

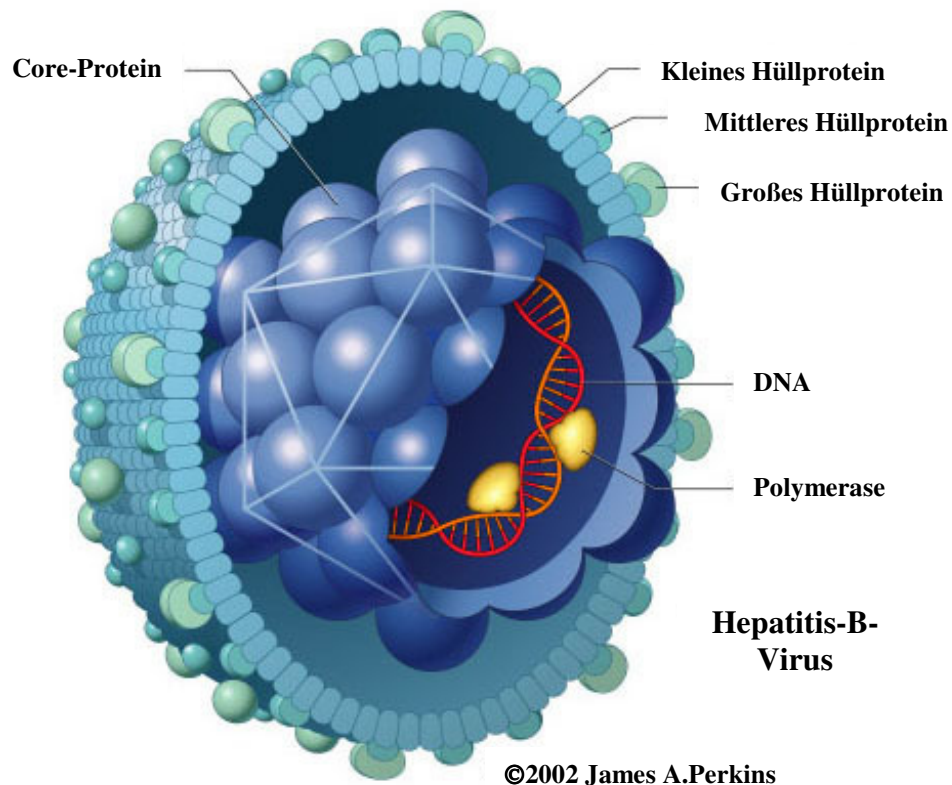
**Virus/Wirt-Interaktionen bei
Hepatitis-B-Virus Infektionen:
Die Rolle von $\gamma 2$ -Adaptin**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Nicole Thomé
aus Schweinfurt

Mainz, den 17.07.2007



Indes weiß man so viel als gar nichts von dem Ganzen in allen Dingen, es sei denn mit Hilfe der Einzelheiten, und die Natur ist für den Menschen nur eine Sammlung von sibyllinischen Blättern, welche zerstreut sind und bis auf den heutigen Tag nicht zu einem Buche haben vereinigt werden können.

Madame de Staël, 1813

Inhaltsverzeichnis:

I.	EINLEITUNG	1
1.	Das Hepatitis-B-Virus	1
1.1	Die Familie der Hepadnaviridae.....	1
1.2	Das humane Hepatitis-B-Virus.....	2
1.3	Die Struktur des Hepatitis-B-Virus.....	3
1.4	Die Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus.....	4
1.5	Die HBV-Hüllproteine und ihre Rolle bei der Virusmorphogenese.....	6
1.6	Der Infektionszyklus des Hepatitis-B-Virus.....	9
2.	Virus/Wirt-Interaktion des Hepatitis-B-Virus	12
2.1	Intrazelluläre Transportmechanismen der Eucyte.....	12
2.2	Der Vesikeltransport der Eucyte.....	14
2.3	Clathrin.....	15
2.4	Adaptorprotein-Komplexe.....	16
2.5	γ 2-Adaptin.....	17
2.6	Funktion von γ 2-Adaptin bei der HBV-Morphogenese.....	18
3.	„Gene-Silencing“	20
3.1	Der RNAi-Mechanismus – Das Modell.....	21
3.2	pSuper-vermittelte RNAi.....	22
4.	Zielsetzung	24
II.	MATERIAL	26
1.	Zelllinien	26
1.1	Prokaryonten.....	26
1.2	Eukaryonten.....	26
2.	Medien	27
2.1	Zellkulturmedium.....	27
2.2	Transfektionsmedium.....	27
3.	Inhibitoren des Protein-Abbaus	27
3.1	Proteasom-Inhibitoren.....	27
3.2	Lysosom-Inhibitoren.....	27
4.	Plasmide	28
4.1	Plasmide des HBV-Genoms.....	28
4.2	Fluoreszierende Plasmide.....	29

4.3	Plasmide der HBV-Hüllproteine	30
4.4	Plasmide der Adaptine	31
4.5	Plasmide der pSuper-Konstrukte	32
4.6	Bicistronische Plasmide	33
5.	Primer	34
5.1	DNA-Primer	34
5.1.1	Sequenzierung von pcDNA3-HA.γ2	34
5.1.2	Klonierung der pSuper-Silencing-Konstrukte	34
5.2	RNA-Primer	35
5.2.1	Kontroll-siRNAs	35
5.2.2	γ2-Adaptin-siRNAs	35
6.	Antikörper	36
6.1	Primäre Antikörper	36
6.2	Sekundäre Antikörper	37
6.3	Immunseren	37
7.	Molekulargewichtsmarker	38
7.1	DNA-Gewichtsmarker	38
7.2	Protein-Gewichtsmarker	38
8.	Zentrifugen	38
III.	METHODEN	39
1.	Molekularbiologische Methoden	39
2.	Zellbiologische Methoden	40
2.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	40
2.2	Einfrieren von eukaryontischen Zellen	40
2.3	Auftauen von eukaryontischen Zellen	41
2.4	Transiente Proteinexpression	41
2.4.1	Lipofectamine Plus ^{TM120}	41
2.4.2	Lipofectamine TM 2000	42
2.5	Aufarbeitung nach Transfektion	43
2.5.1	Überstände	43
2.5.2	Zelllyse	43
2.5.3	Zellkernpräparation	43
2.6	Inhibition von proteasomalem und lysosomalem Abbau in HuH7-Zellen	44

3.	Immunologische Methoden	45
3.1	Koimmunpräzipitation	45
3.2	HBsAg-ELISA (Abbott)	45
3.3	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	46
4.	RNA-Interferenz	48
4.1	Target-Auswahl	48
4.2	Vektor-basierte RNAi (pSuper)	49
4.2.1	Herstellung der pSuper-Konstrukte	49
4.3	siRNA (Qiagen)	49
4.3.1	Herstellung doppelsträngiger siRNAs	49
4.3.2	Transfektion von siRNAs	50
4.3.2.1	RNAiFect TM	50
4.3.2.2	TransMessenger TM	50
5.	Nachweis von HBV-DNA mit Southern-Dot-Blot	52
5.1	Virusproduktion	52
5.2	Immunpräzipitation der Viren	52
5.3	Extraktion der viralen DNA	53
5.4	Dot-Blot	53
5.5	Southern-Blot	54
5.5.1	DIG-Markierung der Sonde	54
5.5.2	Überprüfung der Markierungseffizienz	55
5.5.3	Hybridisierung und Detektion	55
IV.	ERGEBNISSE	57
1.	Nachweis von endogenem γ2-Adaptin	57
2.	Sequenzierung des Vektors pcDNA3-HA.γ2	59
3.	Etablierung eines HBV-Nachweises mit Southern-Dot-Blot	60
4.	Etablierung der RNAi-Technik	62
4.1	Vektor-basierte RNAi (pSuper)	63
4.1.1	Kontrollen der Vektor-basierten RNAi	63
4.2	RNAi mit synthetisch-hergestellten siRNAs	64
4.2.1	Kontrollen der siRNA-basierenden RNAi	64
5.	Etablierung der „Live Cell Imaging“-Technik	65
6.	Interaktion von γ2-Adaptin mit dem HBV-L-Hüllprotein	66

6.1	Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins.....	66
6.2	Intrazelluläre Kolokalisation von L und $\gamma 2$ -Adaptin.....	67
6.3	„Live Cell Imaging“ der $\gamma 2$ /L-Interaktion	68
6.3.1	Differentielle GFP-Markierung.....	68
6.3.2	Charakterisierung der GFP-Konstrukte.....	69
6.3.2.1	Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Autofluoreszenz	69
6.3.2.2	Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Koimmunpräzipitation	70
6.3.3	Rekrutierung von CFP- $\gamma 2$ durch L-YFP in COS7-Zellen	71
6.3.4	Rekrutierung von CFP- $\gamma 2$ in EcR-LHA-293-Zellen	72
6.3.5	„Live Cell Imaging“ der Rekrutierung von CFP- $\gamma 2$ in EcR-LHA-293-Zellen	73
7.	Die Bedeutung struktureller Domänen des $\gamma 2$-Adaptins für die Interaktion mit dem L-Hüllprotein.....	75
7.1	Vorstellung der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte.....	75
7.2	$\gamma 2$ /L-Interaktion ist von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig.....	76
7.3	Rekrutierung des $\gamma 2$ -Adaptins durch L ist von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig.....	77
8.	Interaktion von $\gamma 2$-Adaptin mit weiteren HBV-Proteinen?	79
8.1	Mögliche Interaktion des $\gamma 2$ -Adaptins mit dem HBV-Coreprotein	79
9.	Silencing des $\gamma 2$-Adaptins	81
9.1	Vektor-basierte $\gamma 2$ -Adaptin-RNAi	81
9.1.1	Silencing des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in HuH7-Zellen	81
9.1.2	Transkriptionsverstärkung des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in COS7-Zellen.....	83
9.1.3	Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in HBV-replizierenden Zellen	84
9.2	$\gamma 2$ -Adaptin-RNAi mit synthetisch-hergestellten siRNAs.....	85
9.2.1	Silencing des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HuH7-Zellen	85
9.2.2	Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HBV-replizierenden Zellen.....	87
10.	Überexpression von $\gamma 2$-Adaptin.....	90
10.1	Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin reduziert den intrazellulären L-Pool.....	90
10.2	Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Dosis-/Konzentrationsabhängigkeit.....	92
10.3	Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Leberzell-spezifischen Effekt.....	92
10.4	Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin beeinflusst die HBV-Freisetzung.....	93

10.5	Überexpression von γ 2-Adaptin führt zur Proteolyse von L.....	97
10.6	Lysosomale Inhibition hat Einfluss auf HBV-Produktion.....	98
V.	DISKUSSION.....	101
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
VIII.	ANHANG.....	128
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	128
2.	Abbildungsverzeichnis.....	131
3.	Tabellenverzeichnis.....	133

I. EINLEITUNG

1. Das Hepatitis-B-Virus

1.1 Die Familie der Hepadnaviridae

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) gehört taxonomisch zur Virus-Familie der *Hepadnaviridae* (Hepatitis-DNA-Viren), die sich durch ihren Replikationsmechanismus über ein RNA-Intermediat und ihr begrenztes Wirtsspektrum auszeichnen. Die Hepadnaviren sind umhüllte Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom, die sich spezifisch in Hepatozyten vermehren. Sie werden unterteilt in Hepadnaviren der Säugetiere (*Orthohepadnaviridae*) und der Vögel (*Avihepadnaviridae*). In der folgenden Tabelle findet sich eine Übersicht derzeit bekannter Hepadnaviren.

