit dem HBV-Replikon für weitere 48 h. Die Depletion wurde im WB analysiert und bei der Auswertung der IF etwa 30 Zellen berücksichtigt. Zur Depletionskontrolle wurden Zellen in 1x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mit Rab33B-spezifischem Antikörper im WB analysiert. Wie Abb. 37A zeigt, konnte die Depletionseffizienz bestätigt werden. Weitere Zellen wurden dann auf Deckgläschen mit 4% PFA fixiert und anschließend mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Die

Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen L, Core und CNX. Der verwendete Core-Antikörper von der Fa. Dako erkennt neben Core Mono-/Dimeren, auch Kapside und das prä-Core-Protein. Die Depletionskontrolle und IF wurden experimentell von Frau T. Döring durchgeführt. In den Kontrollzellen war Core wie zu erwarten im gesamten Zytoplasma verteilt und auch im Zellkern zu finden. Außerdem war eine ringförmige, perinukleäre Anreicherung von Core zu beobachten. Es sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Struktur um das am ER-lokalisierte prä-Core-Protein handelte. Da Core von den Hüllproteinen rekrutiert wird, sollte das Experiment mit dem HBV-Replikon ohne Hüllprotein-Gene (HBV Δ Env) wiederholt werden. In Abb. 37B ist unter diesen Bedingungen keine ringförmige, perinukleäre Struktur von Core mehr zu erkennen. Dies deutete darauf hin, dass diese Struktur tatsächlich das Core- und nicht das prä-Core-Protein darstellt. Das L-Protein hatte eine perinukleäre Verteilung und ko-lokalisierte teilweise mit dem ER (CNX). Juxt nukleäre Anreicherungen von L ko-lokalisieren außerdem stark mit Core (Abb. 37B). Wenn Rab33B inaktiviert wurde, änderte sich die Verteilung von Core, jedoch nicht von L. Die Lokalisation von L war weiterhin peri-/juxt nukleär mit einer Überlappung mit dem ER (CNX) (Abb. 37C). Wie auch in den vorigen biochemischen Experimenten war die Menge an Core in Rab33B-depletierten Zellen reduziert, wenn die Kamera nicht auf optimale Belichtungszeit eingestellt war (Daten nicht gezeigt). Core akkumulierte zudem schwächer in ringförmigen, perinukleären Strukturen. Dadurch reduzierte sich folglich die Core/L Ko-Lokalisation (Abb. 37C). Die Daten deuten an, dass der Verlust von Rab33B den Transport von Core zum Ort des Zusammenbaus von Nukleokapsiden bzw. deren Umhüllung blockiert oder fehlerhaftet. Dadurch sind Core/Nukleokapside nicht am richtigen Ort verfügbar und können destabilisiert und abgebaut werden.

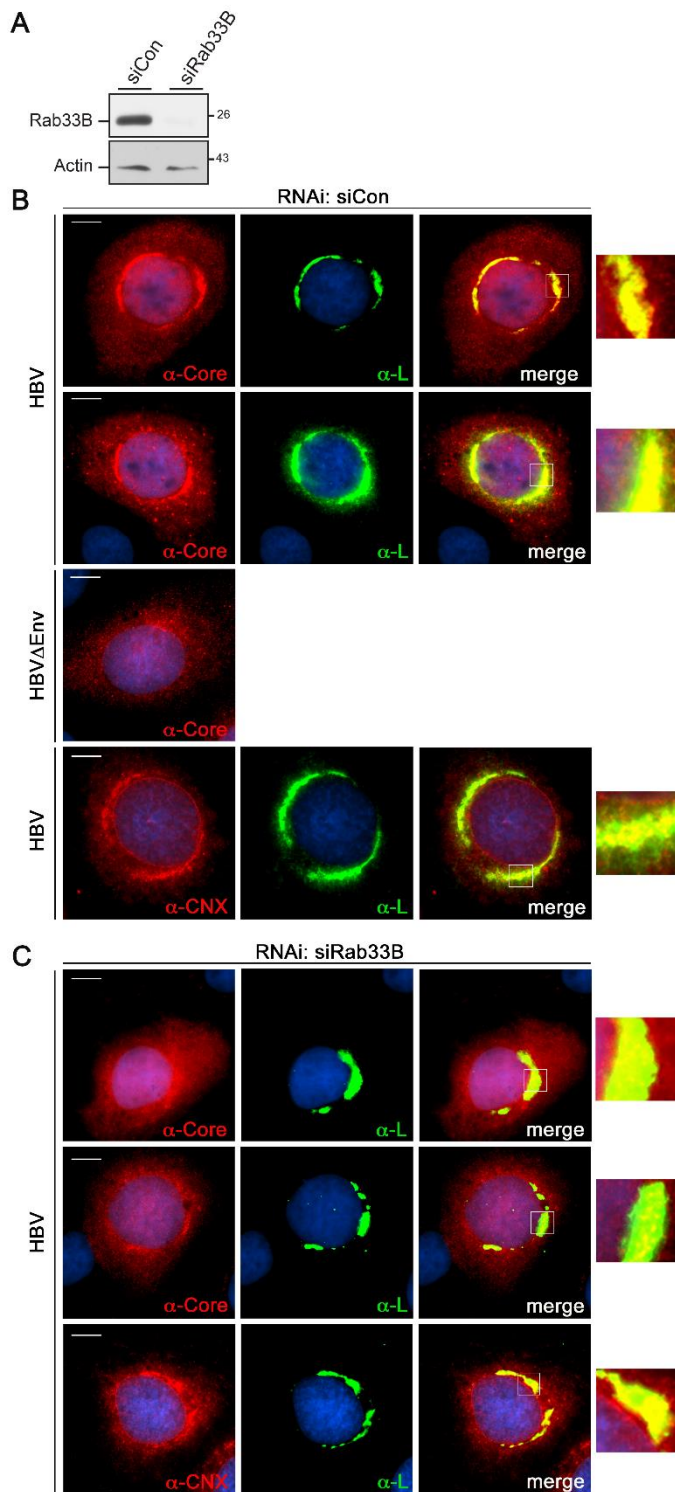


Abb. 37 Effekte der Depletion von Rab33B auf die intrazelluläre Verteilung der HBV-Proteine

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA und dem siRNA Pool gegen Rab33B (siRab33B) für 48 h depletiert. Dann wurden die Zellen mit dem HBV-Replikon oder dem HBV-Replikon Konstrukt defizient in der Expression von Hüllproteinen (HBV Δ Env) für weitere 48 h transfiziert. **(A)** Zur Depletionskontrolle wurden Zellen mit 1x Laemmli-Probenpuffer lysiert und im WB mit spezifischem Antikörper gegen Rab33B analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. **(B, C)** Für die IF-Analyse wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen Core (Dako), L (MA18/7) und Calnexin (CNX), bevor sie mit Alexa-Fluor 546-konjugierten und Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundär-Antikörpern gefärbt wurden. Die Core- und CNX-Färbung sind in rot, die L-Färbung in grün und die Zellkern-Färbung in blau dargestellt. Maßstabsbalken: 10 μ m. In den Mischbildern (*merge*) sind Kästchen angezeigt, welche in Vergrößerung ganz rechts abgebildet sind. Verändert nach: Bartusch *et al.*, 2017.

3.2.4.10 Rab33B und GAPs: OATL1-Inaktivierung begünstigt die Reifung und Ausschleusung von HBV

Rab-Proteine werden von GTP-Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert und von GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) inaktiviert (Stenmark, 2009). Itoh *et al.* (2011) entschlüsselten OATL1 (*ornithine aminotransferase-like 1*)/TBC1D25, weiterhin als OATL1 bezeichnet, als GAP von Rab33B. Eine mögliche Rolle von OATL1 sollte in Bezug auf die HBV-Morphogenese mit Knockdown-Experimenten näher geklärt werden. Um zunächst die Depletionseffizienz von siOATL1 zu bestätigen, wurden siCon- und OATL1-depletierte HuH-7 Zellen nach 72 h mit TRIzol aufgeschlossen, um die RNA zu extrahieren. Nach Umschreibung der RNA in cDNA, erfolgte die Quantifizierung von OATL1-Transkripten mittels SYBR Green-basierter qPCR. Abb. 38 zeigt, dass die verwendete siOATL1 die Expression von OATL1 um 55% reduzierte.

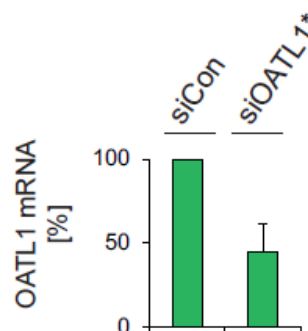


Abb. 38 Depletion von OATL1, ein Rab33B-spezifisches GAP

HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder einer siRNA gegen OATL1 für 48 h behandelt. Danach erfolgte eine *mock*-Transfektion für weitere 72 h. Nächstfolgend wurde der Aufschluss der Zellen mit TRIzol, die Isolierung der RNA, die Umschreibung in cDNA und die quantitative Analyse mittels SYBR Green-basierter qPCR durchgeführt. Als Referenz diente das Haushaltsgen β -Aktin. Die Menge an OATL1-Transkripten wurde durch die $\Delta\Delta C_t$ -Wert Methode errechnet und die Ergebnisse sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$), die in Duplikaten gemessen wurden. (*: single siRNA).

Daraufhin wurden HuH-7 Zellen mit Kontroll siRNA oder der siRNA gegen OATL1 für depletiert und anschließend mit dem HBV-Replikon re-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte nach dem Standardprotokoll (3.2.1). Wie in Abb. 39A zu erkennen ist, war die Nukleokapsid-Bildung und die Virionen-Ausschleusung nach Inaktivierung von OATL1 deutlich erhöht. Bei der Inspektion der intrazellulären Proteinmengen waren im Vergleich zu den Kontrollzellen ebenfalls gesteigerte

Mengen an L und Core zu beobachten.

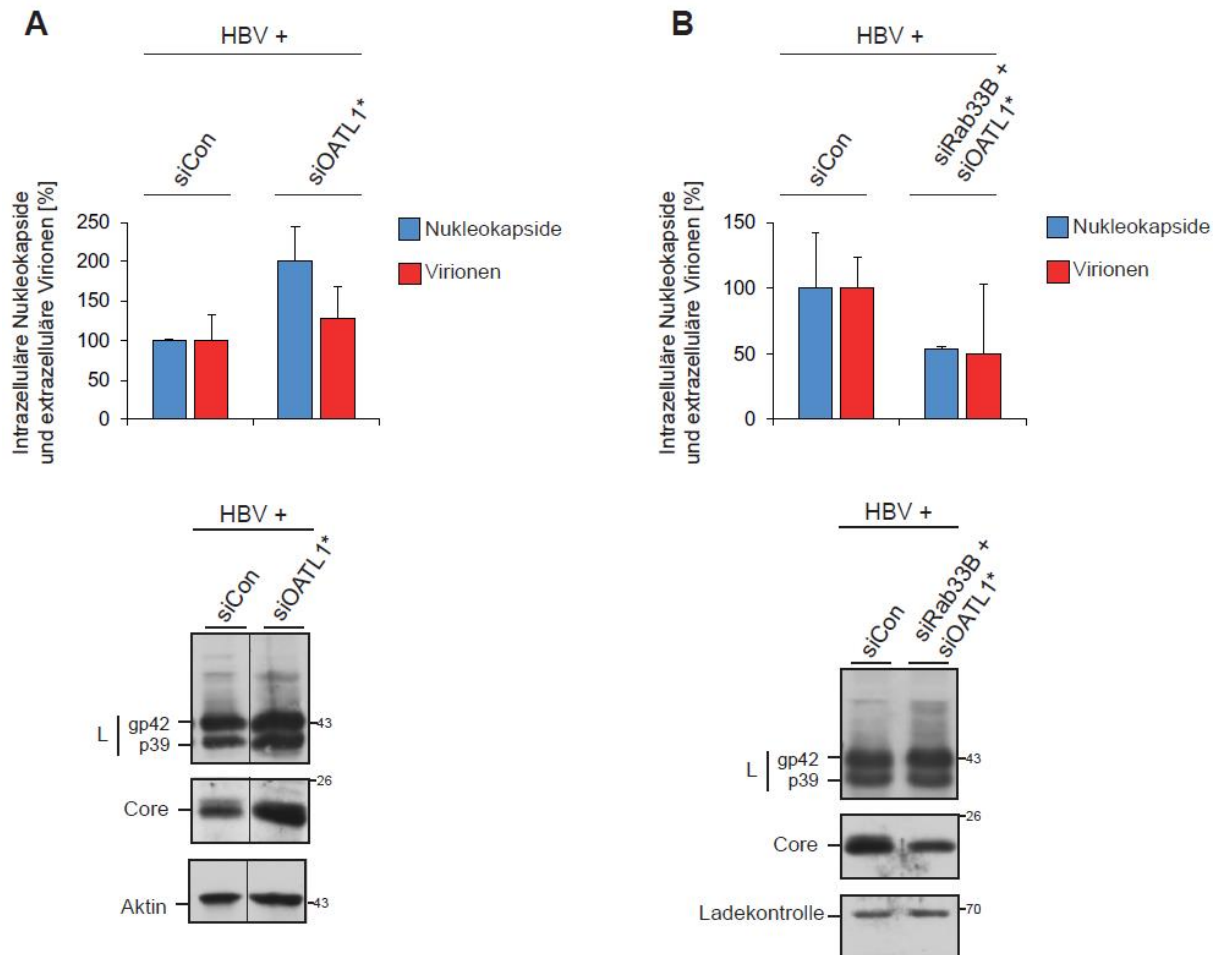


Abb. 39 Effekte der OATL1-Depletion und der OATL1/Rab33B-Ko-Depletion die Reifung und Ausschleusung von HBV

(A) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder der siRNA gegen OATL1 depletiert. Danach erfolgte die Re-Transfektion mit dem HBV-Replikon. (B) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon) oder dem siRNA Pool gegen Rab33B und der siRNA gegen OATL1 depletiert. Danach erfolgte die Re-Transfektion mit dem HBV-Replikon. (A,B) Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte wie oben beschrieben (Abb. 19). (A,B oben) Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 2$). (A,B unten) Die Synthese der HBV-Proteine im WB mit Core- und L-spezifischen Antikörpern untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (A) oder eine unspezifische Bande eines Antikörpers (B). (*: *single* siRNA).

Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich eine Ko-Depletion von Rab33B und OATL1 auf die HBV-Morphogenese auswirkt. Folglich wurden HuH-7 mit Kontroll siRNA oder dem siRNA Pool gegen Rab33B und der siRNA gegen OATL1 depletiert und mit dem HBV-Replikon re-transfiziert. Die Zellen wurden 72 h später, wie oben beschrieben (3.2.1), aufgearbeitet. Die Analyse der qPCR ergab, dass die Menge an intrazellulären Nukleokapsiden und an ausgeschleusten Virionen im Vergleich zu den

Kontrollzellen um etwa die Hälfte reduziert waren. Demnach führte die Ko-Depletion zu einem gegenteiligen Effekt im Vergleich zu dem Knockdown von OATL1, erreichte allerdings nicht die Stärke der alleinigen Rab33B-Depletion. Zusätzlich wurden die Zelllysate im WB auf Expressionsstärke und Stabilität der HBV-Proteine untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollzellen blieb L unverändert und die Menge an Core war reduziert.

Die erhöhte Bildung von Nukleokapsiden und Ausschleusung von Virionen ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass Rab33B länger in seiner GTP-gebundenen, aktiven Form vorliegt, weil es durch die fehlende/ausgeschaltete GAP-Funktion von OATL1 nicht inaktiviert werden kann.

3.2.4.11 Rab33B blockiert auch die Ausschleusung von HBV-Nukleokapsiden

Die ESCRT-Maschinerie wird von einer Vielzahl an Viren während ihrer Morphogenese ausgenutzt. Kürzlich fand man im Kontext mit HBV heraus, dass das Expressionsniveau der ESCRT-0-Untereinheit HRS Einfluss auf die HBV-Replikation und die Ausschleusung von HBV-Nukleokapsiden nimmt (Chou *et al.*, 2015). Es sollte nun untersucht werden, ob und inwieweit die Depletion von Rab33B die Ausschleusung von Nukleokapsiden beeinflusst. HuH-7 Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA oder dem siRNA Pool gegen Rab33B oder einer siRNA gegen HRS depletiert und mit dem HBV-Replikon re-transfiziert. Die Aufarbeitung der Zellen und Überstände erfolgte wie oben beschrieben (3.2.1). Abweichend vom Standardprotokoll wurde zur Quantifizierung der Synthese und Ausschleusung von HBV-Nukleokapsiden in Zelllysaten und Überständen eine Kapsid-spezifische IP durchgeführt. In Rab33B-depletierten Zellen nahm die Menge an Nukleokapsiden sowohl intra- als auch extrazellulär stark ab (Abb. 40A, oben). Nach dem Knockdown von HRS wurden vermehrt Nukleokapside ausgeschleust, während die Menge der intrazellulären Nukleokapside, wie bei Rab33B, vermindert war. Die Depletionseffizienz der verwendeten siRNA gegen HRS konnte im WB bestätigt werden (Abb. 40B). Zusätzlich wurden die Zelllysate auf Expressionsstärke und Stabilität der HBV-Proteine untersucht. Die Expression von L war in Rab33B-depletierten Zellen unbeeinflusst und im Falle von der HRS-Inaktivierung im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert (Abb. 40A, unten). Die Menge an Core war in allen Knockdown-Zellen merklich verringert

(Abb. 40A, unten). Laut Chou *et al.* (2015) beeinflusst der Knockdown von HRS die HBV-Replikation negativ, wodurch die Synthese von Core und L beeinflusst wird. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die verminderte Core/L-Protein Menge. Die intrazelluläre Nukleokapsidmenge war nach Rab33B-Knockdown vermindert, wie es in bereits erwähnten Experimenten ebenfalls schon öfters beobachtet wurde. Im Gegensatz zu HRS war allerdings kein gesteigerter Nukleokapsid-Export erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass die Rab33B-Depletion zur Blockierung der Bildung und folglich auch zur Blockierung der Ausschleusung von Nukleokapsiden führt.