Orthohepadnavirus	Spezies	Erstbeschreibung
Hepatitis-B-Virus (HBV)	Mensch <i>Homo sapiens sapiens</i>	Dane <i>et al.</i> , 1970
Chimpanzee Hepatitis-B-Virus (ChHBV)	Schimpanse <i>Pan troglodytes</i>	Vaudin <i>et al.</i> , 1988
Gibbon Hepatitis-B-Virus (GiHBV)	Weißhandgibbon <i>Hylobates lar</i>	Norder <i>et al.</i> , 1996
Orang Utan Hepatitis-B-Virus (OuHBV)	Orang-Utan <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>	Warren <i>et al.</i> , 1999
Gorilla Hepatitis-B-Virus (GoHBV)	Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>	Grethe <i>et al.</i> , 2000
Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus (WMHBV)	Wollaffe <i>Lagothrix lagotricha</i>	Lanford <i>et al.</i> , 1998
Woodchuck Hepatitis-Virus (WHV)	Waldmurmeltier <i>Marmota monax</i>	Summers <i>et al.</i> , 1978
Ground squirrel Hepatitis-Virus (GSHV)	Erdhörnchen <i>Spermophilus beecheyi</i>	Marion <i>et al.</i> , 1980
Arctic Ground squirrel Hepatitis-Virus (AGSHV)	Arktisches Erdhörnchen <i>Spermophilus parryi</i>	Testut <i>et al.</i> , 1996

Tab. 1: Übersicht derzeit bekannter Orthohepadnaviren.

Avihepadnavirus	Spezies	Erstbeschreibung
Duck Hepatitis-B-Virus (DHBV)	Stock-Ente <i>Anas domestica</i>	Mason <i>et al.</i> , 1980
Heron Hepatitis-B-Virus (HHBV)	Graureiher <i>Adrea cinerea</i>	Sprengel <i>et al.</i> , 1988
Ross Goose Hepatitis-B-Virus (RGHBV)	Ross-Gans <i>Anser rossi</i>	Testut <i>et al.</i> , 1996
Snow Goose Hepatitis-B-Virus (SGHBV)	Schneegans <i>Anser caerulescens</i>	Chang <i>et al.</i> , 1999
Maned Duck Hepatitis-B-Virus (MDHBV)	Mähnenente <i>Chenonetta jubata</i>	Li <i>et al.</i> , 1998
Grey Teal Hepatitis-B-Virus (GTHBV)	Weißkehlente <i>Anas gibberifrons gracilis</i>	Li <i>et al.</i> , 1998
Stork Hepatitis-B-Virus (STHBV)	Weißstorch <i>Ciconia ciconia</i>	Pult <i>et al.</i> , 2001

Tab. 2: Übersicht derzeit bekannter Avihepadnaviren.

1.2 Das humane Hepatitis-B-Virus

Die durch das humane Hepatitis-B-Virus hervorgerufene Infektion beim Menschen zeigt unterschiedliche klinische Manifestationen. Sie reichen von der inapparenten Verlaufsform in etwa 50% der Fälle bis zur fulminanten Hepatitis mit Todesfolge (Payne *et al.*, 1996). Während in den meisten Fällen die Infektion mit nachfolgender Immunität ausheilt, nimmt sie bei ca. 10% der Infizierten einen chronischen Verlauf. In diesen Fällen ist das Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (Beasley *et al.*, 1981) oder an Leberzirrhose zu erkranken, etwa 200 mal höher als bei Nichtinfizierten. Mit weltweit über 350 Millionen chronisch-infizierten Menschen ist das HBV eines der bedeutendsten viralen Krankheitserreger. Das Virus infiziert durch parenterale Übertragung mit infektiösem Blut, Blutderivaten oder anderen Körperflüssigkeiten und kann auch peri- oder postnatal auf Säuglinge übertragen werden, deren Immunsystem noch kaum entwickelt ist. Daher verlaufen hier die Infektionen fast ausschließlich chronisch. Diese chronisch Infizierten stellen ein Reservoir dar, über das eine weitere Verbreitung erfolgen kann.

1.3 Die Struktur des Hepatitis-B-Virus

Das sphärische Hepatitis-B-Virus-Partikel besteht aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid, das sich aus 240 monomeren Untereinheiten, den Coreproteinen, welche ein Molekulargewicht von 21 kDa besitzen (Tiollais *et al.*, 1985), zusammensetzt. Es enthält das Virus-Genom, bestehend aus einer zirkulären, partiell-doppelsträngigen DNA (Robinson *et al.*, 1974) und einer Polymerase (Kaplan *et al.*, 1973). Umschlossen wird das Nukleokapsid von einer lipidhaltigen Hülle, welche viruskodierende Oberflächenproteine enthält (Stibbe und Gerlich, 1982; Heermann *et al.*, 1984; Neurath *et al.*, 1985). Dieser ca. 42nm große infektiöse Partikel (Abb. 1) wird nach seinem Entdecker auch Dane-Partikel genannt (Dane *et al.*, 1970).

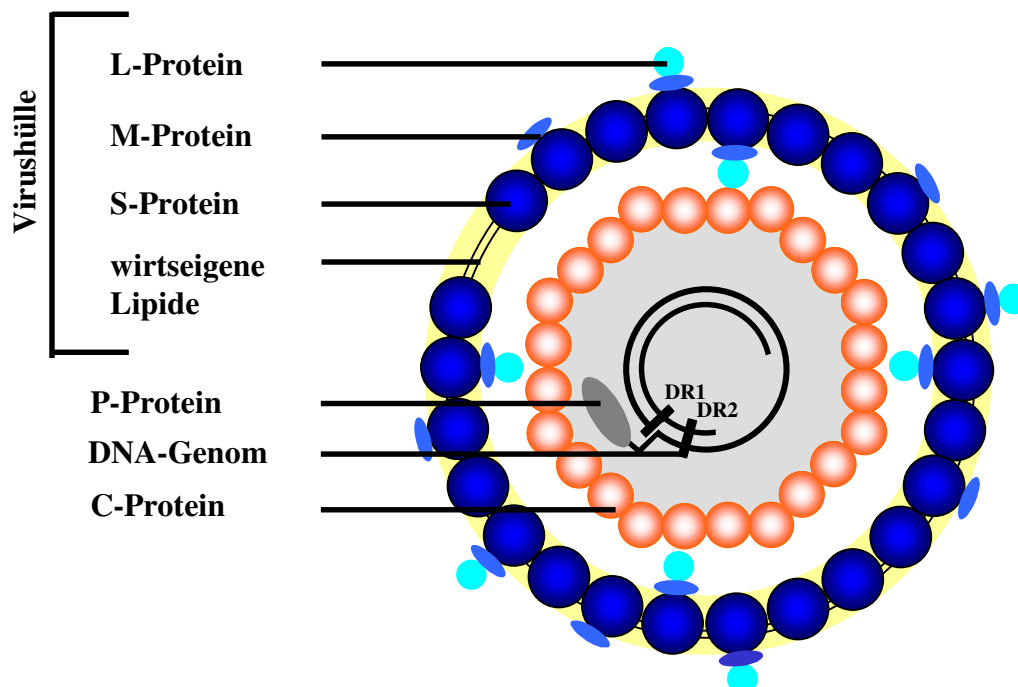


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Dane-Partikels des Hepatitis-B-Virus.

Das Hepatitis-B-Virus besteht aus einem partiell-doppelsträngigem DNA-Genom, das mit den Coreproteinen (C-Protein) zu einem ikosaedrischen Nukleokapsid assoziiert ist. Dieses wird von einer Lipidmembran umhüllt, in welche die drei Formen der viralen Hüllproteine (L-, M- und S-Protein) eingelagert sind. Das virale Genom ist am 5'-Ende des vollständigen Minusstrangs kovalent mit der viralen Polymerase (P-Protein) verbunden. DR1 und DR2 sind Sequenzwiederholungen, die bei der Replikation des Genoms eine Rolle spielen.

Zudem sind im Serum infizierter Individuen auch subvirale, nicht-infektiöse Partikel nachweisbar. Sie bestehen nur aus viralen Hüllproteinen und Lipid. Ihre Konzentration ist 10^3 - bis 10^5 -fach höher als die der Virionen. Sie liegen entweder in sphärischer ($\varnothing$ 22nm) oder filamentöser Form (~200-300nm lang) vor. Man spricht auch von HBsAg-Partikeln (Hepatitis-B-surface-Antigen), da die Oberflächenproteine, aus denen sie bestehen, Antigen determinanten enthalten, die bei den meisten Infizierten eine starke Immunantwort hervorrufen (Kim und

Tilles, 1970). Weiterhin enthält das Nukleokapsid wenigstens zwei wirtseigene Proteine (in Abb. 1 nicht dargestellt), wie das zelluläre Chaperon Hsp90, das mit der viralen Polymerase interagiert (Hu und Seeger, 1996; Hu *et al.*, 1997) und eine Proteinkinase C (PKC) (Albin und Robinson, 1980; Kau und Ting, 1998), welche die Fähigkeit besitzt, das C-Protein zu phosphorylieren (Machida *et al.*, 1991).

1.4 Die Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus

Das Genom der infektiösen Partikel hat einen ungewöhnlichen Aufbau. Es besitzt mit etwa 3200 Nukleotiden eines der kleinsten Genome aller bisher bekannter Viren (Galibert *et al.*, 1979). Die Anzahl der Nukleotide variiert je nach Subtyp zwischen 3182 (ayw), 3215 (adr) und 3221 (adw) Nukleotiden (Tiollais *et al.*, 1981).

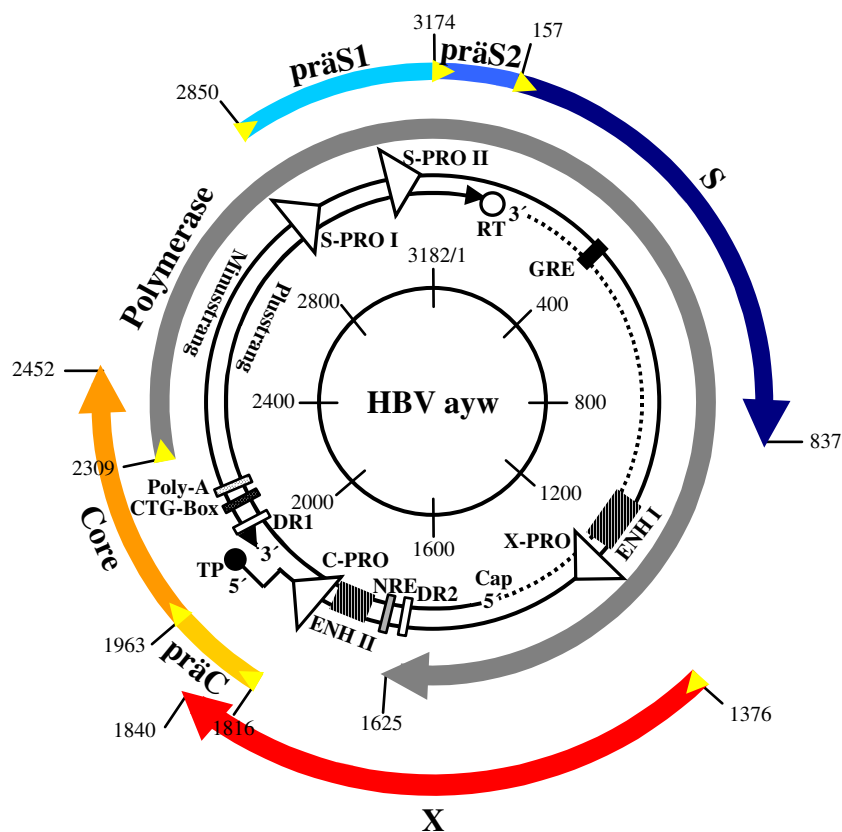


Abb. 2: Die Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus.

In der Mitte ist eine Nukleotidskala des HBV-Genoms (Subtyp ayw) dargestellt. Startpunkt der Nummerierung ist eine singuläre *EcoRI*-Schnittstelle. Das Genom ist ein partiell-doppelsträngiges DNA-Genom. Während der Minusstrang vollständig ist, bleibt der Plusstrang unvollständig (gestrichelte Linie). Die Dreiecke markieren Promotor-Elemente (PRO) und die schraffierten Vierecke zeigen Enhancer-Elemente (ENH) an. Außen sind die vier offenen Leserahmen dargestellt (blau: Hüllproteine; grau: Polymerase; orange: C- und E-Proteine; rot: X-Protein). Die gelben Pfeile markieren jeweils Translationsstartstellen. Weitere Abkürzungen: DR: Direct Repeat; GRE: Glucocorticoid Responsive Element; NRE: Negative Regulating Element; Poly-A: Polyadenylierungssignal; CTG-Box: Verpackungssignal; TP: terminales Protein; RT: reverse Transkriptase.

Das Genom (Abb. 2) besteht aus einem partiell-doppelsträngigen, offenzirkulären DNA-Molekül (rcDNA) (Robinson, 1977), wobei der vollständige Strang (Minusstrang) nicht geschlossen ist und am 5'-Ende mit einem viralen Proteinkomplex (P-Protein) kovalent assoziiert ist (Gerlich und Robinson, 1980). Dieses P-Protein besteht aus mehreren funktionellen Domänen (Toh *et al.*, 1983; Bartenschlager und Schaller, 1988; Radziwill *et al.*, 1990), die

das N-terminale Protein (TP), eine Spacer-Region (SP), eine reverse Transkriptase (RT) und eine C-terminale Ribonuklease H (RNaseH) umfassen. Das 5'-Ende des unvollständigen Plusstranges besteht aus 18 Ribonukleotiden die eine mRNA-ähnliche Cap-Struktur aufweisen (Seeger *et al.*, 1986). Nahe dem 5'-Ende beider Stränge liegen zwei, jeweils 11 Nukleotide umfassende direkte Sequenzwiederholungen DR1 und DR2 (Direct Repeat), die eine essentielle Rolle bei der DNA-Replikation spielen (Will *et al.*, 1987). Der Plusstrang besitzt kein definiertes 3'-Ende, sondern weist eine variable Länge von etwa 40-85% des Minusstranges auf. Mit seinem 3'-Ende ist die virale Polymerase (DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase) assoziiert.

Die geringe Größe des Genoms wird durch eine sehr komplexe Anordnung der einzelnen Gene erreicht, die sich in verschiedenen Leserastern über die halbe Länge des Genoms überlappen. Die vier offenen Leserahmen (ORF = Open Reading Frame) des Genoms kodieren die HBV-Proteine. Der X-ORF kodiert einen pleiotropisch wirkenden Transkriptionsaktivator (X). Das genaue Funktionsspektrum von X ist strittig. Das Protein scheint jedoch für die Etablierung einer Infektion essentiell zu sein (Zoulim *et al.*, 1994). Der präC/C-ORF kodiert einerseits ein präCoreprotein (präC), das eine N-terminale ER-Signalsequenz (ER: Endoplasmatisches Retikulum) besitzt und folglich in den Sekretionsweg der Zelle geleitet wird, und andererseits das Coreprotein (C) mit einer Größe von 21 kDa. Das präC (25 kDa) wird während der Sekretion an beiden Enden prozessiert und schließlich als HBe-Antigen (HBeAg) in das Serum sezerniert (16 kDa) (Ou *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1988). Das HBeAg ist weder für die Virusbildung noch für die Infektiosität notwendig (Brunetto *et al.*, 1989), scheint aber die infizierte Leberzelle vor einer immunologischen Reaktion zu schützen (Milich *et al.*, 1990). Der P-ORF umfasst etwa 80% des gesamten Genoms und kodiert die virale Polymerase, während der ENV-ORF (Envelope Open Reading Frame) die drei Hüllproteine (L-, M und S-Protein) kodiert. Auf den Aufbau und die Funktion der Hüllproteine soll aufgrund der Bedeutung dieser Proteine für die vorliegende Arbeit im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

Die transkriptionelle Aktivität der HBV-Gene wird durch regulierende Elemente gesteuert. So besitzt jedes Gen wenigstens einen Promotor, der durch virale Enhancer-Elemente reguliert wird (Shaul *et al.*, 1985; Yee, 1989; Yuh und Ting, 1990). Promotor- und Enhancer-Elemente wiederum werden vor allem durch leberspezifische Transkriptionsfaktoren beeinflusst (Hepatocyte Nuclear Factor: HNF-1 und HNF-4) (Courtois *et al.*, 1988; Lopez-Cabrera *et al.*, 1990; Schaller und Fischer, 1991). Ein weiteres regulierendes Element ist das „Glucocorticoid Responsive Element“ (GRE), welches eine Enhancer-I-vermittelte Steigerung der Promotor-

Aktivität durch Glukokortikoide ermöglicht (Tur-Kaspa *et al.*, 1986). Und letztlich ist auch dem Enhancer-II ein Regulator vorgeschaltet, das „Negative Regulating Element“ (NRE) (Lo und Ting, 1994). Wie sich das Zusammenspiel all dieser regulierenden Elemente *in vivo* darstellt, ist zur Zeit nicht bekannt.

1.5 Die HBV-Hüllproteine und ihre Rolle bei der Virusmorphogenese

Der ENV-ORF im HBV-Genom kodiert für die drei viralen Hüllproteine des Virus. Die Proteine werden allgemein unter dem Begriff Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) zusammengefasst, im einzelnen jedoch entsprechend ihrer Größe als S, M und L-Protein bezeichnet. Der ENV-ORF besitzt drei unterschiedliche Startstellen und ein gemeinsames Stoppkodon, was dazu führt, dass alle Hüllproteine einen einheitlichen C-Terminus besitzen. Folglich findet sich die Sequenz des S-Proteins (226 Aminosäuren) auch am C-Terminus des M- und L-Proteins wieder (Abb. 3). Das M-Protein besitzt eine N-terminale Extension von 55 Aminosäuren, die als präS2-Region bezeichnet wird, während das L-Protein N-terminal nochmals um 108 (Subtyp ayw) bzw. 119 Aminosäuren (Subtyp adw) verlängert ist (Valenzuela *et al.*, 1980). Diese Domäne wird als präS1-Region bezeichnet. PräS1 und präS2 bilden zusammen die präS-Region des L-Proteins (Heermann *et al.*, 1984) (Abb. 3).

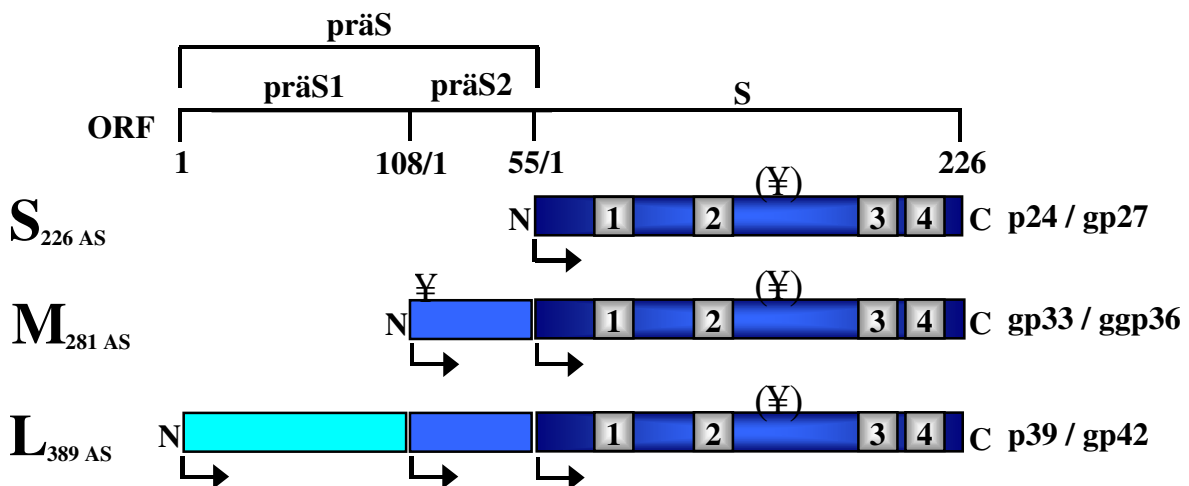


Abb. 3: Struktureller Aufbau der HBV-Hüllproteine.

Das große (L), mittlere (M) und kleine (S) Hüllprotein werden von einem einzigen offenen Leseraster (ORF) kodiert. Die Translation erfolgt von drei unterschiedlichen Startstellen (Pfeile), die im gleichen Leseraster liegen. Die HBV-Hüllproteine stellen koternminale Proteine dar, d.h. sie besitzen eine einheitliche C-terminale Aminosäuresequenz, wobei es sich hierbei um die Sequenz des S-Proteins handelt (dunkelblau). Das S-Protein umfasst 226 Aminosäuren und wird partiell N-glykosyliert (¥). Resultierende Proteine sind ganz rechts angegeben. Die vier postulierten Transmembrandomänen in der S-Domäne sind durch die numerierten Rechtecke dargestellt. Das M-Protein weist gegenüber dem S-Protein eine N-terminale Erweiterung von 55 Aminosäuren auf, die als präS2-Domäne bezeichnet wird. Die präS2-Domäne von M wird N-glykosyliert (¥). Das L-Protein weist zusätzlich zu präS2 eine N-terminale Erweiterung von 108 Aminosäuren (Subtyp ayw) auf, die als präS1-Domäne bezeichnet wird.