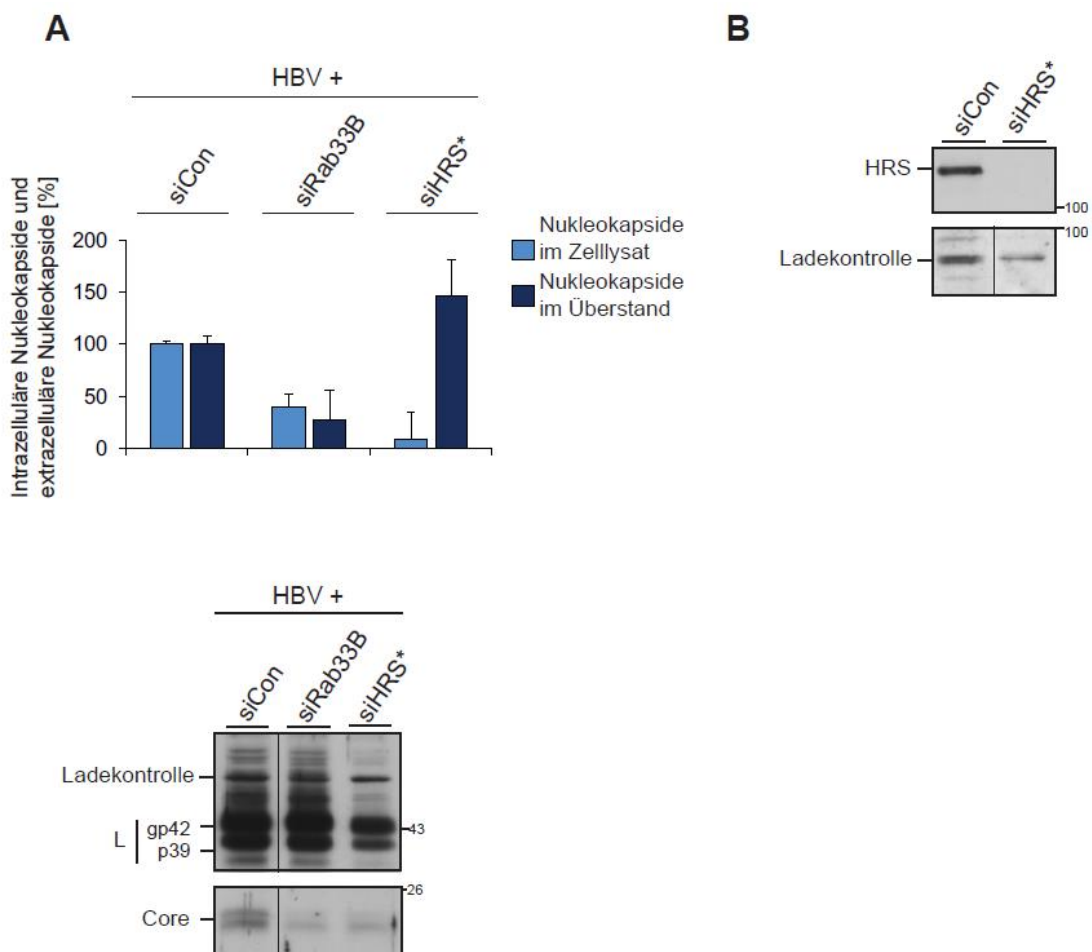


Abb. 40 Effekt der Rab33B-Depletion auf die Bildung und Ausschleusung von HBV-Nukleokapsiden

(A) HuH-7 Zellen wurden mit Kontroll siRNA (siCon), dem siRNA Pool gegen Rab33B oder einem siRNA Pool gegen HRS depletiert und mit einem HBV-Replikon re-transfiziert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit 0,2% Triton-Lysepuffer. Intrazelluläre Nukleokapside (Zelllysate) und extrazelluläre Nukleokapside (Überstand) wurden durch eine Kapsid-spezifische IP gefällt, gefolgt von der Isolierung viraler DNA und anschließender Quantifizierung der Menge an Nukleokapsiden durch qPCR. Die Ergebnisse der qPCR sind in Prozent relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten gemessen ($n = 2$). Die Synthese der HBV-Proteine wurde mit Core- und L-spezifischen Antikörpern im WB analysiert. Als Ladekontrolle diente eine unspezifische Bande des L-Antikörpers. (B) Die Effizienz der HRS-Depletion wurde mit einem HRS-spezifischem Antikörper bestimmt. (*: single siRNA).

4 Diskussion

Viren manipulieren intrazelluläre Wirtsfaktoren zu ihrem Nutzen und erreichen so trotz eines limitierenden Genoms eine sehr effiziente Replikation und Verbreitung. In der vorliegenden Arbeit wurden Virus-Wirt-Interaktionen von MLV und HBV näher beleuchtet. Das Retrovirus MLV stellt aufgrund der Einfachheit seines Genoms ein modellhaftes System zur Analyse von beteiligten ESCRT-Komplexen dar, die bei vielen Viren die Virionen-Abschnürung katalysieren. Daneben wurde die Abhängigkeit der HBV-Morphogenese von Rab GTPasen untersucht, ein Protein-Netzwerk, das den intrazellulären Vesikeltransport reguliert.

4.1 MLV-Morphogenese: Abhängigkeit von Tsg101, CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B

MLV kann über *late*-Domänen des Gag-Polyproteins mit spezifischen ESCRT-Proteinen oder ESCRT-assoziierten Proteinen interagieren und erhält dadurch Zugang zur ESCRT-Maschinerie (Martin-Serrano *et al.*, 2005; Rauch & Martin-Serrano, 2011). Es sind drei *late*-Domänen im MLV Gag-Polyprotein beschrieben und charakterisiert: PSAP, LYPAL und PPPY (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). Das PPPY-Motiv ist dabei für den viralen Export essentiell, wobei die PSAP- und LYPAL-Motive untergeordnete Rollen besitzen (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008). Die Analyse verschiedener Gag-Polyproteine und deren *late*-Domänen ergab, dass drei zelluläre Proteine direkt mit den Tetrapeptidmotiven interagieren können: Tsg101 (PSAP), Alix (LYPAL) und HECT Ubiquitin-Ligasen (PPPY) (Demirov & Freed, 2004; Votteler & Sundquist, 2013). Da Gag-Polyproteine allein ausreichend sind, um VLPs zu bilden und auszuschleusen (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011), wurde die Interaktion zwischen *late*-Domänen und zellulären Wirtsfaktoren häufig im Kontext der VLP-Biogenese untersucht. Segura-Morales *et al.* (2005) konnten zeigen, dass das MLV Gag-Polyprotein während der VLP-Biogenese mit allen drei zellulären Proteinen Tsg101, Alix und Nedd4 interagiert. In einer weiteren Studie wurde für die Ausschleusung von VLPs eine Notwendigkeit für Tsg101, CHMP2A und CHMP4B und eine Beteiligung von Alix beschrieben (Bartusch, 2014; Bartusch & Prange, 2016). In der vorliegenden Arbeit sollten nun die Anforderungen der MLV Virionen-

Morphogenese an die ESCRT-Maschinerie untersucht werden.

Bedenkt man die Bedeutung der PPPY-Domäne für den Virionen-Export (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008), war die moderate Reduktion in Ned4-1-depletierten Zellen überraschend (siehe Abb. 10). Eine andere Studie konnte allerdings zeigen, dass die PPPY-vermittelte MLV-Ausschleusung von Itch, einer weiteren HECT Ubiquitin-Ligase, abhängt (Jadwin *et al.*, 2010). Itch kann über ART-Adaptorproteine mit ESCRT-Komponenten in Kontakt treten (Rauch & Martin-Serrano, 2011). Daher könnte der Ausfall von Ned4-1 von anderen HECT Ubiquitin-Ligasen funktionell kompensiert werden. Die Depletion von Alix hatte kaum Auswirkungen auf den Export viraler Partikel, was möglicherweise an der untergeordneten Rolle der LYPAL-Domäne liegen könnte. In Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit führte der Knockdown der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101 zu einer starken Blockierung der Virionen-Ausschleusung (Segura-Morales *et al.*, 2005). In Hinblick auf das untergeordnete PSAP-Motiv könnte Tsg101 eine wichtigere Rolle in der PPPY-vermittelten Ausschleusung spielen, da HECT Ubiquitin-Ligasen über ART-Proteine mit Tsg101 interagieren und so die ESCRT-Kaskade aktivieren können (Rauch & Martin-Serrano, 2011).

Der Knockdown von ESCRT-II-Untereinheiten hatte keinen Effekt auf die Bildung oder die Ausschleusung von MLV-Virionen. Die Viren ASV und HBV, die lediglich eine PPXY-*late*-Domäne enthalten, sind dagegen auf ESCRT-II-Funktionen angewiesen (Pincetic *et al.*, 2008; Stieler & Prange, 2014). Möglicherweise wird ESCRT-II bevorzugt genutzt, wenn nur PPXY-Motive vorhanden sind. Bei der Anwesenheit anderer *late*-Domänen, wie bei MLV, ist diese Funktion vermutlich außer Kraft. In der klassischen ESCRT-Kaskade rekrutiert und bindet die ESCRT-II-Untereinheit EAP45 die ESCRT-III-Komponente CHMP6 (Teo *et al.*, 2004; Yorikawa *et al.*, 2005). In dem RNAi-vermittelten Screen wurde deutlich, dass CHMP6 ebenfalls für die MLV-Morphogenese nicht essentiell war und unterstreicht dadurch die ESCRT-II-Unabhängigkeit. Es verbleibt die zentrale Frage, wie dann die Vernetzung von Tsg101/ESCRT-I zu ESCRT-III/VPS4 bewerkstelligt wird, um die Virionen-Abschnürung zu katalysieren. Dieses Phänomen wurde schon bei HIV-1 diskutiert, wo das HIV-1 Gag-Polyprotein über das P(T/S)AP-Motiv mit Tsg101 interagiert und

ebenfalls weder ESCRT-II noch CHMP6 benötigt wird (Langelier *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2011). In diesem Fall scheint Tsg101/ESCRT-I die ESCRT-III-Untereinheit CHMP4 über undefinierte Protein-Protein- oder Protein-Membran-Interaktionen zu rekrutieren (Morita *et al.*, 2011). Es existieren noch weitere Fälle, in denen ESCRT-II/CHMP6 nicht benötigt werden und keine klassische ESCRT-Kaskade abläuft: Im Prozess der Zytokinese oder der Plasmamembran-Reparatur interagiert Alix direkt mit ESCRT-III und katalysiert die Membranabschnürung (Carlton & Martin-Serrano, 2007; Morita *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2014). Die Herunterregulation von MHC-Klasse-I-Proteinen, die als Folge von bestimmten Virusinfektionen ubiquitiniert werden, funktioniert über die Interaktion von HD-PTP (*histidine domain phosphotyrosine phosphatase*) mit den ESCRT-III-Komponenten CHMP4B, CHMP2A und CHMP3 (Parkinson *et al.*, 2015). Bro1-Proteine, wie Alix oder HD-PTP, können die ESCRT-III-Untereinheiten CHMP4 und CHMP5 direkt rekrutieren, selbst in Abwesenheit von ESCRT-II und CHMP6 (McCullough *et al.*, 2013).

ESCRT-III besteht aus den vier „Kern“-Untereinheiten CHMP6, CHMP4(A-C), CHMP3 und CHMP2(A,B), die während der MVB-Biogenese auch in der angegebenen Reihenfolge rekrutiert werden (Peel *et al.*, 2011). Bei der Untersuchung zur Rolle des ESCRT-III-Komplexes in der MLV-Morphogenese hatten die Knockdowns von CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B einen sehr prominenten Phänotyp. In allen drei Fällen war die Virionen-Ausschleusung stark inhibiert und die jeweiligen Isoformen CHMP1B, CHMP2B und CHMP4A konnten den Ausfall ihres Gegenspielers nicht kompensieren. Die CHMP4B-Untereinheit kommt im Vergleich zu anderen ESCRT-III-Proteinen in einem höheren stöchiometrischen Verhältnis vor (Carlson & Hurley, 2012), was für eine übergeordnete Funktion spricht. CHMP4B bindet bevorzugt Alix, welches als Adaptorprotein zwischen dem MLV Gag-Polyprotein und der ESCRT-Maschinerie fungiert (Kato *et al.*, 2004). Bei den CHMP2-Proteinen gibt es Unterschiede zwischen den beiden Isoformen bezüglich der Bindung zu CHMP3 und der Rekrutierung von VPS4. VPS4 ist für den Abbau der ESCRT-Komplexe und deren Recycling unbedingt notwendig (Shestakova *et al.*, 2010; Peel *et al.*, 2011; McCullough *et al.*, 2013). Im Kontext von HIV-1 ist der Synergieeffekt der CHMP3-CHMP2A-Komplexbildung in der Abschnürungsreaktion besser als bei dem CHMP3-CHMP2B-Komplex (Effantin *et al.*, 2013). Die CHMP1-3-Proteine besitzen konservierte MIM

(*MIT-interacting motifs*)-Motive, die mit der MIT (*microtubule-interacting and transport*)-Domäne von VPS4 interagieren können (Stuchell-Brereton *et al.*, 2007). Das Hefe-Ortholog von CHMP2, Vps2, zeigte die höchste Affinität für VPS4 (Wollert *et al.*, 2009). Außerdem bindet CHMP2A das VPS4-Regulatorprotein LIP5 (*Lyst-interacting protein 5*), wodurch die VPS4 Oligomerisierung und dessen Aktivität gesteigert werden (Shim *et al.*, 2008). Damit besteht eine weitere wichtige Funktion von CHMP2A in der Rekrutierung und Regulierung von VPS4 und könnte erklären, warum MLV bevorzugt diese CHMP2 Isoform nutzt.

Weiterführend wurden auch ESCRT-III assoziierte, regulatorische Proteine, wie CHMP1(A,B) und CHMP5, untersucht. Der Knockdown von CHMP5 hatte keinen Effekt auf die MLV-Morphogenese. Eine Studie deckte die Interaktion von LIP5 mit CHMP5 auf, welche zu einer Inhibierung der LIP5-vermittelten VPS4-Stimulierung führt (Vild *et al.*, 2015). Eine Manipulation von CHMP5 durch MLV wäre daher kontraproduktiv für das Virus. Der CHMP1A-Knockdown führte zu einer Blockierung der Virionen-Ausschleusung, der Gag- und Gag/Pol-Polyprotein Prozessierung und folglich auch der Infektiosität. Bei der subzellulären IF-Analyse äußerte sich der Phänotyp CHMP1A-depletierter Zellen in einer verminderten Gag-Akkumulation in der Zellperipherie, wo sich eigentlich MLV-Virionen im finalen Knospungsstadium befinden. Die Isoform CHMP1B war nicht in der Lage, die CHMP1A-Inaktivierung zu kompensieren. Dies könnte damit zusammenhängen, dass CHMP1A posttranslational durch Phosphorylierung und Sumoylierung modifiziert werden kann (Maemoto *et al.*, 2013; Park, 2015), wodurch ein Protein weitere regulatorische Funktionen gewinnt. Zusätzlich enthält CHMP1A eine putatives Ubiquitin-Interaktions-Motiv (UIM), welches bisher bei keinem anderen ESCRT-III-Protein beschrieben wurde (Park, 2015). Ein Beispiel für eine posttranslationale Modifikation eines ESCRT-III-Proteins mit ESCRT-unabhängiger, regulatorischer Funktion ist CHMP4C. Von allen drei Isoformen kann nur CHMP4C von der Aurorakinase B phosphoryliert werden, wodurch der Zeitpunkt der Abschnürung während der Zellteilung reguliert wird (Carlton *et al.*, 2012). Die exakte Funktionsweise von CHMP1A bezüglich der MLV-Morphogenese konnte noch nicht vollständig entschlüsselt werden. Allerdings ist anzunehmen, dass CHMP1A eine Adaptor-ähnliche Rolle im Transport von Gag- und Gag/Pol-Polyproteinen zum Sprossungsort übernimmt, wo die virale Protease (PR) ins Spiel kommt. Die virale PR

übernimmt dabei die Funktion der Spaltung des Gag- und Gag/Pol-Polyproteins, was zur Reifung führt und Voraussetzung für eine Neu-Infektion ist (Houzet *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Rein, 2011). Es wurde bisher angenommen, dass die Reifung der MLV-Virionen erst nach der Freisetzung beginnt (Oshima *et al.*, 2004), allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit intrazelluläre Gag-Spaltprodukte nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.5). Bei dem Reifungsprozess von HIV-1 wurde ebenfalls beschrieben, dass die Spaltung während des Knospungsprozesses beginnen kann (Sundquist & Krausslich, 2012; Freed, 2015). Es ist daher möglich, dass die proteolytische Spaltung der MLV Gag- und Gag/Pol-Polyproteine bereits begleitend mit der Knospung startet. CHMP1A könnte somit in der Prozessierung involviert sein, was eine neue, ESCRT-unabhängige Funktion des Proteins beschreiben würde. Des Weiteren ist erwähnenswert, dass CHMP1A nur in der Morphogenese von Virionen, nicht aber bei VLPs, benötigt wird. Die Expression des Gag-Polyproteins ist für die Bildung und Ausschleusung von VLPs ausreichend (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). VLPs enthalten weder die viralen Enzyme noch die viralen Hüllproteine und stellen somit keine infektiösen Partikel dar. Die mögliche CHMP1A-vermittelte Transportfunktion des Gag-Polyproteins zum Sprossungsort/viralen PR ist daher in der VLP-Morphogenese hinfällig und erklärt die Entbehrlichkeit von CHMP1A.