Jedes dieser drei Proteine kann aufgrund fakultativer und/oder obligatorischer Glykosylierung in zwei verschiedenen Formen vorliegen. Unglykosyliert haben sie ein Molekulargewicht von 24 kDa (S-Protein), 30 kDa (M-Protein) und 39 kDa (L-Protein). Das S-Protein besitzt eine fakultative N-Glykosylierungsstelle, die aus nicht bekannten Gründen jedoch nur zu 50% genutzt wird (Peterson, 1981). Es liegt daher neben der unglykosylierten Form (24 kDa) auch eine glykosylierte Form mit einem Molekulargewicht von 27 kDa vor. Das M-Protein besitzt neben der partiell genutzten Glykosylierungsstelle in der S-Domäne eine weitere Aminosäure (Asn4), welche glykosyliert wird (Eble *et al.*, 1990). Damit entstehen die zwei Formen des M-Proteins mit den Molekulargewichten von 33 kDa (einfach-glykosyliert) und 36 kDa (doppelt-glykosyliert). Auch im L-Protein kommt es zur partiellen Glykosylierung der S-Schleife, so dass hier neben der unglykosylierten (39 kDa) ebenfalls eine zweite Form mit einem Molekulargewicht von 42 kDa existiert (Heermann *et al.*, 1984).

Die drei Hüllproteine werden als polytope Transmembranproteine an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert (Eble *et al.*, 1986; Eble *et al.*, 1990). Die Integration in die ER-Membran erfolgt mittels hydrophober Transmembranregionen innerhalb der S-Domäne. Sequenzanalysen des S-Proteins wiesen drei hydrophobe Regionen auf (AS 8-28, AS 79-100 und AS 160-220), die durch zwei hydrophile Bereiche getrennt sind (Stirk, *et al.*, 1992). Mutationsanalysen zeigten, dass die beiden N-terminalen hydrophoben Signalsequenzen (SI und SII) die Membraninsertion und die Topologie des S-Proteins bestimmen (Eble *et al.*, 1987; Bruss und Ganem, 1991a; Prange *et al.*, 1992). Die Anlagerung an die ER-Membran wird durch das erste hydrophobe Segment (SI) vermittelt, während die zweite hydrophobe Region (SII) das Protein in der Membran verankert und gleichzeitig eine Translokation C-terminaler Bereiche in das ER-Lumen herbeiführt (Ostapchuk *et al.*, 1994; Bruss und Vieluf, 1995; Prange und Streeck, 1995). Folglich ist die erste hydrophile Schleife (zwischen Signal I und II) im Zytoplasma lokalisiert (entspricht dem Virusinneren), während die zweite hydrophile Schleife in das ER-Lumen ragt (entspricht der Virusoberfläche) (Stirk, *et al.*, 1992). Die Transmembranstruktur des C-terminalen hydrophoben Bereiches wurde experimentell noch nicht untersucht. Aufgrund von Computer-unterstützter Strukturanalysen wurden jedoch zwei weitere α -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt, so dass auf Grund von vier Transmembran-Domänen neben dem N-Terminus auch der C-Terminus in das ER-Lumen ragt (Abb. 4) (Berting *et al.*, 1995).

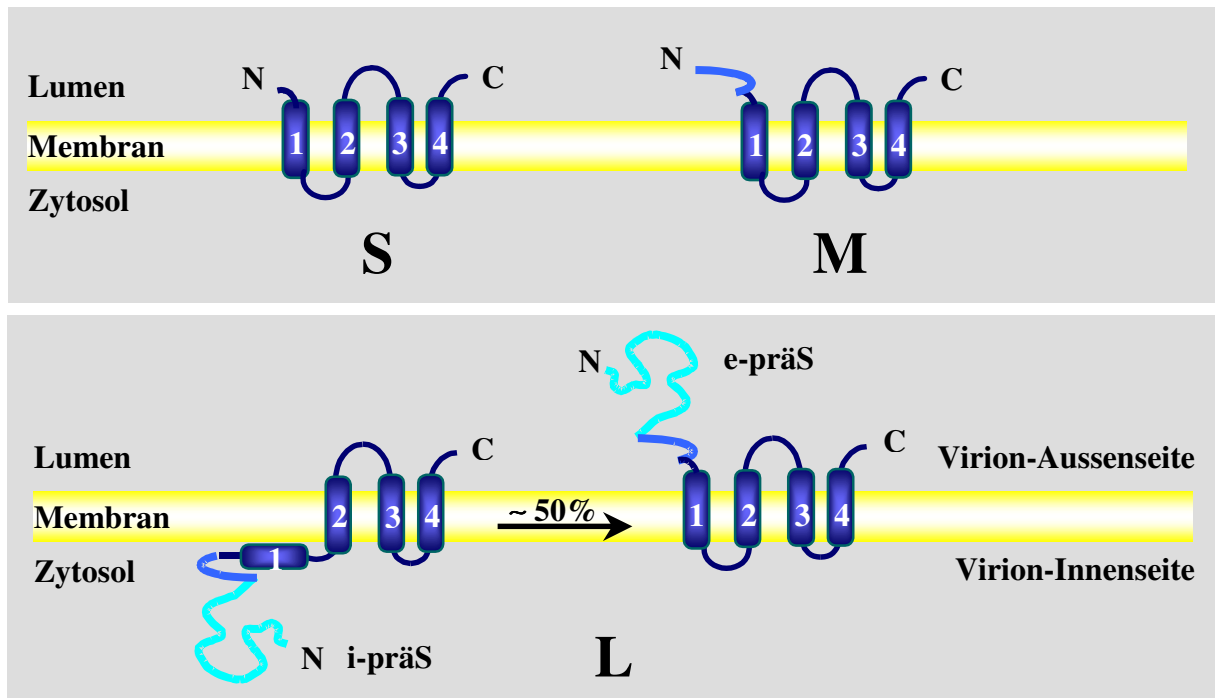


Abb. 4: Die transmembrane Topologie der HBV-Hüllproteine in der ER-Membran.

(Oben) Modell der S- und M-Topologie: Die vier Transmembrandomänen des S-Proteins (1-4) verankern das Protein in der Membran. N- und C-Termini weisen in das Lumen des ER. Die präS2-Domäne des M-Proteins (mittellblau) wird kotranslational in das ER-Lumen transloziert.

(Unten) Modell des L-Proteins: Das L-Protein wird ebenfalls durch die Transmembrandomänen innerhalb seiner S-Region in der ER-Membran verankert. Nach der Synthese ist seine präS1- (hellblau) und präS2-Region (mittelblau) zunächst zytoplasmatisch orientiert (i-präS). In einem Reifungsprozess transloziert dann etwa die Hälfte der L-Moleküle die präS-Domäne posttranslational zur luminalen Seite der Membran (e-präS). Das L-Protein besitzt folglich im reifen Zustand eine duale Topologie.

Die drei Hüllproteine unterscheiden sich in ihrer Topologie. Da die präS-Region im Gegensatz zur S-Domäne keine Signalsequenzen besitzt, (Eble *et al.*, 1990; Ostapchuk *et al.*, 1994), werden sowohl das M- als auch das L-Protein mittels der Signalsequenzen innerhalb der S-Region in die ER-Membran inseriert. Im Fall des M-Proteins führt dies zu einer kotranslationalen Translokation der präS2-Domäne in das ER-Lumen, wodurch eine S-ähnliche Topologie entsteht (Abb. 4).

Das L-Protein mit seiner zusätzlichen N-terminalen präS1-Region zeigt eine außergewöhnliche duale Membrantopologie. Bei der Hälfte aller L-Proteine kommt es während der Virusmorphogenese zu einer partiellen, posttranslationalen Translokation (Bruss *et al.*, 1994; Löffler-Mary *et al.*, 1997; Prange und Streeck, 1995), so dass ca. 50% der präS-Domänen auf dem Viruspartikel nach außen (e-präS) und 50% nach innen gerichtet (i-präS) sind (Abb. 4). Dieser Prozess wurde zuvor noch bei keinem anderen Virus beschrieben. Die duale Topologie von L wird auch in der Hülle sezernierter Viren beibehalten und erlaubt es dem L-Protein multiple Funktionen auszuüben. Während in frühen Schritten der Infektion, die e-präS-Form an der Bindung des Rezeptors auf der Hepatozytenoberfläche beteiligt ist (Neurath *et al.*, 1986), fin-

det die zytosolische i-präS-Form in späten Phasen der Infektion durch ihre Interaktion mit dem viralen Coreprotein zur Umhüllung der Nukleokapside eine essentielle Verwendung (Bruss und Vieluf, 1995; Bruss, 1997). Zudem ist die i-präS-Form an der Regulation der viralen Replikation beteiligt, indem sie die Amplifikation des viralen DNA-Genoms kontrolliert (Summers *et al.*, 1990). Unabhängig von der dualen Membrantopologie wurden weitere wichtige Funktionen für das L-Protein beschrieben, wie zum Beispiel eine L-vermittelte Transaktivierung einer Reihe von Promotorelementen (Hildt *et al.*, 1996) oder der L-abhängigen intrazellulären Retention und Akkumulation der HBV-Hüllproteine.

Auch für das S-Protein konnte gezeigt werden, dass es für die Virusmorphogenese benötigt wird (Bruss und Ganem, 1991b; Ueda *et al.*, 1991) und dass es neben dem L-Protein beim Verpackungsprozess beteiligt ist (Löffler-Mary *et al.*, 2000). Für die S-Kapsid-Interaktion ist ein kleiner Bereich in der ersten zytosolischen Schleife der S-Region (AS 56-80) identifiziert worden (Poisson *et al.*, 1997).

Das M-Protein scheint sowohl für die Virusbildung als auch für die Infektion entbehrlich zu sein (Bruss und Ganem, 1991b; Santantonio *et al.*, 1992; Fernholz *et al.*, 1993). Welche Rolle das M-Protein im Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus spielt, ist zur Zeit noch ungeklärt.

1.6 Der Infektionszyklus des Hepatitis-B-Virus

Der Mechanismus der Virusaufnahme ist bisher noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass es sich um einen Rezeptor-vermittelten Prozess handelt, bei dem ein Bereich des großen Hüllproteins an einen oder mehrere zelluläre Rezeptoren bindet (Treichel *et al.*, 1997; Breiner und Schaller, 2000), und das Virus auf diese Art in die Zelle eindringen kann. Es konnte jedoch bisher keiner der zahlreichen Rezeptorkandidaten, wie beispielsweise Fibronectin, Apolipoprotein H oder andere, sicher bestätigt werden (Franco *et al.*, 1992; Mehdi *et al.*, 1996). Das Nukleokapsid gelangt anschließend durch einen wahrscheinlich pH-unabhängigen Mechanismus in das Zytoplasma der Wirtszelle (Rigg und Schaller, 1992). Dort zerfällt es an der Kernmembran, wodurch das virale Genom als DNA-Polymerase-Komplex, wie Untersuchungen am WHV (Woodchuck Hepatitis-Virus) zeigten, in den Zellkern gelangt (Kann *et al.*, 1997). Dort wird das Genom durch unterschiedliche zelluläre Enzyme in die kovalentgeschlossene Form (cccDNA) überführt (Kock und Schlicht, 1993), von der die unterschiedlich langen RNA-Moleküle von der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert werden. Diese besitzen ein identisches 3'-Ende, da das zirkuläre Virusgenom nur ein Polyadenylierungssignal enthält. Die virale Polymerase und das Coreprotein sind die Translationsprodukte der 3,5 kB großen mRNA, die über ca. 120 Bp einen terminal redundanten Bereich aufweist (Will

et al., 1987). Diese virale prägenomische RNA (pgRNA) von übergenomischer Länge enthält ein Verpackungssignal ϵ auf RNA-Sekundärstrukturebene, das von der viralen Polymerase erkannt und gebunden wird (Junker-Niepmann *et al.*, 1990). Hierdurch wird die Verpackung des Prägenom-Polymerase-Komplexes durch Coreproteine zu einem Nukleokapsid initiiert.

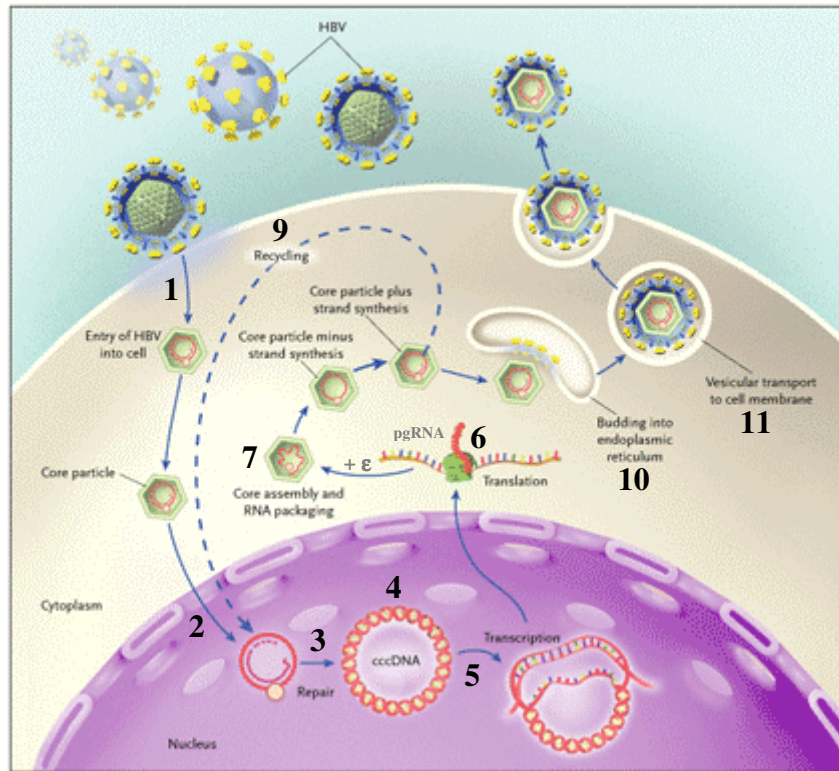


Abb. 5: Schematische Darstellung des Infektions- und Replikationszyklus von HBV.

Das Virus wird mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zielzelle aufgenommen (1). Nach Freiwerden des viralen Kapsids interagiert dieses mit der Kernpore und entlässt die virale DNA in den Zellkern (2). Hier wird der unvollständige Plusstrang des HBV-Genoms durch zelluläre Enzyme komplettiert (3). Es entsteht ein kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Genom (cccDNA). Von der cccDNA (4) werden nachfolgend alle viralen RNA-Moleküle transkribiert (5) und im Anschluss in das Zytoplasma transportiert. Das prägenomische RNA-Molekül (pgRNA) dient als Matrize zur Translation des C- und P-Proteins (6). Ein spezifisches Verpackungssignal (ϵ) der pgRNA vermittelt die Umhüllung des Prägenoms (7). Innerhalb des Nukleokapsids erfolgt dann die reverse Transkription. Dabei wird mit Hilfe der viralen Polymerase die prägenomische RNA in virale DNA umgeschrieben (8). Die Corepartikel können entweder nochmals in den Zellkern geschleust werden (9) oder von den Hüllproteinen verpackt werden (10). Die Viren verlassen die Zelle über den sekretorischen Weg (11). Abbildung modifiziert nach Ganem und Prince (2004).

Im Inneren des Partikels erfolgt die Synthese des viralen Genoms durch eine reverse Transkriptionsreaktion (Summers und Mason, 1982), wobei ϵ als Template für einen kurzen DNA-Primer und somit als Replikationsursprung dient (Nassal und Schaller, 1996). Mit der Synthese des Plusstranges geht die Degradation des RNA-Stranges einher. Die Zweitstrangsynthese endet an einer nicht genau definierten Stelle. Das Genom in fertigen Virionen ist daher nur partiell doppelsträngig. „Reife“ Kapside, die diese partiell-doppelsträngige DNA enthalten, können, im Gegensatz zu „unreifen“ Kapsiden, in denen sich noch das RNA-

Prägenom befindet, im Infektionszyklus zwei unterschiedlichen Wegen folgen. In der frühen Phase der Infektion vermehren sie hauptsächlich die cccDNA im Zellkern, indem sie zu diesem zurück transportiert werden (Tuttleman *et al.*, 1986), dort zerfallen, und das Genom in den Kern eingeschleust wird. In der späten Phase hingegen interagiert das Nukleokapsid mit den Hüllproteinen, die von einer 2,4 kB und einer 2,1 kB großen mRNA translatiert wurden. Die Hüllproteine durchspannen die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Das Kapsid gelangt durch Knospung in dessen Lumen, wird umhüllt und verlässt als Virion die Zelle auf sekretorischem Weg (Gerelsaikhan *et al.*, 1996). Der komplette Infektions- und Replikationszyklus von HBV ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

2. Virus/Wirt-Interaktionen des Hepatitis-B-Virus

Bis zum Ausbruch einer fulminanten Hepatitis bedient sich das Virus während seines Infektionszyklus im betroffenen Organismus einer Vielzahl zellulärer Wirtskomponenten. Von diesen wirtsspezifischen Proteinen sind trotz langjähriger Untersuchung nur sehr wenige bekannt, z.B. Hsc70, dass in die posttranslationale Translokation des L-Proteins involviert ist (Lambert und Prange, 2003). So stehen bis heute die Charakterisierung des oder der Rezeptoren sowie der Mechanismen der Retention des L-Proteins in der Zelle und die Aufklärung sämtlicher Transportwege aus, die das Virus von seiner Internalisierung bis hin zur Ausschleusung nimmt. Besonders für das L-Protein ist anzunehmen, dass es für die Ausbildung der speziellen Topologie als auch zur Erfüllung seiner verschiedenen Aufgaben (vgl. Kapitel 1.5) mit zahlreichen zellulären Proteinen interagieren muss. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bezog sich auf die Untersuchung der Bedeutung einer Interaktion zwischen dem L-Protein und einem bereits identifizierten zellulären Interaktionspartner, dem γ 2-Adaptin (Hartmann-Stühler und Prange, 2001). Da dieses Adaptorprotein intrazelluläre Transportprozesse zu steuern scheint, soll in den folgenden Kapiteln näher auf Transportmechanismen in der Eucyte eingegangen werden.

2.1 Intrazelluläre Transportmechanismen der Eucyte

Eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle, von einatomigen Ionen bis zu komplexen Proteinen, wird von der eukaryontischen Zelle zu jeder Zeit selektiv über ihre Oberfläche aufgenommen, intrazellulär zwischen den Organellen transportiert oder ins extrazelluläre Medium abgegeben. Der Transport von Lipiden und Proteinen wird dabei hauptsächlich von kleinen Membranbläschen (50 - 100nm), den sogenannten Vesikeln, vermittelt, welche sich von einem Organell ablösen und mit einem anderen verschmelzen (Palade, 1975). Die zu transportierenden Frachtmoleküle werden hierfür entweder in die Lipiddoppelschicht des Vesikels integriert, oder befinden sich löslich in dessen Innerem. Der Vesikeltransport innerhalb einer eukaryontischen Zelle erfolgt selektiv. Die zielgerichtete Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran ist abhängig von spezifischen Sortierungssignalen innerhalb der Frachtproteine. Im Folgenden soll auf die bekannten intrazellulären Transportprozesse der Eucyte näher eingegangen werden (Abb. 6).

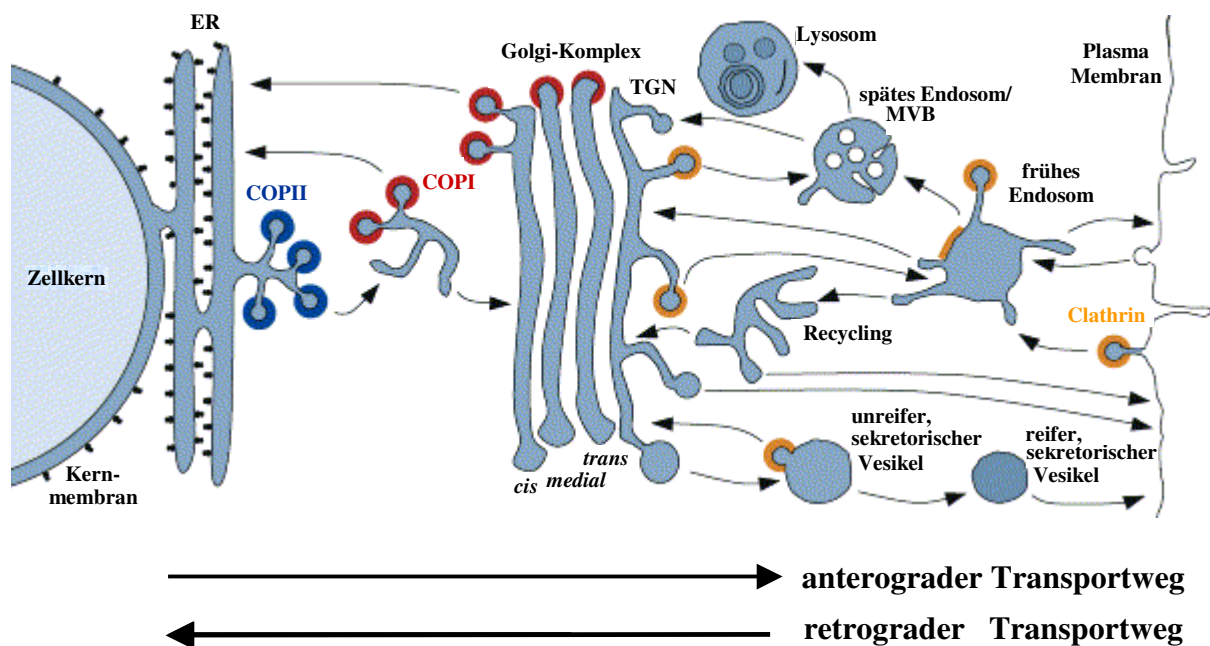


Abb. 6: Schematische Darstellung intrazellulärer Transportprozesse der Eucyte.