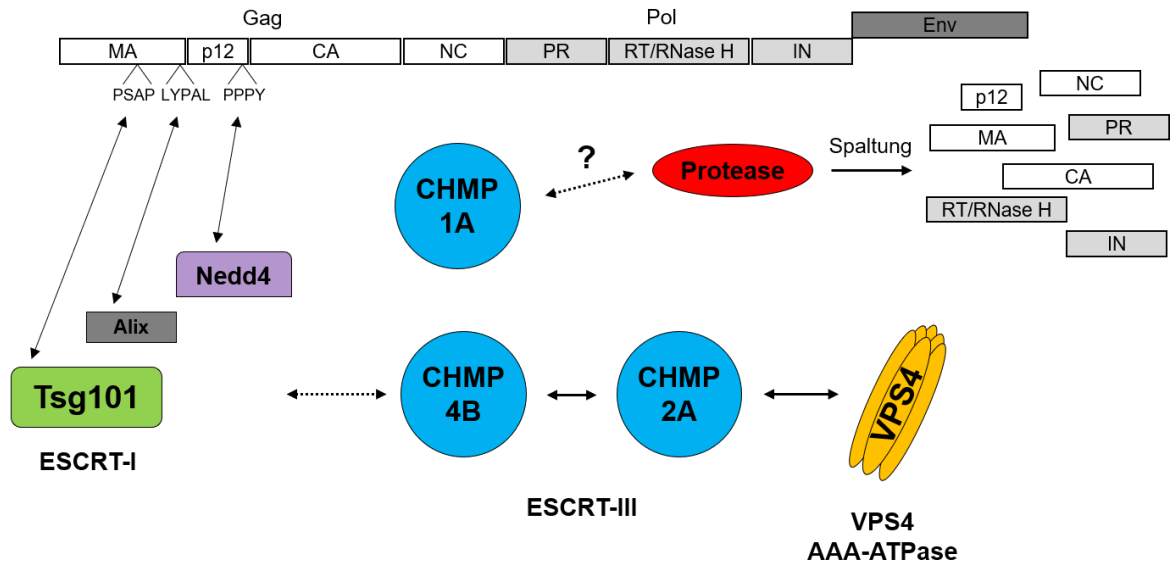
Die Notwendigkeit der ESCRT-III-Komplexe CHMP4B und CHMP2A besteht nicht nur in der MLV-Morphogenese, sondern konnte bereits für andere Viren beschrieben werden. In der viralen Partikel-ausschleusung von HIV-1 und EIAV sind CHMP4 und CHMP2 essentiell, mit der Präferenz für CHMP4B und CHMP2A (Morita *et al.*, 2011; Sandrin & Sundquist, 2013). Man nimmt an, dass sich CHMP4 zunächst an der Membran-Einschnürung des knospenden Virions ansammelt, wo es dann mit CHMP2 interagiert und es durch Rekrutierung der VPS4 zur Virion-Abschnürung kommt (Morita *et al.*, 2011; Sandrin & Sundquist, 2013). In Übereinstimmung mit den bei MLV gewonnenen Erkenntnissen sind CHMP5 und CHMP6 auch für die HIV-1-Morphogenese entbehrlich (Ward *et al.*, 2005; Langelier *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2011). Obwohl die Notwendigkeit der meisten ESCRT-Komponenten bei HIV-1, EIAV und MLV übereinstimmen, existieren dennoch Unterschiede in der Nutzung anderer ESCRT-Proteine. EIAV ist nicht auf CHMP3 angewiesen (Sandrin & Sundquist, 2013), während es im Falle von HIV-1 und MLV-VLPs an der Morphogenese beteiligt ist

(Morita *et al.*, 2011; Bartusch, 2014). In der Bildung und Ausschleusung von HIV-1 kommt CHMP1B eine unterstützende Bedeutung zu (Morita *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte dagegen eine besondere Rolle von CHMP1A für die MLV-Morphogenese festgestellt werden. Eine kürzliche Studie konnte auch für HCV eine Abhängigkeit von den ESCRT-III-Komponenten CHMP1A und CHMP4B und für das ESCRT-0-Protein HRS während der Sprossung an intrazellulären Membranen zeigen, während Alix für die Ausschleusung der Virionen essentiell ist (Barouch-Bentov *et al.*, 2016).

4.1.1 MLV-Morphogenese: Modell

Die MLV-Morphogenese ist von der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101 und den ESCRT-III-Untereinheiten CHMP1A, CHMP2A und CHMP4B abhängig. Zusätzlich wird das Adaptorprotein Nedd4-1 benötigt. Die exakte Rolle von CHMP1A konnte noch nicht vollständig entschlüsselt werden, aber meine Daten deuten an, dass CHMP1A eine neue, ESCRT-unabhängige Funktion im Transport von Gag- und Gag/Pol-Polyproteine zum Ort der Sprossung/viralen PR einnimmt. Abb. 41 zeigt die Ergebnisse und stellt diese in Bezug zur VLP-Morphogenese. Bei der VLP-Morphogenese werden die ESCRT-Komponenten Tsg101, CHMP2A und CHMP4B und das Adaptorprotein Alix benötigt (Bartusch, 2014; Bartusch & Prange, 2016). Damit konnte gezeigt werden, dass die Anforderungen an die ESCRT-Maschinerie zwischen MLV-Virionen und -VLPs unterschiedlich sind.

Morphogenese von MLV



Morphogenese von MLV-VLPs

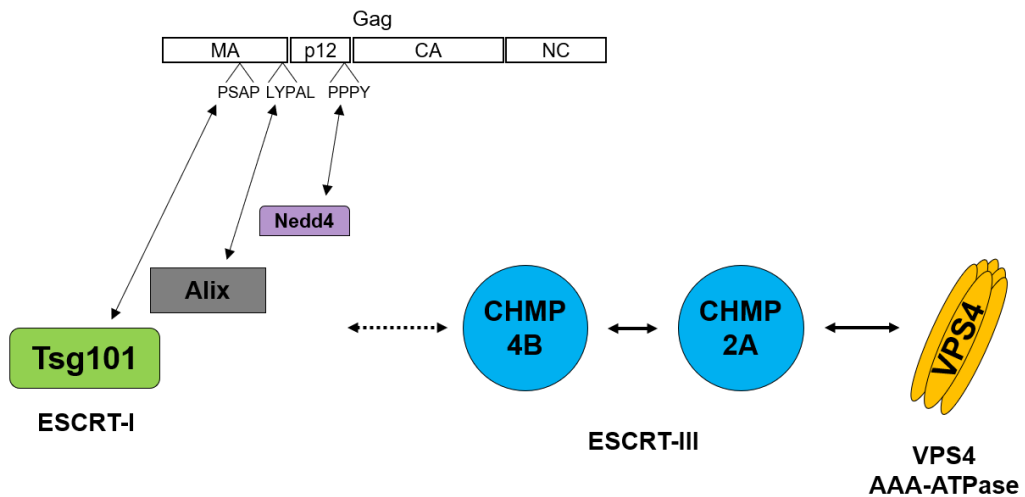


Abb. 41 MLV Virionen- und VLP-Morphogenese: Die Beteiligung von ESCRT-Komponenten

Dargestellt sind die gemeinsamen und unterschiedlichen Anforderungen an ESCRT-Faktoren während der Bildung und Ausschleusung von MLV-Virionen und -VLPs. MA: Matrix, CA: Kapsid, NC: Nukleokapsid, PR: Protease, RT: Reverse Transkriptase, IN: Integrase. Verändert nach: Bartusch & Prange, 2016.

4.2 HBV-Morphogenese: Die Rollen der Rab GTPasen Rab1A, Rab18, Rab34, Rab6A und Rab33B

Rab-Proteine regulieren den Membrantransport und sind für Vesikelknospung, -transport und -fusion verantwortlich. Die Identifikation neuer zellulärer Wirtsfaktoren in der HBV-Morphogenese sollte zum besseren Verständnis der Transportwege der viralen Komponenten zwischen Synthese, Knospung und/oder Ausschleusung beitragen.

4.2.1 Rab1A ist an der Bildung von Nukleokapsiden beteiligt

In Rab1A-depletierten Zellen war sowohl eine Reduktion in der Bildung von Nukleokapsiden als auch im Export von Virionen zu beobachten. Die Überexpression von Rab1A.DN konnte diesen Phänotyp nicht im gleichen Maß bestätigen, möglicherweise durch funktionelle Kompensationseffekte der verwandten Rab1B Isoform. Das Überexpressions-Experiment lieferte allerdings den Hinweis, dass HBV auf katalytisch-aktives Rab1A angewiesen ist.

Die Funktion von Rab1A besteht in der Regulation des anterograden Transports vom ER zum Golgi-Komplex (Haas *et al.*, 2007). Bei einigen Viren zählt Rab1A bereits zu einem proviralen zellulären Wirtsfaktor, wie im Falle von HIV, HCV, HSV-1 und Vacciniavirus (VACV) (Pechenick Jowers *et al.*, 2015). Die viralen Hüllproteine von HIV und HSV-1 sind auf einen Rab1A-vermittelten anterograden Transport angewiesen, der u.a. für ihre weitere Modifikationen im Golgi essentiell ist (Zenner *et al.*, 2011; Nachmias *et al.*, 2012). Während der Replikation von HCV spielen Rab1A und sein GAP-Protein TBC1D20 eine wichtige Rolle beruhend auf der Interaktion mit dem viralen Protein NS5A (*nonstructural protein 5A*), wodurch die Bildung von Lipidtropfen gefördert wird (Sklan *et al.*, 2007; Nevo-Yassaf *et al.*, 2012). VACV missbraucht Rab1A zur Umhüllung der intrazellulären, unreifen Virionen (Pechenick Jowers *et al.*, 2015). Die Sekretion des HBV S-Hüllproteins war nach der Inaktivierung von Rab1A allerdings nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), wodurch eine Funktion im Transport der HBV-Hüllproteine unwahrscheinlich erscheint.

Neben der ER/Golgi-Homöostase wurde Rab1A eine weitere Rolle in der Bildung und

Elongation von autophagosomalen Membranen zugesprochen (Zoppino *et al.*, 2010; Bento *et al.*, 2013). Rab1A und sein Effektorprotein C9orf72 sind für die Translokation des ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*)-Iniitiationskomplexes zur Phagophore verantwortlich, wodurch die Autophagie-Maschinerie initiiert wird (Webster *et al.*, 2016). Rab1A könnte zusammen mit Rab33B Membranplattformen für die Nukleokapsid-Bildung von HBV formen (siehe Kapitel 4.2.5).

4.2.2 Rab18 ist am Transport von Hüllproteinen und/oder Core/Nukleokapsiden zum Syntheseort/Sprossungsort beteiligt

Die Depletion von Rab18 führte ebenso zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären Nukleokapside und extrazellulärer Virionen. Die Überexpression des Rab18.DN-Proteins spiegelte den Knockdown-Phänotyp im gleichen Maß wieder, woraus geschlossen werden konnte, dass HBV katalytisch-aktives Rab18 benötigt. Allerdings war die Expression/Stabilität der HBV-Proteine nach der Inaktivierung von Rab18 beeinträchtigt.

Rab18 reguliert den Membrantransport zwischen dem ER und dem Golgi-Komplex (Dejgaard *et al.*, 2008). Die HBV-Hüllproteine werden zunächst ko-translational in das ER integriert und dort glykosyliert (Prange, 2012). Die kovalent gebundenen *N*-Glykane werden dann durch Enzyme im ER und Golgi weiter modifiziert (Julithe *et al.*, 2014). Die *N*-Glykosylierung und deren Modifikationen sind für die Sekretion von Virionen essentiell (X. Lu *et al.*, 1995, 1997; Lambert & Prange, 2007). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Rab18 einen reduzierten Export des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) zur Folge hatte (Dejgaard *et al.*, 2008). Rab18 könnte daher im Transport der HBV-Hüllproteine involviert sein.

Zusätzlich waren allerdings auch die intrazellulären Nukleokapside verringert, was entweder auf eine verringerte Stabilität der Nukleokapside durch das Ausbleiben der Sprossung oder auf eine weitere/andere Funktion von Rab18 in der Synthese von Nukleokapsiden hindeutet. Neben der Funktion im ER/Golgi-Transport, spielt Rab18 auch eine Rolle in der Biogenese von Lipidtropfen (Ozeki *et al.*, 2005). Lipidtropfen sind die größten Speicher für neutrale Lipide, entstehen aus dem ER und interagieren mit einer Vielzahl von Organellen, wie Endosomen oder dem ER, und intrazellulären

Pathogenen (Guo *et al.*, 2009). Bei HCV wurde bereits eine Notwendigkeit von Lipidtropfen für die Virusmorphogenese beschrieben. Die HCV-Replikation findet unter der Bildung von Replikationskomplexen am ER statt (Salloum *et al.*, 2013). Die Assoziation von HCV-Core mit zellulären Lipidtropfen nimmt Einfluss auf den Nukleokapsid- und Virionen-Zusammenbau (Shavinskaya *et al.*, 2007). Salloum *et al.* (2013) fanden heraus, dass Rab18 das virale NS5A-Protein von HCV bindet. Man vermutet, dass Rab18 die physische Interaktion zwischen Membranen des ERs und der Lipidtropfen fördert und dadurch Replikationskomplexe und andere virale Proteine für die Bildung von Nukleokapsiden und Virionen zusammenbringt (Salloum *et al.*, 2013). Eventuell könnte Rab18 während der HBV-Morphogenese eine ähnliche Rolle wie bei HCV bezüglich des Transportes von Core/Nukleokapsiden zum Synthese-/Knospungsort übernehmen. Das HBV X-Protein scheint zudem eine Akkumulation von Lipidtropfen zu induzieren (Na *et al.*, 2009).

Kürzlich wurde Rab18 als positiver Modulator der Makroautophagie beschrieben (Feldmann *et al.*, 2017). Ein Knockdown von Rab18 führte in der Studie zu einer verminderten Autophagie-Aktivität (Feldmann *et al.*, 2017). Da HBV die Autophagie-Maschinerie induziert (Tang *et al.*, 2009; Sir *et al.*, 2010; J. Li *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011), könnte Rab18 ein wichtiger Faktor in der Manipulation der Autophagie für HBV darstellen. Zu diesem Zweck könnte HBV die Expression von Rab18 hochregulieren, was in einer erhöhten Autophagie-Aktivität resultieren würde.

4.2.3 Rab34 ist an der Umhüllung von Nukleokapsiden beteiligt

Bei der Depletion von Rab34 kam es zu einer verminderten Ausschleusung von extrazellulären Virionen, während die Menge der intrazellulären Nukleokapside unverändert blieb. Die Überexpression der Rab34.DN-Mutante bestätigte den Knockdown-Phänotyp und deutete an, dass HBV GTP-beladenes, aktives Rab34 benötigt. Da die Bildung von Nukleokapsiden nicht beeinflusst war, spielt Rab34 offenbar erst in den späten Schritten der HBV-Morphogenese, wie der Umhüllung der Nukleokapside, eine Rolle.

Rab34 kontrolliert den Transport innerhalb des Golgi-Komplexes und ist in der MVB-Biogenese involviert (Goldenberg *et al.*, 2007). Das Effektprotein RILP (*Rab*-

interacting lysosomal protein) von Rab34 ist ein Schlüsselfaktor in der Regulation des späten endosomalen Transports (T. Wang & Hong, 2006). RILP kann mit den ESCRT-II-Untereinheiten EAP30 und EAP45 interagieren (T. Wang & Hong, 2006), wodurch ESCRT-III/VPS4 rekrutiert und die Abschnürung von ILVs katalysiert wird. Es ist bekannt, dass die Knospung und Ausschleusung von HBV von ESCRT-II und ESCRT-III/VPS4 abhängt (Kian Chua *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Prange, 2012; Stieler & Prange, 2014). In IF-Studien und Ko-IPs konnten zudem eine Interaktion von Core mit ESCRT-II nachgewiesen werden (Stieler & Prange, 2014). ESCRT-II scheint neben der klassischen ESCRT-Funktion auch eine Rolle in der Verpackung von pgRNA und Core-Dimeren in Nukleokapside zu spielen (Stieler & Prange, 2014). Somit könnte Rab34, zusammen mit dem Effektorprotein RILP und ESCRT-II, einen essentiellen Faktor in der Virionen-Abschnürung von HBV darstellen.

4.2.4 Rab6A reguliert den Transport von Nukleokapsiden zum Ort der Umhüllung

Die Inaktivierung von Rab6A führte zu einer gesteigerten Menge an intrazellulären Nukleokapsiden und einer starken Abnahme im Virionen-Export. Die Überexpression des Rab6A.DN-Proteins konnte den Knockdown-Phänotyp nicht in gleichem Maß bestätigen, zeigte aber eine ähnliche Tendenz. Nach der Etablierung eines *Rescue*-Protokolls war es darüber hinaus möglich den Phänotyp des Rab6A-Knockdowns umzukehren und dessen Spezifität zu bestätigen. Des Weiteren zeigten die *Rescue*-Analysen, dass HBV auf katalytisch-aktives Rab6A angewiesen ist, da die Re-Transfektion mit der DN-Mutante keine Wirkung hatte.

Rab6 lokalisiert hauptsächlich an Golgi- und TGN-Membranen und reguliert den retrograden Transport von Endosomen über den Golgi-Komplex zum ER (Starr *et al.*, 2010). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Rab6 in der Regulation des exozytotischen Vesikeltransports involviert ist, indem es Vesikel markiert, die über Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert werden sollen (Grigoriev *et al.*, 2007). Allerdings konnten Grigoriev *et al.* (2007) beobachten, dass Rab6 für den anterograden Transport nicht essentiell ist, sondern mehr für die Organisation des Vesikeltransports verantwortlich ist. Die Sekretion des VSV-G Proteins war in Rab6A-depletierten Zellen nämlich nur zeitverzögert, aber nicht inhibiert (Grigoriev *et al.*,

2007). Die Inaktivierung von Rab6A zeigte keine Änderung in der Synthese des HBV L-Proteins, im N-Glykosylierungsmuster der gp42-Form und in der subzellulären L-Lokalisation beim ER. Dies deutet darauf hin, dass Rab6A keinen Einfluss auf die viralen Hüllproteine nimmt. Die Nukleokapsid-Bildung scheint auch nicht beeinträchtigt zu sein, da intrazellulär sogar mehr Nukleokapside quantifiziert wurden und in der IF-Analyse ebenfalls kein Effekt auf die Kapsid-Bildung festgestellt werden konnte. Die Ko-Lokalisation von Core und L nahm allerdings nach Rab6A-Knockdown ab, was für eine Störung im Transportmechanismus spricht. Für HCMV konnte bereits eine Abhängigkeit für Rab6 und dessen Effektorprotein Bicaudal1 (BicD1) beschrieben werden. In der HCMV-Morphogenese hängt der Transport des Tegument-Proteins pp150 zum Assemblierungs-Kompartiment (*assembly compartment*, AC) von der Interaktion mit BicD1 ab (Indran *et al.*, 2010). Das AC befindet sich juxt nukleär und überlappt mit dem ERGIC (Alwine, 2012). Die Interaktion von Rab6 und BicD1 vermittelt den Transport von pp150 zum AC über einen Dynein- und Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus (Indran *et al.*, 2010). Möglicherweise spielt Rab6A im Falle der HBV-Morphogenese eine ähnliche Rolle im Transport von Nukleokapsiden zum Sprossungsort.