Es sind die Kompartimente der sekretorischen, lysosomalen und endozytotischen Transportwege dargestellt. Die Richtung des Transportes ist durch Pfeile angedeutet. Die Farben verdeutlichen die bekannten oder angenommenen Aufenthaltsorte von COPI (rot), COPII (blau) und Clathrin (orange). (MVB: Multivesicular body; TGN: *trans*-Golgi-Netzwerk; COP: Coat Protein). Abbildung modifiziert nach Bonifacino und Glick (2004).

Der sekretorische oder anterograde (vorwärtsgerichtete) Transportweg beinhaltet den Transport der am endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildeten Proteine zur *cis*-Golgi-Seite, den Transport vom *cis*-Golgi durch die weiteren Golgi-Komplex zur *trans*-Golgi-Seite, dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Der entgegengesetzte Weg vom Golgi zurück zum ER wird als retrograde (rückwärtsgerichteter) Transport bezeichnet. Das TGN stellt eine erste, zentrale Sortierstation für den weiteren Weg der neu-synthetisierten Proteine dar. Vom TGN werden die Proteine mittels konsekutiver oder regulierter Exozytose sezerniert oder gelangen vom TGN in das endosomale System der Zelle, welches außerordentlich komplex ist und aus Subkompartimenten besteht. Es können zwei endosomale Strukturen, die frühen (EE) und die späten Endosomen (LE) morphologisch (Hicke *et al.*, 1997; Prescianotto-Baschong und Riezman, 2002) und biochemisch (Singer und Riezman, 1990) voneinander unterschieden werden. Beobachtungen aus Säugerzellen haben zu der Vorstellung geführt, dass das frühe Endosom eine Art Sortierstation darstellt, an welcher für das Lysosom (L) bestimmte Proteine von denjenigen getrennt werden, die zwischen Endosom und Plasmamembran pendeln (Recycling) (Gruenberg, 2001; Maxfield und McGraw, 2004). Ob Proteine tatsächlich den „langen“ Transportweg zum Lysosom (TGN-EE-LE-L) nehmen, oder direkt vom TGN über das späte Endosom zum Lysosom transportiert werden, ist oft unklar. Im späten Endo-

som findet durch die Bildung interner Vesikel eine Trennung von Proteinen statt, die entweder für das Vakuolenlumen bestimmt sind, oder in der begrenzenden Membran verbleiben. Das Endosom entwickelt sich unter der Einwirkung der ESCRT-Proteinkomplexe I-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) zum sogenannten MVB (Multivesicular Body).

Drei Hauptklassen von Hüllproteinkomplexen sind bisher bekannt: Clathrin, COPI (Coat Protein I) und COPII (Coat Protein II) (Cosson und Letourneur, 1997; Pishvae und Payne, 1998; Schmid, 1997). Welcher Hüllkomplex bei einer bestimmten Vesikelbildung Verwendung findet, ist dabei vom jeweiligen intrazellulären Transportprozess abhängig. Vom COPI-Komplex umhüllte Vesikel vermitteln den Transport vom Golgi-Apparat zum ER und den *intra*-Golgi-Transport (sowohl in anterograder, als auch in retrograder Richtung). COPII-Vesikel sind dagegen für den anterograden Transport (ER → Golgi) verantwortlich und knospen ausschließlich von spezialisierten Bereichen des rauen ER, den sogenannten „privileged sites“ oder „transitional elements“, ab (Hobman *et al.*, 1998; Klumperman, 2000). Von diesen drei bekannten Hauptklassen der Vesikelproteinhüllen ist die Clathrin-Hülle am besten untersucht. Von Clathrin umgebende Vesikel vermitteln einen Großteil der Endozytose, für welche allerdings auch alternative Mechanismen existieren (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001), sowie in höheren Eukaryonten den Transport zwischen dem TGN (*trans*-Golgi-Netzwerk) und den Endosomen (Anderson *et al.*, 1977; Robinson, 1987). Im Kapitel 2.3 soll noch näher auf die Clathrin-umhüllten Transport-Vesikel eingegangen werden.

2.2 Der Vesikeltransport der Eucyte

Die Abschnürung eines Transportvesikels von seiner Donormembran ist eine energetisch ungünstige Reaktion, die nicht spontan abläuft. Sie wird erst durch die Anlagerung eines heterooligomeren Komplexes von Proteinen ermöglicht, welche eine Krümmung der Membran und somit eine Senkung der zu überwindenden Energiebarriere bewirkt. Die Aggregation dieser Proteine wird dabei durch eine kleine membrangebundene GTPase in ihrer GTP-gebundenen Form initialisiert (Chavrier und Goud, 1999). Nach Einlagerung der Frachtmoleküle erfährt die Membran eine weitere Krümmung bis hin zur Abschnürung des vollständigen Vesikels. Dieser Vorgang kann durch mehrere Hilfsproteine unterstützt werden. Das sogenannte „Uncoating“ erfolgt vor allem durch die Inaktivierung der kleinen GTPase. Das enthüllte Vesikel wird weiter in Richtung Akzeptormembran transportiert, wobei es wahrscheinlich durch das Zytoskelett gelenkt wird. Die zielgerichtete Anbindung an die Akzeptormembran wird von GTP gebundenen Rab-Proteinen (eine weitere Familie von kleinen GTP-

asen) und einem Anbindungs-Faktor (tethering-factor) vermittelt. Die Verschmelzung des Vesikels mit der Akzeptormembran wird durch spezielle integrale Rezeptorproteine, SNAREs (SNAP-Rezeptor) genannt (Sollner *et al.*, 1993), vermittelt. Diese Rezeptoren kommen sowohl innerhalb der Vesikelmembran, als auch innerhalb der jeweiligen Zielfmembran vor. Nach Auflösung der Vesikelhülle interagieren die vesikulären SNARE-Proteine (v-SNAREs) dabei mit ihrem jeweiligen Bindungspartner auf der Zielfmembran (t-SNAREs), wobei sie zusammen mit SNAP-Proteinen (Soluble NSF Attachment Protein) einen Komplex ausbilden. Der gebildete Komplex wird als SNARE-Komplex bezeichnet und die bei seiner Formierung freiwerdende Energie ist vermutlich die treibende Kraft bei der Vesikelfusion. Abschließend werden die Frachtmoleküle in das Akzeptor-Kompartiment entlassen und die beteiligten Proteine (SNARE, Hüllproteine, GTPase und Rab-Proteine) recycled. Eine zusammenfassende Darstellung des Vesikel-Transportes in der Eucyte ist in Abbildung 7 gezeigt.

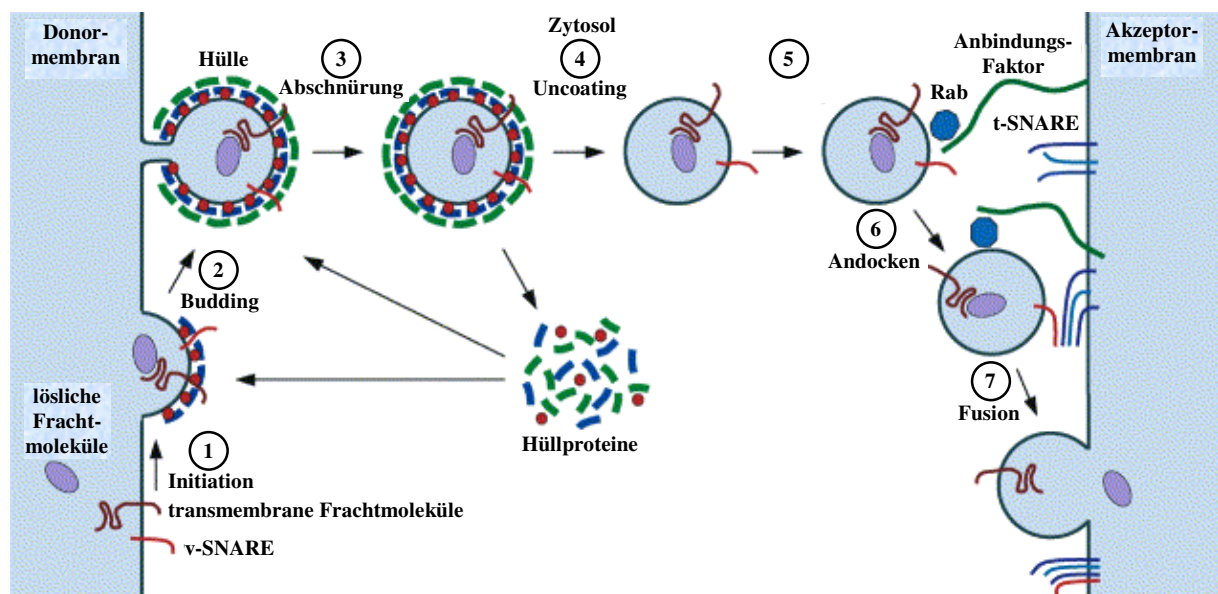


Abb. 7: Schematische Darstellung des Vesikeltransportes der Eucyte.

(1) Die Initiation des Buddings erfolgt durch die Rekrutierung verschiedener Proteine (blau und grün) zur Donormembran, indem sie an die Membran gebundene GTPase (rot) binden. (2) Die Frachtmoleküle (lila) werden durch den fortschreitenden Budding-Prozess integriert. Nach Abschnürung (3) und „Uncoating“ (4) des Vesikels erfolgt die Anbindung mit der Akzeptormembran (5) über den sogenannten Anbindungs-faktor. v-SNARE- und t-SNARE-Proteine bilden einen SNARE-Komplex (6) und unterstützen die Vesikel-Fusion an der Zielfmembran. Abbildung modifiziert nach Bonifacino und Glick (2004).

2.3 Clathrin

Im Jahre 1964 durch elektronenmikroskopische Aufnahmen erstmals entdeckt, wurde Clathrin 1975 durch Pearse als Bestandteil der Ummantelung von sogenannten „Stachelsaum“-Vesikeln (coated vesicles) isoliert (Pearse, 1975; Pearse, 1976). Die circa 20nm durchmessende Clathrinhülle ist in eine äußere und eine innere Hülle unterteilt (Vigers *et al.*, 1986) und

besteht von innen nach außen aus einer GTPase, einem heterotetrameren Adaptorprotein-Komplex sowie den namensgebenden Clathrin-Polypeptiden. Zusätzlich sind über fünfundzwanzig assoziierte Proteine unterschiedlicher Funktion bekannt (Kirchhausen, 2000). Beispiele hierfür sind AP180 (Regulation der Größe neuronaler Vesikel), Synaptotagmin (Ca^{2+} -Sensor) oder Dynamin (Abtrennung des Vesikels von der Donormembran).

Das stark konservierte Clathrinprotein setzt sich aus einer schweren und einer regulatorisch wirkenden leichten Kette zusammen. Jeweils drei dieser Clathrinmoleküle formieren sich dabei zu einer dreiarmligen Triskelion-Struktur, welche ihrerseits auf der Vesikeloberfläche zu einem wabenartigen Korbgeflecht mit Fünf- oder Sechsecken polymerisiert (Ungewickell und Branton, 1981). Im Folgenden soll näher auf die Adaptorprotein-Komplexe eingegangen werden, welche unterhalb des Clathrinkorbes die innere Proteinhülle ausbilden (Hirst und Robinson, 1998; Rehling *et al.*, 1999).