Auffällig war, dass Core neben der typischen ringförmigen, perinukleären Lokalisation zusätzlich in der Zellperipherie zu finden war. Zusätzlich deuteten WB-Analysen der Rab6A-depletierten Zellen auf eine erhöhte Core-Menge im Zelllysate hin. Die Gründe für den Fehltransport und die Akkumulation sind zu diesem Zeitpunkt unklar. Es ist bekannt, dass der Reifungsgrad der Nukleokapside bestimmt, ob diese umhüllt werden oder nicht (Blondot *et al.*, 2016). Die Genom-Reifung geht dabei mit einigen Strukturänderungen einher, die das Nukleokapsid destabilisieren (Cui *et al.*, 2013). Die Nukleokapsid-Reifung bei DHBV (*duck hepatitis B virus*) wird z.B. von einer starken Dephosphorylierung begleitet, wodurch es zur Exposition eines für die Sprossung kritischen Membranbindungs-Signal kommt (Mabit & Schaller, 2000). Im Falle der Rab6A-Depletion könnte die Blockierung des Transports von Nukleokapsiden zum Sprossungsort eventuell dazu führen, dass die destabilisierten, reifen Nukleokapside dem Zerfall ausgesetzt sind und möglicherweise fehltransportiert werden. Dadurch könnte sich die erhöhte und peripher-lokalisierte Core-Menge erklären lassen.

4.2.5 Rab33B reguliert den Transport von Core zum Syntheseort von Nukleokapsiden und/oder den Transport von Nukleokapsiden zum Sprossungsort

Die Inaktivierung von Rab33B führte zu einer starken Verringerung der extrazellulären Virionen und der intrazellulären Nukleokapside. Die Überexpression einer Rab33B.DN-Mutante bestätigte den Knockdown-Phänotyp. Diese Ergebnisse deuteten an, dass für die Bildung, den Transport und/oder die Freisetzung von HBV katalytisch-aktives Rab33B benötigt wird.

Da Rab33B den retrograden Transport vom Golgi zum ER reguliert (Starr *et al.*, 2010), wurde zunächst überprüft, ob der Ausfall von Rab33B die Golgi-Homöostase beeinflusst. Dabei diente das HBV S-Hüllprotein als Marker für den konstitutiven Sekretionsweg. Die Rab33B-Depletion hatte keinen Einfluss auf die Synthese subviraler HBV-Partikel (SVPs), das *N*-Glykosylierungsmuster von S und die Ausschleusung von SVPs. Zusätzlich konnte eine andere Studie belegen, dass der anterograde Transport des VSV-G in Rab33B-inaktivierten Zellen ebenfalls störungsfrei funktionierte (Starr *et al.*, 2010). Die Inspektion des HBV L-Proteins zeigte keine Änderung in der Synthese, im *N*-Glykosylierungsmuster der gp42-Form und in seiner subzellulären ER-Lokalisation in Rab33B-depletierten Zellen. Folglich scheint Rab33B nicht primär die HBV-Hüllproteine zu tangieren.

Der auffälligste Phänotyp bei der Inaktivierung von Rab33B bestand in der drastischen Verringerung der Proteinmengen von Core. Bei der Überprüfung, ob weiterhin ikosaedrische Kapside zusammengebaut werden, stellte sich heraus, dass in Rab33B-depletierten Zellen kaum Kapside vorlagen und deren Bildung/Stabilität offenbar beeinträchtigt war. Die Analyse der Effekte von Rab33B auf verschiedene virale Replikationsschritte ergab, dass die HBV-Transkription zwar unbeeinflusst blieb, aber wesentliche Störungen in der Synthese, dem Zusammenbau und/oder der Stabilität von Core/Kapsiden vorlagen. Die subzelluläre Lokalisation von Core in Rab33B-Knockdown Zellen änderte sich insofern, dass zum einen eine reduzierte Core-Menge zu beobachten war und zum anderen Core schwächer in typischen ringförmigen, perinukleären Strukturen akkumulierte. Zusammengefasst ergaben alle Beobachtungen, dass der Zusammenbau von Nukleokapsiden und/oder deren

Umhüllung blockiert waren. In der Konsequenz war die Ausschleusung von Virionen inhibiert.

Der Zusammenbau von Kapsiden galt lange als ein Prozess der spontanen Selbstzusammenlagerung, bei dem Core-Monomere eine starke Tendenz zeigen, erst Core-Dimere und weiterführend Kapside zu bilden (Nassal, 2008; Hu & Seeger, 2015; Zlotnick *et al.*, 2015). Jüngere Studien lassen vermuten, dass der Kapsid-Zusammenbau ein aktiver Prozess ist, der von zellulären Wirtsfaktoren katalysiert wird (Marreiros *et al.*, 2015). Chen *et al.* (2011) stellten fest, dass die zelluläre Serin-Arginin-Proteinkinase (SRPK) in Form eines molekularen Chaperons agiert. SRPK bindet dabei an die C-terminale Domäne (CTD) von Core, um die Selbstzusammenlagerung und die Verpackung unspezifischer RNA zu verhindern (Chen *et al.*, 2011). Durch Phosphorylierung der CTD kann der Kapsid-Zusammenbau dann wieder reaktiviert werden (Chen *et al.*, 2011). Die zelluläre Hitzeschockproteinfamilie 40 reguliert den Zusammenbau dagegen negativ, indem es das Core-Protein destabilisiert und degradiert (Sohn *et al.*, 2006). Außerdem kann der Kapsid-Zusammenbau durch chemische Komponenten, wie den Heteroaryldihydropyrimidinen (HAPs), beeinflusst werden. HAPs, wie Bay 41-4109, inhibieren den korrekten Zusammenbau von Nukleokapsiden, woraufhin das instabile Core durch proteasomalen Abbau degradiert wird (Deres *et al.*, 2003). Der Rab33B-Knockdown blockiert den Transport von Core/Kapsiden oder leitet ihn fehl, wodurch Core/Kapside nicht mehr für die Virionen-Produktion zugänglich sind und abgebaut werden können. Dies ähnelt dem HAP-induzierten Phänotyp und stellt Rab33B als möglichen Schlüsselfaktor für den korrekten Kapsid-Zusammenbau dar.

Neben der Regulierung der Golgi-Homöostase ist Rab33B auch an der Bildung von Autophagosomen beteiligt (Itoh *et al.*, 2008; Starr *et al.*, 2010). Die Autophagie-Maschinerie ist ein konservierter, katabolischer Mechanismus, um fehlerhafte oder aggregierte Proteine und Organellen im Lysosom zu degradieren (Kaur & Debnath, 2015). Es gibt drei verschiedene Autophagie-Maschinerien: die Mikroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie und die Makroautophagie, wobei die Makroautophagie die Hauptroute des Abbaus darstellt (Kaur & Debnath, 2015). Bei der Makroautophagie werden Proteine und Organellen zunächst von einer neu

gebildeten Doppelmembran (Phagophore) umschlossen (Kaur & Debnath, 2015). Das dabei entstehende Autophagosom fusioniert mit dem Lysosom zur Degradation (Kaur & Debnath, 2015). Mehrere spezifische Autophagie (Atg)-Proteine vermitteln die Bildung der Phagophore, das Verpacken der Frachtmoleküle, die Schließung der Phagophore und die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom (Geng & Klionsky, 2008; Shpilka *et al.*, 2011; Weidberg *et al.*, 2011). Der autophagosomale Komplex Atg5/12/16L1 initiiert die Bildung der Phagophore und fördert die Lipidierung und Membrankonjugation der LC3 (Atg8)-Proteinfamilie, wodurch die Membranexpansion und der Autophagie-Prozess gefördert werden (Geng & Klionsky, 2008; Romanov *et al.*, 2012; Walczak & Martens, 2013; Döring & Prange, 2015). Als häufige Membran-Quellen für die Neubildung autophagosomaler Membranen gelten Omegasomen, die aus der Membran des ER entstehen (Tooze & Yoshimori, 2010).

Es stellte sich nun die Frage, ob und wie Rab33B und Core miteinander interagieren. In einer früheren Studie wurden bereits Ko-IPs und GST-Pulldown-Experimente durchgeführt, die keine direkte Interaktion zwischen Core und Rab33B belegen konnten (Döring & Prange, 2015). Stattdessen deckten Döring & Prange (2015) den autophagosomalen Atg5/12/16L1-Komplex als Interaktionspartner von Core auf, ein bekanntes Effektorprotein von aktivem Rab33B (Itoh *et al.*, 2008). Daher ist vorstellbar, dass Rab33B-positive Golgi-Vesikel mit Atg5/12/16L1 interagieren und mit der sich ausbildenden Phagophore fusionieren, um die Elongation voranzutreiben und Core an Membranen zu dirigieren (Itoh *et al.*, 2008, 2011). Die enge Interaktion zwischen Rab33B und Atg5/12/16L1 konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, da die Depletion von Rab33B zu einer Ko-Depletion von Atg16L1 und dem Atg12/5-Konjugat führte, wodurch der ganze Komplex destabilisiert wurde. Dieser Umstand machte es unmöglich, den Rab33B-Knockdown Phänotyp in HBV-produzierenden Zellen umzukehren, da alle Komponenten im richtigen stöchiometrischen Verhältnis vorliegen müssen (siehe Kapitel 3.2.4.3). Abb. 42 zeigt die mögliche Interaktion von Rab33B, Atg5/12/16L1 und Core. Die Membranassoziation von Rab GTPasen wird durch ein oder zwei stabile Prenyl-Gruppen vermittelt (Pfeffer, 2017).

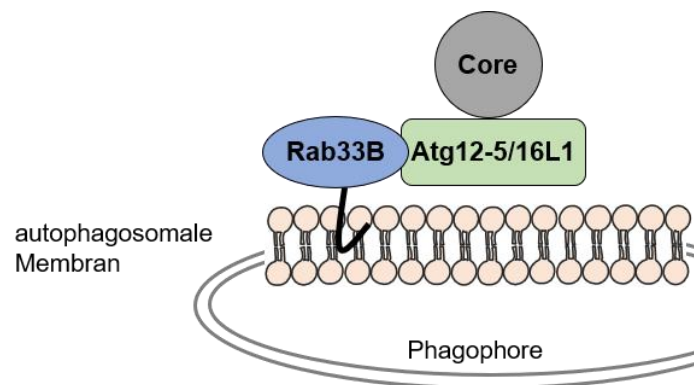


Abb. 42 Interaktion von Rab33B, Atg5/12/16L1 und Core an autophagosomalen Membranen

Dargestellt ist eine mögliche Interaktion zwischen Rab33B, Atg5/12/16L1 und Core.

Der Rab33B-Atg5/12/16L1-vermittelte Transport von Nukleokapsiden zum Sprossungsort könnte also autophagosomale Membranstrukturen involvieren. Dies lässt vermuten, dass auch eine Interaktion zwischen Core und Membranen stattfindet. Es wurde lange angenommen, dass Core selbst keine Membranassoziation aufweist, da die Umhüllungsreaktion von den bereits in der Membran integrierten Hüllproteinen gesteuert wird. Genetische *Screens* entschlüsselten, dass eine kurze lineare Sequenz in der PräS-Domäne des L-Hüllproteins sowie zwei Stellen an der Kapsid-Oberfläche für die Umhüllung des Nukleokapsids notwendig sind, da Punktmutationen innerhalb dieser Sequenzen zu einer Blockierung der Sprossung führten (Bruss, 1997; Löffler-Mary *et al.*, 2000; Ponsel & Bruss, 2003). Die ins Zytosol-ragende PräS-Domäne von L interagiert dabei mit den Nukleokapsiden und fördert deren Umhüllung (Blondot *et al.*, 2016). Bei Untersuchungen zur Membranassoziation von Core konnte eine klare Bindung von Core an Membranen festgestellt werden – auch in der Abwesenheit der Hüllproteine (Bartusch *et al.*, 2017). Bei vielen Retroviren wird die Membranassoziation des Gag-Polyproteins über N-terminale Acylierung und basischen Aminosäure-Regionen der MA-Domäne gesteuert (Lorizate & Kräusslich, 2011; Maldonado *et al.*, 2014). Core besitzt keine MA-Domäne und vermittelt die Anlagerung an Membranen über elektrostatische Interaktionen seiner Arginin-reichen CTD mit den negativ-geladenen Membranlipiden (Bartusch *et al.*, 2017). Core-Mutanten ohne die CTD sind allerdings immer noch fähig, Kapside zu bilden (Gallina *et al.*, 1989; Birnbaum & Nassal, 1990; Zlotnick *et al.*, 2015; Bartusch *et al.*, 2017). Offenbar ist die Anwesenheit von Membranen keine Voraussetzung für die Bildung von Kapsiden, allerdings könnten sich die Anforderungen von Kapsid- und Nukleokapsid-Zusammenbau auch

unterscheiden, da bei Nukleokapsiden noch der pgRNA/Pol-Komplex verpackt werden muss (Bartusch *et al.*, 2017). Alle viralen Komponenten müssen an einen Ort gebracht werden, um zunächst den Zusammenbau der Nukleokapside und folgend die Sprossung zu ermöglichen. HBV könnte durch die Konzentration der viralen Komponenten an spezifischen Membranen einen effizienten Nukleokapsid-Zusammenbau im unübersichtlichen Zytosol der Zelle ermöglichen (Bartusch *et al.*, 2017). Diese Strategie wird auch von anderen Viren genutzt, die membranöse Replikations-Fabriken aus zellulären Membranen, wie dem ER, bilden, um ihre Replikation voranzutreiben (Romero-Brey & Bartenschlager, 2016; Bartusch *et al.*, 2017). Bartusch *et al.* (2017) konnten zeigen, dass die Menge an membrangebundenen Core/Kapsiden im HBV-Kontext in Rab33B-depletierten Zellen reduziert war. Damit korreliert die verringerte Membranassoziation von HBV Core/Kapsiden (Bartusch *et al.*, 2017) mit der Blockierung der Nukleokapsid-Bildung (diese Arbeit) in Rab33B-Knockdown Zellen. Dies ist höchstwahrscheinlich durch einen fehlerhaften Transport von Core zum Ort des Nukleokapsid-Zusammenbaus bedingt. Ob der Transport des pgRNA/Pol-Komplexes ebenfalls vom Ausfall von Rab33B beeinflusst ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden. Außerdem ist es möglich, dass Rab33B im Transport der Nukleokapside zum Sprossungsort eine Rolle spielt. In IF-Analysen war eine Reduktion in der Ko-Lokalisation von Core und L nach der Inaktivierung von Rab33B zu beobachten, wodurch die Vermutung eines fehlgeleiteten Transports von Core/Nukleokapsiden bekräftigt wird.

In der Studie von Döring & Prange (2015) lag der Fokus auf der Ausschleusung von nackten HBV Kapsiden. In Rab33B-depletierten Zellen war die Ausschleusung von nackten Kapsiden blockiert, es konnte allerdings keine ausgeprägte Core/Kapsid-Reduktion, wie in der vorliegenden Arbeit, beobachtet werden (Döring & Prange, 2015). Es sollte daher ergründet werden, warum der Phänotyp der verminderten Core/Kapsid-Menge in Rab33B-depletierten Zellen nur im HBV-Kontext präsent ist. Als möglicher Erklärungsansatz kommt die Beteiligung der Autophagie-Maschinerie in Frage. HBV ist in der Lage, eine unvollständige Autophagie zu stimulieren, um seine Replikation zu fördern, ohne dabei selbst abgebaut zu werden (Tang *et al.*, 2009; Sir *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011). Eine Hemmung der Autophagie durch

chemische Komponenten oder RNA-Interferenz führte in transgenen Mäusen zur Blockierung der Nukleokapsid-Bildung und in HBV-replizierenden Zellen zur Blockierung der Nukleokapsid-Umhüllung (Tang *et al.*, 2009; Sir *et al.*, 2010; J. Li *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass das HBV X-Protein den lysosomalen Abbau inhibiert und somit HBV vor der autophagosomalen Degradation schützt (Tang *et al.*, 2009; Sir *et al.*, 2010; J. Li *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu findet bei der alleinigen Expression von Core keine Induktion der Autophagie statt (Döring & Prange, 2015). Die Induktion der Autophagie mit der gleichzeitigen Inhibierung des lysosomalen Abbaus in HBV-produzierenden Zellen könnte den Abbau von fehlgeleiteten Core/Nukleokapsiden in Rab33B-depletieren Zellen über das Ubiquitin/Proteasom-System (UPS) einleiten. Erste Vorversuche mit Proteasom-Inhibitoren konnten einen Abbau von Core über UPS nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt). Neben der Autophagie und dem UPS stehen der Zelle noch weitere Abbaue Wege zur Verfügung, wie die Chaperon-vermittelte Autophagie oder die Mikroautophagie, die eine Rolle bei der Degradierung von Core spielen könnten.

Die Aktivität von Rab GTPasen wird von GTP-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) gesteuert (Stenmark, 2009). OATL1 ist ein beschriebenes GAP von Rab33B (Itoh *et al.*, 2011), weshalb dessen Inaktivierung in einer gesteigerten Rab33B-Aktivität resultieren sollte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Depletion von OATL1 zu einer gesteigerten Nukleokapsid-Bildung und Virionen-Ausschleusung führte, wodurch OATL1 klaren Einfluss auf Rab33B und folgend auf die HBV-Replikation nimmt. Weiterführende Experimente zum Expressionsprofil von OATL1 oder Überexpressionsanalysen von OATL1 in HBV-produzierenden Zellen könnten nähere Einblicke in eine mögliche Modulation durch HBV und die Regulation von Rab33B geben.

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung von Rab33B ist die Beobachtung, dass HBV die Expression von Rab33B während der Replikation hochreguliert. Dies ist allerdings nicht nur bei HBV der Fall; auch in der HCV-Replikation konnte ebenfalls eine Hochregulation von Rab33B beobachtet werden (Blackham *et al.*, 2010). HCV könnte dabei folgende Rab33B-vermittelte Funktionen nutzen: (1) Transport und Akkumulation viraler Proteine während der Bildung des membranösen HCV-

Replikation-Komplexes und (2) Vernetzung zur Autophagie, die in der HCV-Replikation und im HCV-Zusammenbau eine wichtige Rolle einnimmt (Blackham *et al.*, 2010; Ploen & Hildt, 2015). Beide Viren hängen von Rab33B ab und nutzen Schritte der Autophagie-Maschinerie zu ihrem Vorteil aus. Dies deutet an, dass Rab33B eine allgemeine Rolle in der Autophagie-vermittelten Virusmorphogenese spielen könnte. Wie genau HBV nur die „frühen“ Schritte der Autophagie für seine Zwecke manipuliert ist noch unklar, allerdings scheint der Autophagie-Komplex Atg5/12/16L1 eine entscheidende Rolle dabei zu spielen (Döring *et al.*, 2017, in Revision).

4.2.6 HBV-Morphogenese: Modell

In der vorliegenden Arbeit sollten neue Erkenntnisse bezüglich der notwendigen Rab GTPasen in der HBV-Morphogenese gewonnen werden. Es konnte klar gezeigt werden, dass die HBV-Morphogenese von Rab33B abhängt. Die Aufgabe von Rab33B besteht in der Vermittlung des Transports von Core zu Orten des Nukleokapsid-Zusammenbaus und/oder von Nukleokapsiden zum Sprossungsort. Analysen der weiteren untersuchten Rab-Proteine Rab1A, Rab6A, Rab18 und Rab34 lieferten zudem erste Hinweise für mögliche Einsatzorte in der HBV-Replikation, die zukünftig mit weiteren Experimenten untermauert werden müssen. Rab1A könnte an der Initiation der Bildung der autophagosomalen Membran und dadurch an der Nukleokapsid-Bildung mitwirken. Rab6A könnte in der Regulation des Transports von Nukleokapsiden zum Ort der Umhüllung involviert sein. Rab18 vermittelt möglicherweise den Transport der Hüllproteine/Nukleokapside zum Synthese-/Knospungsort und könnte zudem in der HBV-induzierten Manipulation der Autophagie mitwirken. Rab34 könnte durch die Interaktion mit seinem Effektorprotein RILP den ESCRT-II-Komplex rekrutieren, um Zugang zum ESCRT-III/VPS4-Komplex für die Virionen-Abschnürung zu erhalten.

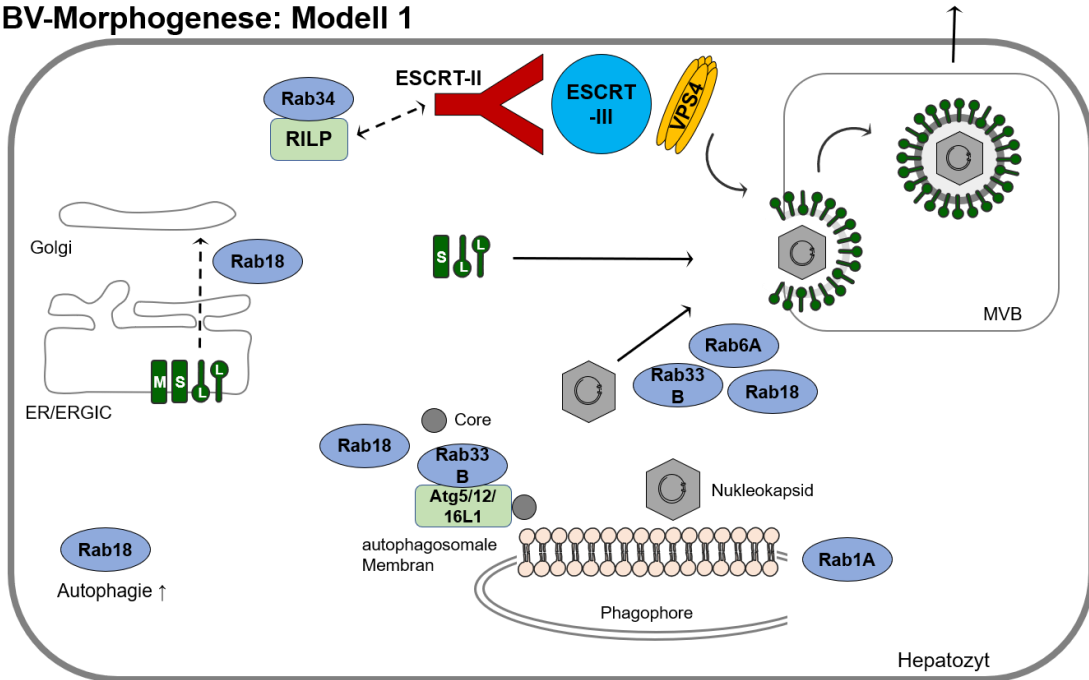
Die Frage des exakten Sprossungsorts konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden. In Elektronenmikroskop-Aufnahmen und IF-Studien HBV-infizierter Zellen oder Gewebeproben wurde der Virionen-Zusammenbau in großen intrazellulären Kompartimenten beobachtet, die möglicherweise späte Endosomen oder MVBs darstellen (Falcón *et al.*, 1993; Rost *et al.*, 2006; Patient *et al.*, 2009). Die ESCRT-Abhängigkeit von HBV gilt als ein weiteres Indiz für die Verwendung von MVB-

Kompartimenten während der Knospung (Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Stieler & Prange, 2014; Chou *et al.*, 2015). Inoue *et al.* (2015) stellten fest, dass im Zuge einer HBV-induzierten Aktivierung von Rab7 eine Umorganisation der MVB- und autophagosomalen Kompartimente statt fand, wobei tubuläre Membranstrukturen gebildet werden, die in Kontakt mit MVBs, Autophagosomen und Lysosomen stehen (Inoue *et al.*, 2015). Da die Rab7-Aktivität zu einer Hemmung der Virionen-Ausschleusung führt, was durch die gesteigerte Verschmelzung von MVBs mit Lysosomen bedingt ist, ist noch unklar wozu HBV diesen Mechanismus benutzt (Inoue *et al.*, 2015). Es ist mittlerweile aber auch bekannt, dass die ESCRT-Komponenten nicht nur die klassische Funktion an der MVB-Biogenese wahrnehmen, sondern auch an andere Orte der Zelle rekrutiert werden können (Hurley, 2015). Dadurch ist die örtliche MVB-Abhängigkeit der ESCRT-Maschinerie nicht mehr zwangsläufig gegeben. HBV könnte durch ESCRT-assoziierte Proteine, wie dem Ubiquitin-interagierenden Adaptorprotein γ 2-Adaptin und HECT Ubiquitin-Ligasen, Zugang zur ESCRT-Kaskade erhalten (Rost *et al.*, 2006, 2008; Döring *et al.*, 2010; Prange, 2012). Für eine korrekte HBV-Morphogenese müssen die Hüllproteine glykosyliert werden, was u.a. wichtig für die Proteinfaltung, Protein-Protein-Interaktionen und die Sekretion ist (Lu *et al.*, 1995, 1997; Lambert & Prange, 2007). *N*-Glykosylierungen und deren Modifikationen erfolgen im ER/Golgi, im Anschluss oder während der ko-translationalen Integration der Hüllproteine im ER (Prange, 2012; Julithe *et al.*, 2014).

Es ergeben sich aufgrund des momentanen Forschungsstandes zwei Modelle für die HBV-Morphogenese: Das erste Modell favorisiert MVBs als Knospungsort und setzt voraus, dass alle viralen Komponenten zu den MVBs transportiert werden müssen. Die ESCRT-Maschinerie vermittelt dann die Abschnürung der Nukleokapside in das Lumen der MVBs. Nach der Verschmelzung der MVBs mit der Plasmamembran würden die Virionen als „Exosomen“ freigesetzt. Diese Art der Virionen-Ausschleusung konnte bisher noch für kein anderes Virus zweifelsfrei beschrieben werden. Allerdings galten MVBs lange Zeit als Sprossungsorte von HIV-1: Während einige Studien MVBs aufgrund von Elektronenmikroskop-Aufnahmen und der ESCRT-Abhängigkeit favorisierten, schlugen andere Studien die Plasmamembran vor und argumentierten, dass der intrazelluläre beobachtete Pool von Virionen in MVBs re-internalisierte Virionen repräsentieren, die zuvor an der Plasmamembran freigesetzt wurden

(Jouvenet *et al.*, 2006; Welsch *et al.*, 2007). Weitere Studien konnten zudem zeigen, dass HIV-1 Virionen an der Zellmembran von Makrophagen akkumulieren und knospen, wodurch die Plasmamembran als eigentlicher Sprossungsort bestätigt wurde (Welsch *et al.*, 2007; Sundquist & Krausslich, 2012). Derzeit gibt es allerdings keinerlei Hinweise für einen Plasmamembran-ständigen Sprossungsort bei HBV. Das zweite Modell befürwortet die Knospung am sekretorischen System. Dazu müssen Nukleokapside und ESCRT-Komponenten zu den membranständigen Hüllproteinen am ER/Golgi rekrutiert und transportiert werden. Daraufhin knospen die Nukleokapside ESCRT-abhängig in das Lumen des ER/Golgi. Der Transport der Virionen zur Plasmamembran erfolgt dann in sekretorischen Vesikeln. Für einige Viren konnte bereits gezeigt werden, dass sie mittels ESCRT in das Lumen von Organellen des sekretorischen Wegs knospen: HCV interagiert mit HRS, einer ESCRT-0-Untereinheit, und wird dann durch die Rekrutierung von ESCRT-III/VPS4 ins Lumen des ERs abgeschnürt und nach Passieren des Golgi-Komplexes über den Sekretionsweg freigesetzt (Corless *et al.*, 2010; Barouch-Bentov *et al.*, 2016). Neben HCV konnte auch für andere Flaviviren, wie Japanisches Enzephalitis-Virus (JEV) und Dengue-Virus (DENV), eine ESCRT-Beteiligung, insbesondere von CHMP2 und CHMP4, an der Virionen-Abschnürung am ER gezeigt werden (Tabata *et al.*, 2017). Es bedarf daher weiterer Untersuchungen, um den exakten Sprossungsort von HBV benennen zu können. Abb. 43 zeigt beide Modelle unter Einbeziehung der gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit.

HBV-Morphogenese: Modell 1



HBV-Morphogenese: Modell 2

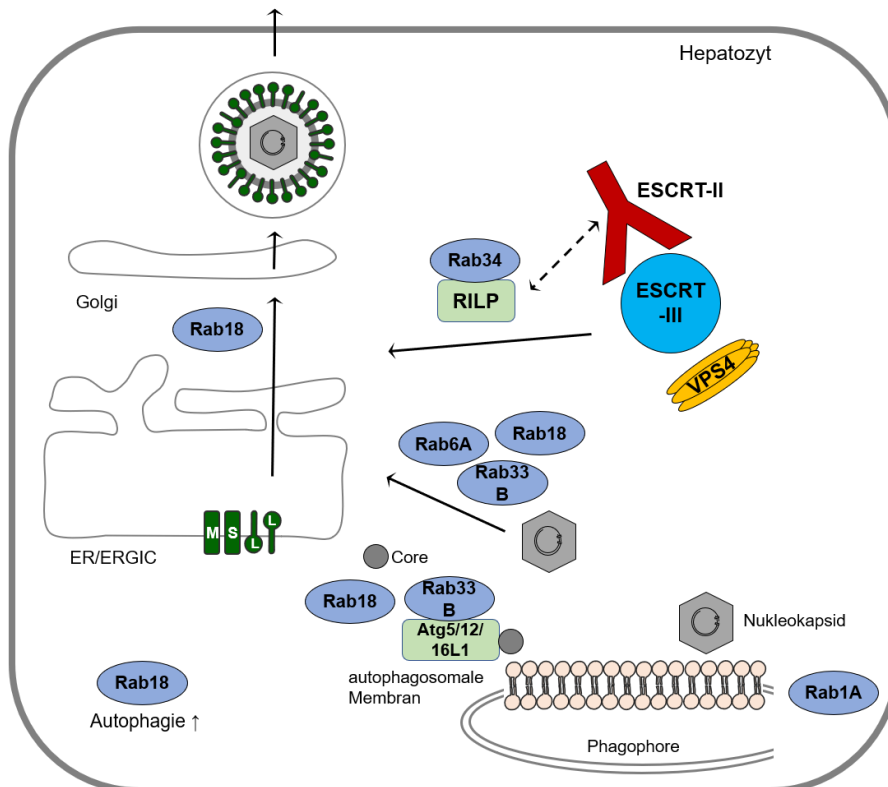


Abb. 43 HBV-Morphogenese: Modell

Dargestellt sind zwei mögliche Modelle zur HBV-Morphogenese. Zusätzlich sind potentielle Wirkorte der untersuchten Rab GTPasen angezeigt.

5 Zusammenfassung

Viren garantieren ihre Verbreitung durch selektive Manipulationen zellulärer Protein-Maschinerien. Das Zusammenspiel von viralen und zellulären Komponenten bedarf dabei einer präzisen Regulation, die durch das Virus vermittelt wird. Kritische Virus-Wirt-Interaktionen in späten Schritten des viralen Lebenszyklus ereignen sich während des Transports der viralen Komponenten zum Ort des Zusammenbaus und während der nicht-lytischen Virionen-Abschnürung. Die zelluläre ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Maschinerie wird von einigen Viren für die Virionen-Abschnürung missbraucht (Hurley, 2015). Die Maschinerie setzt sich aus den Komplexen ESCRT-0, -I, -II und -III und der VPS4 AAA-ATPase zusammen (McCullough *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit sollte die Beteiligung der ESCRT-Komplexe in der Morphogenese des Murinen Leukämievirus (MLV) untersucht werden. MLV ist ein Retrovirus und besitzt ein einfaches Genom, weshalb es als paradigmatisches Modellsystem gewählt wurde. Viren können über spezifische *late*-Domänen, die ESCRT-Proteine oder ESCRT-assoziierte Proteine binden und rekrutieren, um Zugang zur ESCRT-Maschinerie zu erhalten (Freed, 2002; Bieniasz, 2006). Das MLV Gag-Polyprotein besitzt die drei *late*-Domänen PSAP, LYPAL und PPPY, die mit der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101, oder den MVB-Adaptorproteinen Alix oder Nedd4-1 interagieren können (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). In der Abwesenheit viraler Hüllproteine kann das MLV Gag-Polyprotein Virus-ähnliche Partikel (VLPs) bilden und ausschleusen (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). Für die VLP-Morphogenese konnte bereits gezeigt werden, dass die ESCRT-I-Untereinheit Tsg101 und die ESCRT-III-Untereinheiten CHMP2A und CHMP4B essentiell sind (Bartusch, 2014). Das MVB-Adaptorprotein Alix ist ebenso beteiligt, während Nedd4-1 nicht benötigt wird (Bartusch, 2014; Bartusch & Prange, 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte entschlüsselt werden, dass die MLV-Morphogenese ebenfalls von der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101 und den ESCRT-III-Untereinheiten CHMP2A und CHMP4B abhängt, zusätzlich aber noch CHMP1A benötigt wird. Der CHMP1A-Knockdown führte zu einer Hemmung der Prozessierung von Gag- und Gag/Pol-Polyproteinen und zu einer Akkumulation von Gag in der Zellperipherie. Die exakte Funktion von CHMP1A konnte noch nicht abschließend geklärt werden,

allerdings scheint das Protein eine Adaptor-ähnliche, ESCRT-unabhängige Rolle im Transport von Gag- und Gag/Pol-Polyproteine zum Sprossungsort und der viralen Protease einzunehmen. Zusätzlich konnte eine Notwendigkeit für Nedd4-1 für die MLV-Morphogenese bestätigt werden, während Alix eine untergeordnete Rolle spielt. Die Anforderungen an die ESCRT-Maschinerie unterscheiden sich somit für VLPs und Virionen. Dieses Phänomen konnte bereits für subvirale und virale Partikel des Hepatitis-B-Virus (HBV) und des Sendai-Virus (SeV) beschrieben werden (Gosselin-Grenet *et al.*, 2007; Prange, 2012).

Für HBV ist die Bedeutung der ESCRT-Maschinerie bereits beschrieben (Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Stieler & Prange, 2014; Chou *et al.*, 2015). Jedoch sind viele weitere Schritte der HBV-Morphogenese noch unzureichend charakterisiert, insbesondere die Transportmechanismen der viralen Komponenten vom Synthesort zum Sprossungsort. Rab GTPasen regulieren Vesikelabschnürungen, -transport und -fusionen (Stenmark, 2009). In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Mechanismen des Rab GTPase-Netzwerks während der Reifung und Ausschleusung von HBV untersucht werden. Es konnte dabei eindeutig gezeigt werden, dass Rab33B für die HBV-Morphogenese notwendig ist. Rab33B reguliert die Golgi-Homöostase und ist zudem an der Bildung autophagosomaler Membranen beteiligt (Itoh *et al.*, 2008; Starr *et al.*, 2010). Während Rab33B für die Ausschleusung subviraler HBV-Partikel (SVPs) entbehrlich ist, führte der Knockdown von Rab33B zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären Nukleokapsid- und extrazellulären Virionen-Mengen. Die Überexpression einer dominant-negativen Mutante spiegelte den Knockdown-Phänotyp wider und deutete an, dass HBV auf katalytisch-aktives Rab33B angewiesen ist. Immunfluoreszenz-Analysen bestätigten die Annahme, dass Rab33B in den Transport des viralen Core-Proteins und nicht der Hüllproteine eingreift. Expressionsanalysen auf RNA- und Protein-Ebene zeigten zudem eine Hochregulierung von Rab33B in HBV-produzierenden Zellen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Rab33B in der HBV-Morphogenese den Transport von Core zum Bildungsort von Nukleokapsiden und/oder den Transport von Nukleokapsiden zum Sprossungsort reguliert. Die Analyse weiterer Rab-Proteine, deren Knockdown ebenfalls zu einer Störung in der Nukleokapsid-Bildung und Virionen-Ausschleusung führte, ergab Einblicke in das komplexe Transport-Netzwerk von HBV und lieferte

Hinweise für mögliche Wirkorte. Rab1A könnte durch die Vernetzung zur Autophagie an der Bildung von Nukleokapsiden involviert sein. Im Falle von Rab6A ist eine Beteiligung an der Regulation des Transports von Nukleokapsiden zum Ort der Umhüllung denkbar. Wenn auch die genaue(n) Funktion(en) von Rab18 noch nicht hinreichend geklärt werden konnten, scheint dieses Rab-Protein den Transport der HBV-Strukturproteine zum Synthese-/Knospungsort zu eskortieren und in der HBV-induzierten Modulation der Autophagie involviert zu sein. Ein Rab34/RILP/ESCRT-II-Superkomplex mit assoziiertem Core könnte gewährleisten, dass HBV Zugang zum ESCRT-III/VPS4-Komplex erhält, der die finale Virus-Abschnürung katalysiert. Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen, Modelle zur Wirkweise der proviralen Rab GTPasen und ihrer gesteuerten Transportmechanismen zum Ort des HBV-Zusammenbaus zu entwickeln. Meine Ergebnisse engen mögliche Sprossungsorte von HBV auf MVB-Membranen oder ER/Golgi-Kompartimente ein, an denen das Virus ESCRT-abhängig knospt.