2.4 Adaptorprotein-Komplexe

Die Adaptorprotein-Komplexe (AP-Komplexe) sind für intrazelluläre Membrantransportprozesse verantwortlich (Kirchhausen *et al.*, 1997). Bei höheren Eukaryonten wurden bereits vier verschiedene AP-Komplexe beschrieben (AP-1 bis AP-4). Die am besten untersuchten Komplexe AP-1 und AP-2 vermitteln den Transport Clathrin-umhüllter Vesikel.

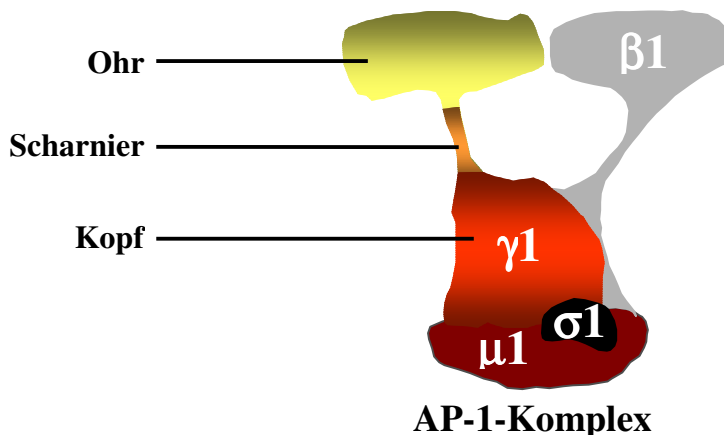


Abb. 8: Schematische Darstellung des heterotetrameren AP-1-Komplexes.
Der AP-1-Komplex besteht aus den folgenden 4 Adaptin-Untereinheiten: $\gamma 1$ und $\beta 1$ (groß), $\mu 1$ (mittel) und $\sigma 1$ (klein).

Alle vier AP-Komplexe bestehen jeweils aus zwei großen ($\gamma 1$ und $\beta 1$ bei AP-1), einer mittleren ($\mu 1$ bei AP-1) sowie einer kleinen Untereinheit ($\sigma 1$ bei AP-1), den sogenannten Adaptinen. Die $\gamma 1$ -Adaptin-Untereinheit kann zusätzlich noch in drei strukturelle Domänen (Kopf-, Scharnier- und Ohr-Domäne) unterteilt werden (Abb.8).

Während AP-2 die schnelle Rezeptor-vermittelte Endozytose von der Plasmamembran steuert, vermitteln AP-1, AP-3 und AP-4 die Sortierungsprozesse am TGN (*trans*-Golgi-

Netzwerk) und/oder an den Endosomen (Abb. 9). AP-1- und AP-2-Komplexe haben Clathrin in ihre Hülle integriert, wohingegen der AP-4-Komplex höchstwahrscheinlich Teil eines Vesikels ohne Clathrin-Hülle ist (Boehm und Bonifacino, 2001). AP-3 ist vermutlich in den Transport bestimmter Proteine Richtung Lysosom involviert (Cowles *et al.*, 1997) und weist eine noch nicht verstandene Interaktion mit Clathrin auf.

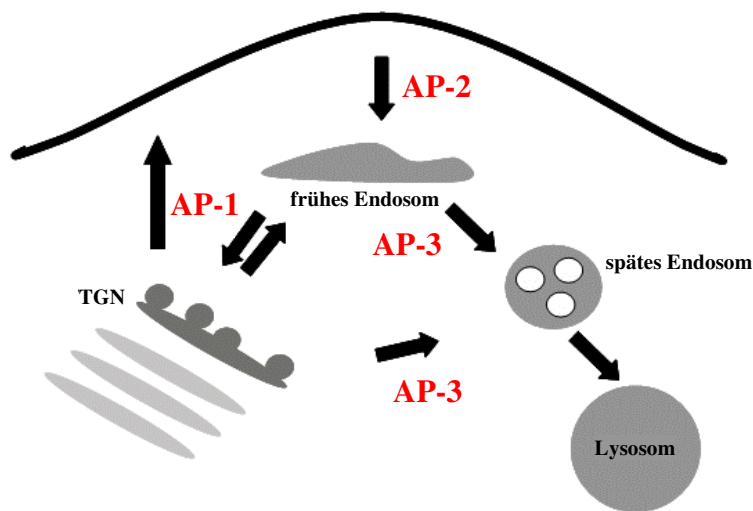


Abb. 9: Schematische Darstellung der Beteiligung von AP-Komplexen an intrazellulären Transportprozessen.

AP-1-Komplexe schnüren sich vom TGN (*trans*-Golgi-Netzwerk) ab und sind an der Vermittlung des endosomalen/lysosomalen Sortierungsprozesses beteiligt. AP-2-Komplexe dagegen schnüren sich von der Plasmamembran ab und spielen somit eine direkte Rolle in der Rezeptor-vermittelten Endozytose. AP-3-Komplexe sind vermutlich an dem Transport bestimmter Proteine Richtung Lysosom involviert. Die Richtung der einzelnen Transportwege ist durch Pfeile verdeutlicht.

2.5 γ 2-Adaptin

Eine japanische Forschergruppe konnte im Jahr 1998 ein neues Adaptor-verwandtes, zytosolisches Protein (γ 2-Adaptin) identifizieren und charakterisieren (Takatsu *et al.*, 1998). Entsprechend seiner vermutlich grundlegenden Funktion im internen Membrantransport von Zellen konnte es ubiquitär in vielen Geweben wie Leber, Niere, Muskel und Gehirn nachgewiesen werden (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998). Das 90 kDa große γ 2-Adaptin weist eine große Ähnlichkeit zur großen Untereinheit des AP-1-Komplexes (γ 1-Adaptin) auf. Die Primärstruktur zeigt eine Übereinstimmung mit dem γ 1-Adaptin von ca. 60% und die Organisation der einzelnen Domänen (Kopf, Scharnier und Ohr) scheint mit diesem identisch zu sein (Abb. 10).

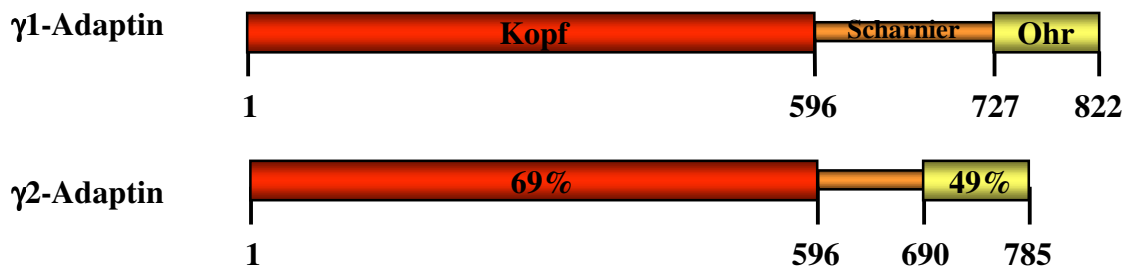


Abb. 10: Primärstruktur-Vergleich zwischen humanem $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -Adaptin.

Die verschiedenen Proteindomänen sind farblich unterschiedlich hervorgehoben. Die Kopf-Region ist rot, der Scharnierbereich ist orange und die Ohr-Domäne ist gelb dargestellt. Die Kopf-Region des $\gamma 2$ -Adaptins weist eine 69%-ige Homologie zur Primärstruktur des $\gamma 1$ -Adaptins auf, während die Ohr-Domäne nur eine 49%-ige Homologie zeigt. Die Scharnier-Region dagegen ist in der Primärstruktur sehr variabel. Die Zahlen unterhalb des Schemas geben die Aminosäureposition der entsprechenden Proteinbereiche an.

Obwohl die genaue Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin noch nicht bekannt ist, konnte gezeigt werden, dass sich seine Rolle im Membrantransport von $\gamma 1$ -Adaptin deutlich unterscheidet. Da beide Proteine keine zelluläre Kolo-kalisation aufweisen, wird vermutet, dass $\gamma 2$ -Adaptin eine von $\gamma 1$ -Adaptin abweichende Funktion übernimmt. Beide Proteine lassen sich mit Membranen assoziieren. Die Bindung von $\gamma 1$ -Adaptin wird dabei von einer GTPase initiiert (Stamnes *et al.*, 1993) und kann durch Brefeldin-A inhibiert werden. $\gamma 2$ -Adaptin hingegen zeigt bei Inkubation mit Brefeldin-A keine Sensitivität in seiner Membranbindungsaktivität. Es wird deshalb angenommen, dass die Rekrutierung von $\gamma 2$ -Adaptin zu Membranen durch andere Proteine als GTPasen erfolgt (Lewin *et al.*, 1998; Takatsu *et al.*, 1998), die aber noch nicht identifiziert wurden. Auch kann $\gamma 2$ -Adaptin die Funktion von $\gamma 1$ -Adaptin in homozygoten $\gamma 1$ -Adaptin-Knockout-Mäusen nicht übernehmen, so dass diese Mäuse in einem frühen Embryonalstadium sterben (Zizioli *et al.*, 1999).

2.6 Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin bei der HBV-Morphogenese

Für die Entstehung einer HBV-Infektion übernimmt das große virale L-Hüllprotein mit seiner präS1-Domäne viele zentrale Funktionen (vgl. Kapitel 1.5):

- Bindung von HBV an den Rezeptor der Leberzelle
- Umhüllung von viralen Kapsiden
- Freisetzung von (sub)viralen Partikeln
- Regulation der DNA-Amplifikation
- Transkriptionelle Transaktivierung

Um weitere Funktionen des L-Proteins und mögliche Interaktionen mit Wirtszellfaktoren aufzuklären, wurde in einer vorangehenden Arbeit diese präS1-Domäne des L-Proteins als Fänger in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzt (Hartmann-Stühler und Prange, 2001). Mit diesem Ansatz konnte das $\gamma 2$ -Adaptin als spezifischer Bindungspartner von L identifiziert werden. Die Interaktion zwischen L und $\gamma 2$ -Adaptin wurde dabei über Koimmunpräzipitation bestätigt. Zudem konnte bereits mit Hilfe von Deletionsmutanten gezeigt werden, dass diese Interaktion von der präS1-Domäne des L-Proteins und der Ohr-Domäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig ist. Interessanterweise führten Koexpressionen der beiden interagierenden Partner zu einer Rekrutierung des $\gamma 2$ -Adaptins durch L an *cis*-Golgi-Strukturen, was über Immunfluoreszenzanalysen kotransfizierter Zellen herausgefunden wurde. Eine Interaktion zwischen dem L-Protein und dem nah verwandten $\gamma 1$ -Adaptin (60%-ige Homologie) konnte nicht nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Takatsu *et al.*, 1998; Lewin *et al.*, 1998) wurde das $\gamma 2$ -Adaptin eher an perinukleären Strukturen des Golgi-Komplexes als an TGN-Strukturen gefunden, an denen normalerweise das $\gamma 1$ -Adaptin nachgewiesen werden konnte (Schmid, 1997; Kirchhausen, 1999). Trotz allem wird dem neuen Adaptin ($\gamma 2$ -Adaptin) aufgrund seiner Verteilung mehr eine Rolle in sekretorischen als in endozytotischen Transportprozessen zugesprochen (Takatsu *et al.*, 1998; Lewin *et al.*, 1998). Zusammenfassend wird im Augenblick spekuliert, dass die L/ $\gamma 2$ -Interaktion anstelle einer Leitfunktion an Transportprozessen bei der Virusaufnahme, vielmehr eine Funktion bei der Steuerung der Freisetzung von HBV aus der Leberzelle haben könnte.