6 Summary

Viruses ensure their replication and release through diverse manipulation of cellular protein machineries. Therefore, many viruses depend on a close interplay between viral and cellular proteins. In late steps of the viral life cycle of enveloped viruses, productive virus-host interactions occur during the transport of viral components to the assembly site and during non-lytic budding. Many viruses abuse the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery for budding, which consists of four heteromeric protein complexes ESCRT-0, -I, -II and -III together with the VPS4 AAA-ATPase (McCullough *et al.*, 2013). The aim of this thesis was to elucidate the role of ESCRT complexes in murine leukemia virus (MLV) morphogenesis. As a retrovirus, MLV has a simple genome organization and thus resembles an appropriate model system to analyze the ESCRT machinery in viral budding. Viruses recruit the ESCRT proteins through specific tetrapeptide motifs within their Gag polyproteins, the so-called late domains (Freed, 2002; Bieniasz, 2006). The MLV Gag polyprotein contains the three canonical late domains PSAP, LYPAL and PPPY which are known to interact with the ESCRT-I protein Tsg101 or the MVB adaptor proteins Alix or Nedd4-1, respectively (Yuan *et al.*, 1999; Sabo *et al.*, 2008; Rein, 2011). MLV is able to generate virus-like particles (VLPs) driven by its Gag polyprotein, even in the absence of the viral envelope proteins. Previous studies showed that the VLP morphogenesis depends on the ESCRT-I protein Tsg101, the ESCRT-III proteins CHMP2A and CHMP4B and secondarily on Alix (Bartusch, 2014; Bartusch & Prange, 2016). By studying the requirements of MLV virion morphogenesis it was uncovered that Tsg101, CHMP2A and CHMP4B are likewise important, but additionally requires CHMP1A. The depletion of CHMP1A resulted in a prominent decline of Gag and Gag/Pol processing by the viral protease (PR) and an accumulation of Gag in the cell periphery. Although the role of CHMP1A is not completely dissected yet, it could play an adaptor-like role guiding proper trafficking and targeting of Gag and Gag/Pol to the budding site and the PR. Additionally, Nedd4-1 is necessary in MLV morphogenesis, whereas Alix seems to play an auxiliary role. Hence, MLV virions and VLPs share some requirements of the ESCRT machinery, but clearly differ in their needs for CHMP1A. The different use of host factors engaged by virions and VLPs have already been described to occur

during hepatitis B virus (HBV) and Sendai virus (SeV) replication (Gosselin-Grenet *et al.*, 2007; Prange, 2012). For HBV, it has been reported that budding occurs at intracellular membranes with the assistance of the ESCRT machinery (Lambert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Stieler & Prange, 2014; Chou *et al.*, 2015). However, many steps accompanying HBV morphogenesis are not resolved yet, in particular, the transport mechanisms of the viral proteins to sites of assembly/budding are largely unknown. Rab GTPases are master regulators of membrane traffic and control membrane identity, vesicle budding, trafficking and fusion (Stenmark, 2009). The aim of this thesis was to unravel the engagement of Rab GTPases by HBV during its assembly and release. It was found that Rab33B is a critical player in HBV propagation. Rab33B regulates the Golgi homeostasis and plays a pivotal role in the formation of autophagosomal membranes (Itoh *et al.*, 2008; Starr *et al.*, 2010). Rab33B is dispensable for the release of subviral HBV particles (SVPs), but is essential for HBV virion formation, as its knockdown resulted in a significant decline of extracellular virions and intracellular nucleocapsids. The overexpression of a dominant-negative mutant phenocopied the knockdown effect, indicating that HBV needs catalytic active Rab33B. Analysis of immunofluorescence studies provided further hints that Rab33B primarily targets core, rather than the envelope. The proviral role of Rab33B is sustained by the finding that replication enhanced Rab33B expression. The combined data indicate that Rab33B is involved in the transport of core to nucleocapsid assembly sites and/or transport of nucleocapsids to budding sites. Besides, the study provided further clues for the roles of other Rab proteins engaged by HBV for benefit. Rab1A appears to be an important player in the formation of nucleocapsids, likely due to its link to the autophagy machinery. The function of Rab6A is vague, but it may control the transport of nucleocapsids to the budding site. Rab18 could escort viral proteins to the nucleocapsid assembly/budding site and is probably involved in the modulation of HBV-induced autophagy. A Rab34/RILP/ESCRT-II complex along with associated HBV core could recruit the ESCRT-III/VPS4 complex in order to facilitate the final fission and budding events. Based on these findings, models were depicted implicating putative target sites of the identified proviral Rab GTPases and potential budding sites of HBV.

7 Literaturverzeichnis

- Alcami, A., & Koszinowski, U. H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Trends in Microbiology*, 8(9), 410–418.
- Alwine, J. C. (2012). The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002878.
- Angers-Loustau, A., Rainy, J., & Wartiovaara, K. (2007). PlasmaDNA: a free, cross-platform plasmid manipulation program for molecular biology laboratories. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 77.
- 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. 4 vols. *John Wiley & Sons*.
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *The Journal of Cell Biology*, 162(3), 435–442.
- Bardens, A., Döring, T., Stieler, J., & Prange, R. (2011). Alix regulates egress of hepatitis B virus naked capsid particles in an ESCRT-independent manner. *Cellular Microbiology*, 13(4), 602–619.
- Barouch-Bentov, R., Neveu, G., Xiao, F., Beer, M., Bekerman, E., Schor, S., Campbell, J., Boonyaratanakornkit, J., ... Einav, S. (2016). Hepatitis C Virus Proteins Interact with the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) Machinery via Ubiquitination To Facilitate Viral Envelopment. *mBio*, 7(6).
- Bartenschlager, R., & Schaller, H. (1992). Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *The EMBO Journal*, 11(9), 3413–3420.
- Bartusch, C. (2014). *Untersuchungen zur regulierbaren Proteinexpression und retroviralen Partikelaußschleusung in Säugerzellen*. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Bartusch, C., & Prange, R. (2016). ESCRT requirements for murine leukemia virus release. *Viruses*, 8(4), 103.
- Bartusch, C., Döring, T., & Prange, R. (2017). Rab33B Controls Hepatitis B Virus Assembly by Regulating Core Membrane Association and Nucleocapsid Processing. *Viruses*, 9(6), 157.
- Baumert, T. F., Verrier, E. R., Nassal, M., Chung, R. T., & Zeisel, M. B. (2015). Host-targeting agents for treatment of hepatitis B virus infection. *Current Opinion in Virology*, 14(Supplement C), 41–46.
- Beck, J., & Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology*, 13(1),

48–64.

- Bento, C. F., Puri, C., Moreau, K., & Rubinsztein, D. C. (2013). The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *Journal of Cell Science*, *126*(5), 1059 LP-1069.
- Bhatia, H. K., Singh, H., Grewal, N., & Natt, N. K. (2014). Sofosbuvir: A novel treatment option for chronic hepatitis C infection. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, *5*(4), 278–284.
- Bieniasz, P. D. (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*, *344*(1), 55–63.
- Bird, S. W., & Kirkegaard, K. (2015). Escape of non-enveloped virus from intact cells. *Virology*, *479–480*, 444–449.
- Birnbaum, F., & Nassal, M. (1990). Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *Journal of Virology*, *64*(7), 3319–3330.
- Blackham, S., Baillie, A., Al-Hababi, F., Remlinger, K., You, S., Hamatake, R., & McGarvey, M. J. (2010). Gene Expression Profiling Indicates the Roles of Host Oxidative Stress, Apoptosis, Lipid Metabolism, and Intracellular Transport Genes in the Replication of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, *84*(10), 5404–5414.
- Blesch, A. (2004). Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods*, *33*(2), 164–172.
- Blondot, M.-L., Bruss, V., & Kann, M. (2016). Intracellular transport and egress of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*, *64*(1), S49–S59.
- Bock, C. T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M. P., Trautwein, C., & Zentgraf, H. (2001). Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol*, *307*(1), 183–196.
- Boehm, M., & Bonifacino, J. S. (2001). Adaptins: The Final Recount. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(10), 2907–2920.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *254*, 248–254.
- Bruce, E. A., Stuart, A., McCaffrey, M. W., & Digard, P. (2012). Role of the Rab11 pathway in negative-strand virus assembly. *Biochemical Society Transactions*, *40*(January 2016), 1409–15.
- Bruss, V. (1997). A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *Journal of Virology*, *71*(12), 9350–9357.
- Bruss, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *13*(1), 65–

73.

- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., & van Deurs, B. (2000). Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(2), 467–480.
- Camus, G., Segura-Morales, C., Molle, D., Lopez-Vergès, S., Begon-Pescia, C., Cazevielle, C., Schu, P., Bertrand, E., ... Basyuk, E. (2007). The Clathrin Adaptor Complex AP-1 Binds HIV-1 and MLV Gag and Facilitates Their Budding. *Molecular Biology of the Cell*, *18*(8), 3193–3203.
- Carlson, L. A., & Hurley, J. H. (2012). In Vitro Reconstitution of the Ordered Assembly of the ESCRT Machinery at Membrane-Bound HIV-1 Gag Clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*, 16928–16933.
- Carlton, J. G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., & Martin-Serrano, J. (2012). ESCRT-III governs the aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science*, *336*.
- Carlton, J. G., & Martin-Serrano, J. (2007). Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. *Science*, *316*(5833), 1908–1912.
- Chazal, N., & Gerlier, D. (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *67*(2), 226–37.
- Chen, C., Wang, J. C.-Y., & Zlotnick, A. (2011). A Kinase Chaperones Hepatitis B Virus Capsid Assembly and Captures Capsid Dynamics in vitro. *PLOS Pathogens*, *7*(11), e1002388.
- Chisari, F. V., Isogawa, M., & Wieland, S. F. (2010). Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathologie-Biologie*, *58*(4), 258–66.
- Chou, S. F., Tsai, M. L., Huang, J. Y., Chang, Y. S., & Shih, C. (2015). The Dual Role of an ESCRT-0 Component HGS in HBV Transcription and Naked Capsid Secretion. *PLoS Pathogens*, *11*(10), 1–28.
- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C., & Stenmark, H. (2017). Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*(1), 42–56.
- Chung, H.-Y., Morita, E., von Schwedler, U., Müller, B., Kräusslich, H.-G., & Sundquist, W. I. (2008). NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPX_L late domains. *Journal of Virology*, *82*(10), 4884–97.
- Connell, J. W., Lindon, C., Luzio, J. P., & Reid, E. (2009). Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic*, *10*(1), 42–56.
- Corless, L., Crump, C. M., Griffin, S. D. C., & Harris, M. (2010). Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *Journal of General Virology*, *91*(2),

362–372.

- Cui, X., Ludgate, L., Ning, X., & Hu, J. (2013). Maturation-Associated Destabilization of Hepatitis B Virus Nucleocapsid. *Journal of Virology*, *87*(21), 11494–11503.
- Curwin, A. J., Brouwers, N., Adell, M. A. Y., Teis, D., Turacchio, G., Parashuraman, S., Ronchi, P., & Malhotra, V. (2016). ESCRT-III drives the final stages of CUPS maturation for unconventional protein secretion. *eLife*, *5*(APRIL2016), 1–25.
- Dane, D. S., Cameron, C. H., & Briggs, M. (1970). *Virus-Like Particles in Serum of Patients with Australia-Antigen-Associated Hepatitis*. *Lancet* (Vol. 1).
- Dansako, H., Hiramoto, H., Ikeda, M., Wakita, T., & Kato, N. (2014). Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*, *462–463*(1), 166–174.
- Dawood, A., Abdul Basit, S., Jayaraj, M., & Gish, R. G. (2017). Drugs in Development for Hepatitis B. *Drugs*, *77*(12), 1263–1280.
- de Armas-Rillo, L., Valera, M., Marrero-Hernández, S., & Valenzuela-Fernández, A. (2016). Membrane dynamics associated with viral infection. *Reviews in Medical Virology*, *26*(3), 146–160.
- De Rijck, J., de Kogel, C., Demeulemeester, J., Vets, S., El Ashkar, S., Malani, N., Bushman, F. D., Landuyt, B., ... Debyser, Z. (2013). The BET Family of Proteins Targets Moloney Murine Leukemia Virus Integration near Transcription Start Sites. *Cell Reports*, *5*(4), 886–894.
- de Vries, E., Tscherne, D. M., Wienholts, M. J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., Rottier, P. J. M., & de Haan, C. A. M. (2011). Dissection of the Influenza A Virus Endocytic Routes Reveals Macropinocytosis as an Alternative Entry Pathway. *PLoS Pathogens*, *7*(3), e1001329.
- Dejgaard, S. Y., Murshid, A., Erman, A., Kızılay, Ö., Verbich, D., Lodge, R., Dejgaard, K., Ly-Hartig, T. B. N., ... Presley, J. F. (2008). Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *Journal of Cell Science*, *121*(16), 2768 LP-2781.
- Demirov, D. G., & Freed, E. O. (2004). Retrovirus budding. *Virus Research*, *106*(2 SPEC.ISS.), 87–102.
- Deres, K., Schröder, C. H., Paessens, A., Goldmann, S., Hacker, H. J., Weber, O., Krämer, T., Niewöhner, U., ... Rübsamen-Waigmann, H. (2003). Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by Drug-Induced Depletion of Nucleocapsids. *Science*, *299*(5608), 893 LP-896.
- Diaz, A., Zhang, J., Ollwerther, A., Wang, X., & Ahlquist, P. (2015). Host ESCRT proteins are required for bromovirus RNA replication compartment assembly and function. *PLoS Pathogens*, *11*(3),

e1004742.

- Dirk, B. S., Pawlak, E. N., Johnson, A. L., Van Nynatten, L. R., Jacob, R. A., Heit, B., & Dikeakos, J. D. (2016). HIV-1 Nef sequesters MHC-I intracellularly by targeting early stages of endocytosis and recycling. *Scientific Reports*, *6*(1), 37021.
- Doerr, H. W., & Gerlich, W. H. (Eds.). (2010a). 36 Hepatitis-B-Virus (Hepadnaviridae). *Medizinische Virologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Doerr, H. W., & Gerlich, W. H. (Eds.). (2010b). 8 Virale Vektoren für die Gentherapie. *Medizinische Virologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Döring, T., Bartusch, C., & Prange, R. (2017). The Autophagic Elongation Complex Atg5-12/16L1, but not Autophagic LC3/GABARAP Lipidation, Controls Hepatitis B Virus Assembly. *In Revision*.
- Döring, T., Gotthardt, K., Stieler, J., & Prange, R. (2010). γ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1803*(11), 1252–1264.
- Döring, T., & Prange, R. (2015). Rab33B and its autophagic Atg5/12/16L1 effector assist in hepatitis B virus naked capsid formation and release. *Cellular Microbiology*, *17*(5), 747–764.
- Drake, J. W., & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(24), 13910–3.
- Dupré, D. J., Robitaille, M., Éthier, N., Villeneuve, L. R., Mamarbachi, A. M., & Hébert, T. E. (2006). Seven Transmembrane Receptor Core Signaling Complexes Are Assembled Prior to Plasma Membrane Trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(45), 34561–34573.
- Eble, B. E., Lingappa, V. R., & Ganem, D. (1986). Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Molecular and Cellular Biology*, *6*(5), 1454–1463.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J.-J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., & Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-Associated Kinesin-Like Protein with Rab6. *Science*, *279*(5350), 580 LP-585.
- Effantin, G., Dordor, A., Sandrin, V., Martinelli, N., Sundquist, W. I., Schoehn, G., & Weissenhorn, W. (2013). ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding. *Cellular Microbiology*, *15*(2), 213–226.
- El Ashkar, S., Van Looveren, D., Schenk, F., Vranckx, L. S., Demeulemeester, J., De Rijck, J., Debyser, Z., Modlich, U., & Gijssbers, R. (2017). Engineering Next-Generation BET-Independent MLV

Vectors for Safer Gene Therapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 7(June), 231–245.

Erlwein, O., Buchholz, C. J., & Schnierle, B. S. (2003). The proline-rich region of the ecotropic Moloney murine leukaemia virus envelope protein tolerates the insertion of the green fluorescent protein and allows the generation of replication-competent virus. *Journal of General Virology*, 84(2), 369–373.

Falcón, V., Baranqsky, N., Castro, F. O., Montero, C., Gonzalez, M., Hayes, O., Ancheta, O., Gra, B., & Sara, M. (1993). Ultrastructural and immunocytochemical characteristics of hepatocytes from hepatitis B virus infected chimpanzees. *Tissue and Cell*, 25(6), 865–873.

Feldmann, A., Bekbulat, F., Huesmann, H., Ulbrich, S., Tatzelt, J., Behl, C., & Kern, A. (2017). The RAB GTPase RAB18 modulates macroautophagy and proteostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(3), 738–743.

Felsenstein, K. M., & Goff, S. P. (1988). Expression of the gag-pol fusion protein of moloney murine leukemia virus without gag protein does not induce virion formation or proteolytic processing. *J. Virol.*, 62(6), 2179–2182.

Fraille-Ramos, A., Cepeda, V., Elstak, E., & van der Sluijs, P. (2010). Rab27a Is Required for Human Cytomegalovirus Assembly. *PLOS ONE*, 5(12), e15318.

Freed, E. O. (2002). Viral Late Domains. *Journal of Virology*, 76(10), 4679–4687.

Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Micro*, 13(8), 484–496.

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. *Journal of Virology*, 63(11), 4645–4652.

Garcia, M. L., Reynolds, T. D., Mothes, W., & Robek, M. D. (2013). Functional Characterization of the Putative Hepatitis B Virus Core Protein Late Domain Using Retrovirus Chimeras. *PLoS ONE*, 8(8), e72845.

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. *The Journal of Cell Biology*, 106(4), 1093 LP-1104.

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., ... Sundquist, W. I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 107(1), 55–65.

Geng, J., & Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in

- macroautophagy. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" Review Series. *EMBO Reports*, 9(9), 859–864.
- Gerber, P. P., Cabrini, M., Jancic, C., Paoletti, L., Banchio, C., von Bilderling, C., Sigaut, L., Pietrasanta, L. I., ... Ostrowski, M. (2015). Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of Cell Biology*, 209(3), 435 LP-452.
- Gill, D. J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Emr, S. D., & Williams, R. L. (2007). Structural insight into the ESCRT-III link and its role in MVB trafficking. *The EMBO Journal*, 26(2), 600–612.
- Gilroy, K. L., Terry, A., Naseer, A., de Ridder, J., Allahyar, A., Wang, W., Carpenter, E., Mason, A., ... Neil, J. C. (2016). Gamma-Retrovirus Integration Marks Cell Type-Specific Cancer Genes: A Novel Profiling Tool in Cancer Genomics. *PLoS ONE*, 11(4), e0154070.
- Glebe, D., & Bremer, C. M. (2013). The Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis*, 33(2), 103–112.
- Glebe, D., & Urban, S. (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World Journal of Gastroenterology*, 13(1), 22–38.
- Goff, S. P. (2007). Host factors exploited by retroviruses. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(4), 253–263.
- Goldenberg, N. M., Grinstein, S., & Silverman, M. (2007). Golgi-bound Rab34 Is a Novel Member of the Secretory Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12), 4762–4771.
- Gosselin-Grenet, A.-S., Marq, J.-B., Abrami, L., Garcin, D., & Roux, L. (2007). Sendai virus budding in the course of an infection does not require Alix and VPS4A host factors. *Virology*, 365(1), 101–112.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), 3195–3199.
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P. S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I. V., ... Akhmanova, A. (2007). Rab6 Regulates Transport and Targeting of Exocytotic Carriers. *Developmental Cell*, 13(2), 305–314.
- Gross, L. (1951). "Spontaneous" Leukemia Developing in G3H Mice Following Inoculation, In Infancy, with AK-Emkemic. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 76(1), 27–32.
- Gross, L. (1957). Development and Serial Cell-Free Passage of a Highly Potent Strain of Mouse Leukemia Virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 94(4), 767–

771.

- Guo, Y., Cordes, K. R., Farese, R. V., & Walther, T. C. (2009). Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(6), 749 LP-752.
- Haas, A. K., Yoshimura, S. -i., Stephens, D. J., Preisinger, C., Fuchs, E., & Barr, F. A. (2007). Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *Journal of Cell Science*, 120(17), 2997–3010.
- Hartmann-Stühler, C., & Prange, R. (2001). Hepatitis B Virus Large Envelope Protein Interacts with γ 2-Adaptin, a Clathrin Adaptor-Related Protein. *Journal of Virology*, 75(11), 5343–5351.
- Heermann, K. H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., & Gerlich, W. H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of Virology*, 52(2), 396–402.
- Henderson, L. E., Krutzsch, H. C., & Oroszlan, S. (1983). Myristyl amino-terminal acylation of murine retrovirus proteins: An unusual post-translational protein modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2), 339–343.
- Hoffmann, J., Boehm, C., Himmelsbach, K., Donnerhak, C., Roettger, H., Weiss, T. S., Ploen, D., & Hildt, E. (2013). Identification of α -taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*, 59(5), 934–941.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of Thermus-Aquaticus Dna-Polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7276–7280.
- Houzet, L., Gay, B., Morichaud, Z., Briant, L., & Mougel, M. (2006). Intracellular assembly and budding of the Murine Leukemia Virus in infected cells. *Retrovirology*, 3, 12.
- Hu, J., & Liu, K. (2017). Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses*, 9(3), 56.
- Hu, J., & Seeger, C. (2015). Hepadnavirus Genome Replication and Persistence. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7).
- Huovila, A. P., Eder, A. M., & Fuller, S. D. (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *The Journal of Cell Biology*, 118(6), 1305 LP-1320.
- Hurley, J. H. (2015). ESCRTs are everywhere. *The EMBO Journal*, 34(19), 2398–2407.
- Indran, S. V., Ballestas, M. E., & Britt, W. J. (2010). Bicaudal D1-Dependent Trafficking of Human

- Cytomegalovirus Tegument Protein pp150 in Virus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 84(7), 3162–3177.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28.
- Inoue, J., Krueger, E. W., Chen, J., Cao, H., Ninomiya, M., & McNiven, M. A. (2015). HBV secretion is regulated through the activation of endocytic and autophagic compartments mediated by Rab7 stimulation. *Journal of Cell Science*, 128(9), 1696 LP-1706.
- Ishikawa, K., Catlett, N. L., Novak, J. L., Tang, F., Nau, J. J., & Weisman, L. S. (2003). Identification of an organelle-specific myosin V receptor. *The Journal of Cell Biology*, 160(6), 887–897.
- Issman-Zecharya, N., & Schuldiner, O. (2014). The PI3K class III complex promotes axon pruning by downregulating a ptc-derived signal via endosome-lysosomal degradation. *Developmental Cell*, 31(4), 461–473.
- Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., & Fukuda, M. (2008). *Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. Molecular biology of the cell* (Vol. 19).
- Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., & Fukuda, M. (2011). OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *Journal of Cell Biology*, 192(5), 838–853.
- Jackson, W. T., Giddings Jr, T. H., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., & Kirkegaard, K. (2005). Subversion of Cellular Autophagosomal Machinery by RNA Viruses. *PLOS Biology*, 3(5).
- Jadwin, J. A., Rudd, V., Sette, P., Challa, S., & Bouamr, F. (2010). Late Domain-Independent Rescue of a Release-Deficient Moloney Murine Leukemia Virus by the Ubiquitin Ligase Itch. *Journal of Virology*, 84(2), 704–715.
- Jiang, B., Himmelsbach, K., Ren, H., Boller, K., & Hildt, E. (2016). Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. *Journal of Virology*, 90(7), 3330–3341.
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., & Perez, F. (2014). ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science*, 343(6174), 1247136–1247136.
- Johns, H. L., Gonzalez-Lopez, C., Sayers, C. L., Hollinshead, M., & Elliott, G. (2014). Rab6 Dependent Post-Golgi Trafficking of HSV1 Envelope Proteins to Sites of Virus Envelopment. *Traffic*

(Copenhagen, Denmark), 15(2), 157–178.

- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., & Neefjes, J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current Biology*, 11(21), 1680–1685.
- Jouvenet, N., Neil, S. J. D., Bess, C., Johnson, M. C., Virgen, C. A., Simon, S. M., & Bieniasz, P. D. (2006). Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly. *PLoS Biology*, 4(12), e435.
- Julithe, R., Abou-Jaoudé, G., & Sureau, C. (2014). Modification of the Hepatitis B Virus Envelope Protein Glycosylation Pattern Interferes with Secretion of Viral Particles, Infectivity, and Susceptibility to Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, 88(16), 9049–9059.
- Jürgens, M. C., Vörös, J., Rautureau, G. J. P., Shepherd, D. A., Pye, V. E., Muldoon, J., Johnson, C. M., Ashcroft, A. E., ... Ferguson, N. (2013). The hepatitis B virus preS1 domain hijacks host trafficking proteins by motif mimicry. *Nat Chem Biol*, 9(9), 540–547.
- Kann, M., Schmitz, A., & Rabe, B. (2007). Intracellular transport of hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(1), 39–47.
- Katoh, K., Shibata, H., Hatta, K., & Maki, M. (2004). CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421(1), 159–165.
- 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(2), 145–155.
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(8), 461–472.
- Kelly, E. E., Horgan, C. P., Goud, B., & McCaffrey, M. W. (2012). The Rab family of proteins: 25 years on. *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1337 LP-1347.
- Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Hönig, T., Schimpl, A., & Schubert, U. (1997). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med*, 185(7), 1295–1305.
- Kew, M. C. (2011). Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26, 144–152.
- Kian Chua, P., Lin, M.-H., & Shih, C. (2006). Potent inhibition of human Hepatitis B virus replication by

- a host factor Vps4. *Virology*, 354(1), 1–6.
- Kim, M.-S., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., Madugundu, A. K., Kelkar, D. S., ... Pandey, A. (2014). A draft map of the human proteome A. *Nature*, 509(7502), 575–581.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lambert, C., Döring, T., & Prange, R. (2007). Hepatitis B Virus Maturation Is Sensitive to Functional Inhibition of ESCRT-III, Vps4, and γ 2-Adaptin. *Journal of Virology*, 81(17), 9050–9060.
- Lambert, C., & Prange, R. (2001). Dual Topology of the Hepatitis B Virus Large Envelope Protein DETERMINANTS INFLUENCING POST-TRANSLATIONAL PRE-S TRANSLOCATION. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22265–22272.
- Lambert, C., & Prange, R. (2007). Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein. *Virology Journal*, 4, 45.
- Langelier, C., von Schwedler, U. K., Fisher, R. D., De Domenico, I., White, P. L., Hill, C. P., Kaplan, J., Ward, D., & Sundquist, W. I. (2006). Human ESCRT-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release. *Journal of Virology*, 80(19), 9465–9480.
- Lee, C. P., Liu, P. T., Kung, H. N., Su, M. T., Chua, H. H., Chang, Y. H., Chang, C. W., Tsai, C. H., ... Chen, M. R. (2012). The ESCRT Machinery Is Recruited by the Viral BFRF1 Protein to the Nucleus-Associated Membrane for the Maturation of Epstein-Barr Virus. *PLoS Pathogens*, 8(9).
- Lee, L. G., Connell, C. R., & Bloch, W. (1993). by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3761–3766.
- Lefebvre, C., Legouis, R., & Culetto, E. (2017). ESCRT and autophagies: Endosomal functions and beyond. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1–8.
- Leung, J., Yueh, A., Appah, F. S. K., Yuan, B., de los Santos, K., & Goff, S. P. (2006). Interaction of Moloney murine leukemia virus matrix protein with IQGAP. *The EMBO Journal*, 25(10), 2155–2166.
- Li, J., Liu, Y., Wang, Z., Liu, K., Wang, Y., Liu, J., Ding, H., & Yuan, Z. (2011). Subversion of Cellular Autophagy Machinery by Hepatitis B Virus for Viral Envelopment. *Journal of Virology*, 85(13), 6319–6333.
- Li, W. (2015). The Hepatitis B Virus Receptor. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31(1),

125–147.

- Liu, S.-L., Wu, Q.-M., Zhang, L.-J., Wang, Z.-G., Sun, E.-Z., Zhang, Z.-L., & Pang, D.-W. (2014). Three-Dimensional Tracking of Rab5- and Rab7-Associated Infection Process of Influenza Virus. *Small*, *10*(22), 4746–4753.
- Loeb, D. D., Hirsch, R. C., & Ganem, D. (1991). Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *The EMBO Journal*, *10*(11), 3533–40.
- Löffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C., & Prange, R. (2000). Hepatitis B Virus Assembly Is Sensitive to Changes in the Cytosolic S Loop of the Envelope Proteins. *Virology*, *270*(2), 358–367.
- Lorizate, M., & Kräusslich, H.-G. (2011). Role of Lipids in Virus Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(10).
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C., & Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(13), 7626–7631.
- Lu, X., Mehta, A., Dadmarz, M., Dwek, R., Blumberg, B. S., & Block, T. M. (1997). Aberrant trafficking of hepatitis B virus glycoproteins in cells in which N-glycan processing is inhibited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(6), 2380–2385.
- Lu, X., Metha, A., Dwek, R., Butters, T., & Block, T. (1995). Evidence That N-Linked Glycosylation Is Necessary for Hepatitis B Virus Secretion. *Virology*, *213*(2), 660–665.
- Lu, Y., Zhang, Z., Sun, D., Sweeney, S. T., & Gao, F. B. (2013). Syntaxin 13, a genetic modifier of mutant CHMP2B in frontotemporal dementia, is required for autophagosome maturation. *Molecular Cell*, *52*(2), 264–271.
- Mabit, H., & Schaller, H. (2000). Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding. *Journal of Virology*, *74*(24), 11472–8.
- Macovei, A., Petrareanu, C., Lazar, C., Florian, P., & Branza-Nichita, N. (2013). Regulation of Hepatitis B Virus Infection by Rab5, Rab7, and the Endolysosomal Compartment. *Journal of Virology*, *87*(11), 6415–6427.
- Maemoto, Y., Shibata, H., & Maki, M. (2013). Identification of Phosphorylation Sites in the C-Terminal Region of Charged Multivesicular Body Protein 1A (CHMP1A). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *77*(6), 1317–1319.
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., & Schambach, A. (2011). Gammaretroviral vectors: Biology,

- technology and application. *Viruses*, 3(6), 677–713.
- Maldonado, J. O., Martin, J. L., Mueller, J. D., Zhang, W., & Mansky, L. M. (2014). New insights into retroviral Gag–Gag and Gag–membrane interactions. *Frontiers in Microbiology*, 5, 302.
- Manna, D., Aligo, J., Xu, C., Park, W. S., Koc, H., Do Heo, W., & Konan, K. V. (2010). Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation. *Virology*, 398(1), 21–37.
- Marreiros, R., Müller-Schiffmann, A., Bader, V., Selvarajah, S., Dey, D., Lingappa, V. R., & Korth, C. (2015). Viral capsid assembly as a model for protein aggregation diseases: Active processes catalyzed by cellular assembly machines comprising novel drug targets. *Virus Research*, 207(Supplement C), 155–164.
- Marsh, M., & Helenius, A. (2006). Virus entry: Open sesame. *Cell*, 124(4), 729–740.
- Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W., & Bieniasz, P. D. (2005). HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *Journal of Cell Biology*, 168(1), 89–101.
- McCullough, J., Colf, L. A., & Sundquist, W. I. (2013). Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 663–692.
- Melegari, M., Wolf, S. K., & Schneider, R. J. (2005). Hepatitis B Virus DNA Replication Is Coordinated by Core Protein Serine Phosphorylation and HBx Expression. *Journal of Virology*, 79(15), 9810–9820.
- Meng, B., Ip, N. C., Prestwood, L. J., Abbink, T. E., & Lever, A. M. (2015). Evidence that the endosomal sorting complex required for transport-II (ESCRT-II) is required for efficient human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) production. *Retrovirology*, 12(1), 72.
- Moloney, J. B. (1960). Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. i. origin and introductory investigations. *Journal of the National Cancer Institute*, 24(4), 933–951.
- Morikawa, K., Suda, G., & Sakamoto, N. (2016). Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatology Research*, 46(9), 871–877. <https://doi.org/10.1111/hepr.12650>
- Morita, E., Aii, J., Christensen, D., Votteler, J., & Sundquist, W. (2012). Attenuated protein expression vectors for use in siRNA rescue experiments. *BioTechniques*, 1–5.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., & Sundquist, W. I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal*, 26(19), 4215–4227.
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., & Sundquist, W. I. (2011).

- ESCRT-III Protein Requirements for HIV-1 Budding. *Cell Host & Microbe*, 9(3), 235–242.
- Morita, E., & Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus Budding. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 395–425.
- Morrison, H. A., Dionne, H., Rusten, T. E., Brech, A., Fisher, W. W., Pfeiffer, B. D., Celniker, S. E., Stenmark, H., & Bilder, D. (2008). Regulation of Early Endosomal Entry by the Drosophila Tumor Suppressors Rabenosyn and Vps45. *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), 4167–4176.
- Müller, M. P., & Goody, R. S. (2017). Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. *Small GTPases*, 0(0), 1–17.
- Murrow, L., Malhotra, R., & Debnath, J. (2015). ATG12-ATG3 Interacts with Alix to Promote Basal Autophagic Flux and Late Endosome Function. *Nature Cell Biology*, 17(3), 300–310.
- Na, T.-Y., Shin, Y. K., Roh, K. J., Kang, S.-A., Hong, I., Oh, S. J., Seong, J. K., Park, C. K., ... Lee, M.-O. (2009). Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein–induced lipogenesis in hepatitis B virus–associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 49(4), 1122–1131.
- Nachmias, D., Sklan, E. H., Ehrlich, M., & Bacharach, E. (2012). Human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins traffic toward virion assembly sites via a TBC1D20/Rab1-regulated pathway. *Retrovirology*, 9, 7.
- Naghavi, M. H., Hatzioannou, T., Gao, G., & Goff, S. P. (2005). Overexpression of fasciculation and elongation protein ζ -1 (FEZ1) induces a post-entry block to retroviruses in cultured cells. *Genes & Development*, 19(9), 1105–1115.
- 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. *Journal of Virology*, 66(7), 4107–4116.
- Nassal, M. (2008). Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Research*, 134(1), 235–249.
- Nevo-Yassaf, I., Yaffe, Y., Asher, M., Ravid, O., Eizenberg, S., Henis, Y. I., Nahmias, Y., Hirschberg, K., & Sklan, E. H. (2012). Role for TBC1D20 and Rab1 in Hepatitis C Virus Replication via Interaction with Lipid Droplet-Bound Nonstructural Protein 5A. *Journal of Virology*, 86(12), 6491–6502.
- Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B., & Zerial, M. (2000). Rabenosyn-5, a Novel Rab5 Effector, Is Complexed with Hvps45 and Recruited to Endosomes through a Fyve Finger Domain. *The Journal of Cell Biology*, 151(3), 601–

612.

- Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S., & Kaibuchi, K. (2005). IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *Journal of Cell Science*, *118*(10), 2085 LP-2092.
- Odorizzi, G. (2015). Membrane manipulations by the ESCRT machinery. *F1000Research*, *4*, 1–9.
- Oshima, M., Muriaux, D., Mirro, J., Nagashima, K., Dryden, K., Yeager, M., & Rein, A. (2004). Effects of Blocking Individual Maturation Cleavages in Murine Leukemia Virus Gag. *Journal of Virology*, *78*(3), 1411–1420.
- Ott, D. E., Coren, L. V, Chertova, E. N., Gagliardi, T. D., & Schubert, U. (2000). Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology*, *278*(1), 111–121.
- Ott, D. E., Coren, L. V, Copeland, T. D., Kane, B. P., Johnson, D. G., Sowder, R. C., Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., ... Henderson, L. E. (1998). Ubiquitin Is Covalently Attached to the p6(Gag) Proteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus and to the p12(Gag) Protein of Moloney Murine Leukemia Virus. *Journal of Virology*, *72*(4), 2962–2968.
- Overbaugh, J., Miller, A. D., & Eiden, M. V. (2001). Receptors and Entry Cofactors for Retroviruses Include Single and Multiple Transmembrane-Spanning Proteins as well as Newly Described Glycophosphatidylinositol-Anchored and Secreted Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *65*(3), 371–389.
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., & Fujimoto, T. (2005). Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *Journal of Cell Science*, *118*(12), 2601 LP-2611.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., & Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes and Development*, *16*(8), 948–958.
- Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., ... Wills, J. W. (1995). Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *Journal of Virology*, *69*(9), 5455–5460.
- Park, M. (2015). Abstract A31: Posttranslational modifications of Chmp1A and their effects on human pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, *75*(13 Supplement), A31 LP-A31.
- Parkinson, M. D. J., Piper, S. C., Bright, N. A., Evans, J. L., Boname, J. M., Bowers, K., Lehner, P. J., & Luzio, J. P. (2015). A non-canonical ESCRT pathway, including histidine domain phosphotyrosine phosphatase (HD-PTP), is used for down-regulation of virally ubiquitinated MHC

- class I. *Biochemical Journal*, 471(1), 79–88.
- Patient, R., Hourieux, C., & Roingard, P. (2009). Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cellular Microbiology*, 11(11), 1561–1570.
- Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.-Y., Trassard, S., Sureau, C., & Roingard, P. (2007). Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking. *Journal of Virology*, 81(8), 3842–3851.
- 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. *Journal of Virology*, 58(3), 884–892.
- Pechenick Jowers, T., Featherstone, R. J., Reynolds, D. K., Brown, H. K., James, J., Prescott, A., Haga, I. R., & Beard, P. M. (2015). RAB1A promotes Vaccinia virus replication by facilitating the production of intracellular enveloped virions. *Virology*, 475, 66–73.
- Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., & Weissenhorn, W. (2011). Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(4), 199–210.
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E., & Zerial, M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*, 436(7047), 78–86.
- Pfeffer, S. R. (2017). Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 28(6), 712–715.
- Pincetic, A., Medina, G., Carter, C., & Leis, J. (2008). Avian sarcoma virus and human immunodeficiency virus, type 1 use different subsets of ESCRT proteins to facilitate the budding process. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29822–29830.
- Ploen, D., & Hildt, E. (2015). Hepatitis C virus comes for dinner: How the hepatitis C virus interferes with autophagy. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(28), 8492–8507.
- 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. *Journal of Virology*, 77(1), 416–422.
- Possehl, C., Repp, R., Heermann, K.-H., Korec, E., Uy, A., & Gerlich, W. H. (1992). Absence of free core antigen in anti-HBc negative viremic hepatitis B carriers BT - Chronically Evolving Viral Hepatitis. In C. De Bac, G. Taliani, & W. H. Gerlich (Eds.) (pp. 39–41). Vienna: Springer Vienna.
- Prange, R. (2012). Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Medical*

Microbiology and Immunology, 201(4), 449–461.

- Prizan-Ravid, A., Elis, E., Laham-Karam, N., Selig, S., Ehrlich, M., & Bacharach, E. (2010). The Gag Cleavage Product, p12, is a Functional Constituent of the Murine Leukemia Virus Pre-Integration Complex. *PLOS Pathogens*, 6(11), 1–19.
- 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. *Journal of Virology*, 71(9), 6541–6546.
- Qiao, M., Macnaughton, T. B., & Gowans, E. J. (1994). Adsorption and Penetration of Hepatitis B Virus in a Nonpermissive Cell Line. *Virology*, 201(2), 356–363.
- Rabe, B., Glebe, D., & Kann, M. (2006). Lipid-Mediated Introduction of Hepatitis B Virus Capsids into Nonsusceptible Cells Allows Highly Efficient Replication and Facilitates the Study of Early Infection Events. *Journal of Virology*, 80(11), 5465–5473.
- Rabe, B., Vlachou, A., Panté, N., Helenius, A., & Kann, M. (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 9849–9854.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E., & Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of Cell Science*, 114(12), 2255 LP-2263.
- Raiborg, C., Wesche, J., Malerød, L., & Stenmark, H. (2006). Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *Journal of Cell Science*, 119(12), 2414 LP-2424.
- Rauch, S., & Martin-Serrano, J. (2011). Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding. *Journal of Virology*, 85(7), 3546–3556.
- Raymond, C. K., I, H.-S., 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(12), 1389–1402.
- Rein, A. (2011). Murine leukemia viruses: Objects and organisms. *Advances in Virology*, 2011.
- Rein, A., McClure, M. R., Rice, N. R., Luftig, R. B., & Schultz, A. M. (1986). Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19), 7246–50.
- Robinson, W. S. (1977). The Genome of Hepatitis B Virus. *Annual Review of Microbiology*, 31(1), 357–

377.

- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., & Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO Journal*, *12*(5), 2099–2108.
- Romanov, J., Walczak, M., Ibricu, I., Schüchner, S., Ogris, E., Kraft, C., & Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO Journal*, *31*(22), 4304–4317.
- Romero-Brey, I., & Bartenschlager, R. (2016). Endoplasmic Reticulum: The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. *Viruses*.
- Rost, M., Döring, T., & Prange, R. (2008). γ 2-Adaptin, a Ubiquitin-interacting Adaptor, Is a Substrate to Coupled Ubiquitination by the Ubiquitin Ligase Nedd4 and Functions in the Endosomal Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(46), 32119–32130.
- Rost, M., Mann, S., Lambert, C., Döring, T., Thomé, N., & Prange, R. (2006). γ 2-Adaptin, a Novel Ubiquitin-interacting Adaptor, and Nedd4 Ubiquitin Ligase Control Hepatitis B Virus Maturation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(39), 29297–29308.
- Rothnie, H. M., Chapdelaine, Y., & Hohn, T. (1994). *Pararetroviruses and Retroviruses: A Comparative Review of Viral Structure and Gene Expression Strategies. Advances in virus research* (Vol. 44).
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Suka, N., Turner, B. M., & Grunstein, M. R. (1998). Letters To Nature. *Nature*, *8060*(1997), 831–835.
- Sabo, Y., Laham-Karam, N., & Bacharach, E. (2008). Basal budding and replication of the murine leukemia virus are independent of the gag L domains. *Journal of Virology*, *82*(19), 9770–9775.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., ... Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Developmental Cell*, *20*(1), 131–139.
- Salloum, S., Wang, H., Ferguson, C., Parton, R. G., & Tai, A. W. (2013). Rab18 Binds to Hepatitis C Virus NS5A and Promotes Interaction between Sites of Viral Replication and Lipid Droplets. *PLoS Pathogens*, *9*(8), e1003513.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sandrin, V., & Sundquist, W. I. (2013). ESCRT requirements for EIAV budding. *Retrovirology*, *10*(1), 104.
- Schlicht, H.-J., Wasenauer, G., & Köck, J. (1993). Molecular basis of the diversity of hepatitis B virus

- core-gene products BT - Research in Chronic Viral Hepatitis. In W. H. Gerlich (Ed.) (pp. 43–52). Vienna: Springer Vienna.
- Schulze, A., Gripon, P., & Urban, S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein–dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, *46*(6), 1759–1768.
- Seabra, M. C., & Coudrier, E. (2004). Rab GTPases and Myosin Motors in Organelle Motility. *Traffic*, *5*(6), 393–399.
- Segura-Morales, C., Pescia, C., Chatellard-Causse, C., Sadoul, R., Bertrand, E., & Basyuk, E. (2005). Tsg101 and Alix Interact with Murine Leukemia Virus Gag and Cooperate with Nedd4 Ubiquitin Ligases during Budding. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 27004–27012.
- Seo, J.-Y., Yaneva, R., Hinson, E. R., & Cresswell, P. (2011). Human Cytomegalovirus Directly Induces the Antiviral Protein Viperin to Enhance Infectivity. *Science*, *332*(6033), 1093–1097.
- Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., & Bartenschlager, R. (2007). The Lipid Droplet Binding Domain of Hepatitis C Virus Core Protein Is a Major Determinant for Efficient Virus Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(51), 37158–37169.
- Sherer, N. M., Lehmann, M. J., Jimenez-Soto, L. F., Ingmundson, A., Horner, S. M., Cicchetti, G., Allen, P. G., Pypaert, M., ... Mothes, W. (2003). Visualization of Retroviral Replication in Living Cells Reveals Budding into Multivesicular Bodies. *Traffic*, *4*(11), 785–801.
- Shestakova, A., Hanono, A., Drosner, S., Curtiss, M., Davies, B. A., Katzmann, D. J., & Babst, M. (2010). Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(6), 1059–1071.
- Shim, S., Merrill, S. A., & Hanson, P. I. (2008). Novel Interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their Implications for ESCRT-III Disassembly. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(6), 2661–2672.
- Shin, H.-W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M. R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., ... Zerial, M. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *The Journal of Cell Biology*, *170*(4), 607 LP-618.
- Shinnick, T., Lerner, R., & Sutcliffe, J. G. (1981). Nucleotide Sequence of Moloney Murine Leukemia Virus. *Nature*, *293*, 543–548.
- Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S., & Elazar, Z. (2011). Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology*, *12*(7), 226.
- Simonsen, A., Gaullier, J.-M., D'Arrigo, A., & Stenmark, H. (1999). The Rab5 Effector EEA1 Interacts

- Directly with Syntaxin-6. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 28857–28860.
- Sir, D., Tian, Y., Chen, W., Ann, D. K., Yen, T.-S. B., & Ou, J. J. (2010). The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4383–4388.
- Sklan, E. H., Serrano, R. L., Einav, S., Pfeffer, S. R., Lambright, D. G., & Glenn, J. S. (2007). TBC1D20 Is a Rab1 GTPase-activating Protein That Mediates Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36354–36361.
- Sohn, S.-Y., Kim, S.-B., Kim, J., & Ahn, B.-Y. (2006). Negative regulation of hepatitis B virus replication by cellular Hsp40/DnaJ proteins through destabilization of viral core and X proteins. *Journal of General Virology*, 87(7), 1883–1891.
- Sommerfelt, M. A. (1999). Retrovirus receptors. *Journal of General Virology*, 80(12), 3049–3064.
- Spearman, P. (2017). Viral Interactions with Host Cell Rab GTPases. *Small GTPases*, 1248(July).
- Starr, T., Sun, Y., Wilkins, N., & Storrie, B. (2010). Rab33b and Rab6 are functionally overlapping regulators of Golgi homeostasis and trafficking. *Traffic*, 11(5), 626–636.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 513–525.
- Stieler, J. T., & Prange, R. (2014). Involvement of ESCRT-II in hepatitis B virus morphogenesis. *PLoS ONE*, 9(3), 15–18.
- Stone, R., Hayashi, T., Bajimaya, S., Hodges, E., & Takimoto, T. (2016). Critical role of Rab11a-mediated recycling endosomes in the assembly of type I parainfluenza viruses. *Virology*, 487, 11–18.
- Stoye, J. P., & Coffin, J. M. (1987). The Four Classes of Endogenous Murine Leukemia Virus: Structural Relationships and Potential for Recombination. *Journal of Virology*, Sept, 61(9), 2659–2669.
- Stuchell-Brereton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghaffarian, S., & Sundquist, W. I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, 449(7163), 740–744.
- Sundquist, W. I., & Krausslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Suzuki, Y., Yang, H., & Craigie, R. (2004). LAP2 α and BAF collaborate to organize the Moloney murine leukemia virus preintegration complex. *The EMBO Journal*, 23(23), 4670–4678.
- Tabata, K., Arimoto, M., Arakawa, M., Nara, A., Saito, K., Omori, H., Arai, A., Ishikawa, T., ... Morita, E.

- (2017). Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Reports*, 16(9), 2339–2347.
- Tang, H., Da, L., Mao, Y., Li, Y., Li, D., Xu, Z., Li, F., Wang, Y., ... Zhao, M. (2009). Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology*, 49(1), 60–71.
- Teo, H., Perisic, O., González, B., & Williams, R. L. (2004). ESCRT-II, an Endosome-Associated Complex Required for Protein Sorting. *Developmental Cell*, 7(4), 559–569.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 4(5), 346–358.
- Tian, Y., Sir, D., Kuo, C., Ann, D. K., & Ou, J. J. (2011). Autophagy Required for Hepatitis B Virus Replication in Transgenic Mice. *Journal of Virology*, 85(24), 13453–13456.
- Tooze, S. A., & Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*, 12(9), 831–835.
- Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(1), 1–22.
- Tsuruyama, T., Hiratsuka, T., & Yamada, N. (2016). Hotspots of MLV integration in the hematopoietic tumor genome. *Oncogene*.
- Tur-Kaspa, R., Burk, R. D., Shaul, Y., & Shafritz, D. A. (1986). Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(6), 1627–31.
- 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 Pr55(Gag). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 7724–9.
- Vild, C. J., Li, Y., Guo, E. Z., Liu, Y., & Xu, Z. (2015). A Novel Mechanism of Regulating the ATPase VPS4 by Its Cofactor LIP5 and the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)-III Protein CHMP5. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 7291–7303.
- Votteler, J., & Sundquist, W. I. (2013). Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host and Microbe*, 14(3), 232–241.
- Walczak, M., & Martens, S. (2013). Dissecting the role of the Atg12–Atg5–Atg16 complex during

- autophagosome formation. *Autophagy*, 9(3), 424–425.
- Wang, G. H., & Seeger, C. (1993). Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *Journal of Virology*, 67(11), 6507–6512.
- Wang, M. Q., Kim, W., Gao, G., Torrey, T. A., Morse 3rd, H. C., De Camilli, P., & Goff, S. P. (2003). Endophilins interact with Moloney murine leukemia virus Gag and modulate virion production. *J Biol*, 3(1), 4.
- Wang, T., & Hong, W. (2006). RILP interacts with VPS22 and VPS36 of ESCRT-II and regulates their membrane recruitment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(2), 413–423.
- Ward, D. M., Vaughn, M. B., Shiflett, S. L., White, P. L., Pollock, A. L., Hill, J., Schnegelberger, R., Sundquist, W. I., & Kaplan, J. (2005). The Role of LIP5 and CHMP5 in Multivesicular Body Formation and HIV-1 Budding in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10548–10555.
- Watanabe, T., Sorensen, E. M., Naito, A., Schott, M., Kim, S., & Ahlquist, P. (2007). Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10205–10210.
- Webster, C. P., Smith, E. F., Bauer, C. S., Moller, A., Hautbergue, G. M., Ferraiuolo, L., Myszczyńska, M. A., Higginbottom, A., ... De Vos, K. J. (2016). The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *The EMBO Journal*, 35(15), 1656–1676.
- Weidberg, H., Shvets, E., & Elazar, Z. (2011). Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 125–156.
- Weiss, E. R., Popova, E., Yamanaka, H., Kim, H. C., Huibregtse, J. M., & Göttlinger, H. (2010). Rescue of HIV-1 release by targeting widely divergent NEDD4-type ubiquitin ligases and isolated catalytic HECT domains to gag. *PLoS Pathogens*, 6(9).
- Weissman, J. D., Brown, J. A., Howcroft, T. K., Hwang, J., Chawla, A., Roche, P. A., Schiltz, L., Nakatani, Y., & Singer, D. S. (1998). HIV-1 Tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11601–11606.
- Welsch, S., Müller, B., & Kräusslich, H.-G. (2007). More than one door – Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Letters*, 581(11), 2089–2097.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R., & Schaller, H. (1987).

- Replication strategy of human hepatitis B virus. *Journal of Virology*, 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. *Journal of Virology*, 68(10), 6605–18.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., & Hurley, J. H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458(7235), 172–177.
- Woolhouse, M., & Gaunt, E. (2007). Ecological origins of novel human pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(4), 231–242.
- Woolhouse, M., Scott, F., Hudson, Z., Howey, R., & Chase-Topping, M. (2012). Human viruses: discovery and emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1604), 2864–2871.
- Wu, X., Wang, F., Rao, K., Sellers, J. R., & Hammer, J. A. (2002). Rab27a Is an Essential Component of Melanosome Receptor for Myosin Va. *Molecular Biology of the Cell*, 13(5), 1735–1749.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., ... Li, W. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1, e00049.
- Yang, D., Rismanchi, N., Renvoisé, B., Lippincott-Schwartz, J., Blackstone, C., & Hurley, J. H. (2008). Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(12), 1278–1286.
- Yeager, M., Wilson-Kubalek, E. M., Weiner, S. G., Brown, P. O., & Rein, A. (1998). Supramolecular organization of immature and mature murine leukemia virus revealed by electron cryo-microscopy: implications for retroviral assembly mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7299–7304.
- Yorikawa, C., Shibata, H., Waguri, S., Hatta, K., Horii, M., Katoh, K., Kobayashi, T., Uchiyama, Y., & Maki, M. (2005). Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *The Biochemical Journal*, 387(Pt 1), 17–26.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T. D., & Oroszlan, S. (1985). Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(6), 1618–16122.
- Yuan, B., Fassati, A., Yueh, A., Goff, S. P., Stephen, P., & Goff, S. P. (2002). Characterization of

- Moloney Murine Leukemia Virus p12 Mutants Blocked during Early Events of Infection. *Journal of Virology*, 76(21), 10801–10810.
- Yuan, B., Xingqiang, L., & 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 Journal*, 18(17), 4700–4710.
- Yueh, A., & Goff, S. P. (2003). Phosphorylated Serine Residues and an Arginine-Rich Domain of the Moloney Murine Leukemia Virus p12 Protein Are Required for Early Events of Viral Infection Phosphorylated Serine Residues and an Arginine-Rich Domain of the Moloney Murine Leukemia Virus p1, 77(3), 1820–1829.
- Zeisel, M. B., Lucifora, J., Mason, W. S., Sureau, C., Beck, J., Levrero, M., Kann, M., Knolle, P. A., ... Zoulim, F. (2015). Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions—report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut*, 64(8), 1314–1326.
- Zenner, H. L., Yoshimura, S., Barr, F. A., & Crump, C. M. (2011). Analysis of Rab GTPase-Activating Proteins Indicates that Rab1a/b and Rab43 Are Important for Herpes Simplex Virus 1 Secondary Envelopment. *Journal of Virology*, 85(16), 8012–8021.
- Zhang, F. L., & Casey, P. J. (1996). Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 241–269.
- Zhang, F., Zang, T., Wilson, S. J., Johnson, M. C., & Bieniasz, P. D. (2011). Clathrin facilitates the morphogenesis of retrovirus particles. *PLoS Pathogens*, 7(6).
- Zhang, H., Wang, Y., Wong, J. J. L., Lim, K. L., Liou, Y. C., Wang, H., & Yu, F. (2014). Endocytic Pathways Downregulate the L1-type Cell Adhesion Molecule Neuroglian to Promote Dendrite Pruning in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 30(4), 463–478.
- Zlotnick, A., Venkatakrishnan, B., Tan, Z., Lewellyn, E., Turner, W., & Francis, S. (2015). Core protein: a pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. *Antiviral Research*, 121, 82–93.
- Zoppino, F. C. M., Militello, R. D., Slavin, I., Álvarez, C., & Colombo, M. I. (2010). Autophagosome formation depends on the small GTPase rab1 and functional ER exit sites. *Traffic*, 11(9), 1246–1261.