Zur Aufklärung der tatsächlichen Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin im Zusammenhang mit der Replikationszyklus von HBV wurde sich des epigenetischen Prozesses der Genregulation bedient. Durch ein sogenanntes posttranskriptionelles „Gene-Silencing“ ist es in der Genetik möglich, das $\gamma 2$ -Adaptin-Gen selektiv stillzulegen. Dabei wird durch mehr oder weniger spezifische siRNAs die mRNA des Zielgens abgebaut und somit die Translation zum spezifischen Genprodukt ($\gamma 2$ -Adaptin) verhindert. Auswirkungen des $\gamma 2$ -Adaptin-Verlustes auf das Hepatitis-B-Virus können dann mit molekularbiologischen Methoden untersucht werden.

3. „Gene-Silencing“

Zur Untersuchung von Gen- und/oder Proteinfunktionen *in vivo* werden seit Jahren genetisch veränderte Tiere, wie zum Beispiel Knockout-Mäuse, herangezogen. In Knockout-Mäusen wird durch die Manipulation von embryonalen Stammzellen gezielt ein Gen inaktiviert (Gene-Silencing). Diese embryonalen Stammzellen werden dann in die Keimbahn der Maus eingebracht. Mit Hilfe dieser genetisch veränderten Tiere können sowohl grundlegende biologische Mechanismen als auch Zusammenhänge zwischen bestimmten Krankheitsbildern und genetischen Veränderungen untersucht sowie Modelle menschlicher Erkrankungen erzeugt werden.

Diese *in vivo* „Gene-Silencing“-Methode bringt aber entscheidende Nachteile mit sich:

- eine Vielzahl von Tieren müssen bis zum gewünschten Ergebnis ihr Leben lassen
- die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist nur bedingt gewährleistet
- Tierversuche setzen eine aufwendige Tierhaltung voraus
- bis zu Auswertung der Ergebnisse muss eine ganze Tiergeneration abgewartet werden

Die Nachteile resultierten in der Suche nach Alternativen zur Knockout-Maus. Ein entscheidender Durchbruch brachte die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) von Fire und Mello (1998). RNAi ist ursprünglich ein evolutionär konservierter zellulärer Abwehrmechanismus, der die Expression artfremder Gene in Eukaryonten kontrolliert. Auf dieser Basis wurde von Tuschl *et al.* (2001) eine neue und effiziente Methode entwickelt, um die Funktion eines Gens in embryonalen und somatischen Zellen zu erforschen. Dabei werden kurze (21 Nukleotide) doppelsträngige RNAs (dsRNAs), die homolog zu einer Sequenz in der Ziel-mRNA sind, in die Zellen eingeführt, wodurch ein posttranskriptionelles „Gene-Silencing“ (PTGS)-Phänomen hervorgerufen wird. Dabei kommt es zu einer siRNA-vermittelten (small interfering RNA) Degradation der komplementären mRNA, woraufhin die Synthese des entsprechenden Proteins unterdrückt wird (Hannon, 2002; McManus und Sharp, 2002).

Inzwischen hat sich die Technik der RNAi als gentechnisches Verfahren zum Ausschalten von Genen in Laborversuchen etabliert. Vor allem die Verringerung der Genaktivität anstelle des kompletten Ausschaltens bietet Möglichkeiten zur weiteren Erkenntnisgewinnung. Daraus ergeben sich intensive Forschungen, die zur Nutzung von Heilungen schwerer Krankheiten führen sollen. Man erhofft sich besonders bei der Therapie von AIDS oder unter anderem Hepatitis in der RNAi ein wertvolles Instrument gefunden zu haben.

3.1 Der RNAi-Mechanismus – Das Modell

Das Prinzip des RNAi-Mechanismus (Meister und Tuschl, 2004; Hannon, 2003) ist in Abbildung 11 dargestellt.

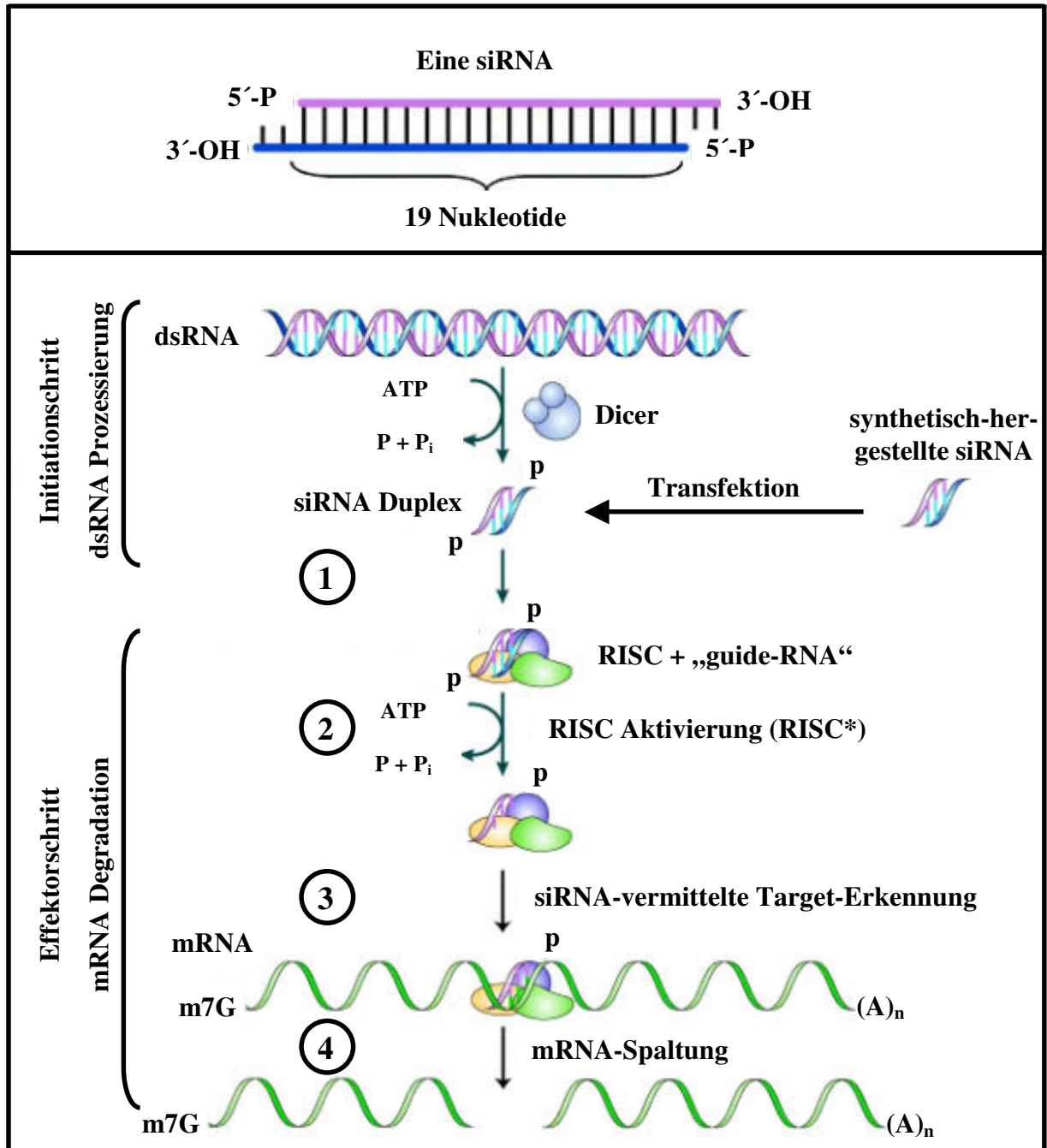


Abb. 11: Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus.

Die Darstellung zeigt die einzelnen Reaktionsschritte des RNAi-Mechanismus. Die Zahlen geben die einzelnen Teilschritte des Effektorschrittes an: (1) Inkorporation der siRNA in den RISC, (2) Aktivierung des RISCs, (3) Lokalisation und Erkennung des mRNA-Substrates, (4) Spaltung des mRNA-Substrates. Der fünfte Effektorschritt (Degradation der m-RNA mittels „Slicer“ und Regeneration des RISCs) ist im Schaubild nicht dargestellt. Abbildung modifiziert nach Dykxhoorn *et al.* (2003).

Der Mechanismus beginnt mit dem Initiationsschritt, in dem zunächst das dsRNA-Substrat durch die Ribonuklease „Dicer“ prozessiert wird. Die dabei entstehenden Moleküle werden auch als „small interfering RNAs“ (siRNAs) bezeichnet und besitzen eine charakteristische Struktur. Sie sind 21-25 nt lang und weitgehend doppelsträngig. Für den nachfolgenden Effektorschritt spielt die siRNA eine zentrale Rolle, da sie die sequenzspezifische Erkennung der Ziel-mRNA mediiert. Dabei assoziiert das doppelsträngige siRNA-Molekül zunächst mit einem Multienzymkomplex, der auch als „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) bezeichnet wird. Im Anschluss an die Inkorporation in den RISC wird die siRNA in einer ATP-abhängigen Reaktion entwunden und einer der beiden Stränge bleibt als sogenannte „guide-RNA“ (antisense RNA) mit dem RISC assoziiert. Dieser RNP-Komplex wird auch als aktivierter RISC oder RISC* bezeichnet. Die Erkennung der Ziel-mRNA durch den RISC* erfolgt über die Hybridisierung mit der „guide-RNA“. Nach der Erkennung wird die mRNA an einer spezifischen Position innerhalb des Hybrids durch die Endonuklease „Slicer“ hydrolysiert (in Abb. 11 nicht dargestellt). Während die dabei entstehenden mRNA-Fragmente durch unspezifische Nukleasen im Zytosol abgebaut werden, bleibt der „guide“-Strang unbeeinträchtigt, so dass der RISC* einen weiteren mRNA-Degradationszyklus katalysieren kann.

3.2 pSuper-vermittelte RNAi

Ein in dieser Arbeit verwendetes RNAi-System basiert auf der *in vivo*-Transkription der siRNAs mit Hilfe des pSuper-Vektors (suppression of endogenous RNA) und erlaubt eine stabile Expression von siRNAs in transfizierten Zellen (Abb. 12). In diesen Vektor werden zwei hybridisierte 64 Bp-DNA-Oligonukleotide kloniert, welche für sogenannte shRNAs (short hairpin-RNAs) kodieren. Diese Primärtranskripte des Vektors dienen als Substrat für das RNaseIII-verwandte zelluläre Enzym „Dicer“, das die shRNAs ATP-abhängig zu kurzen dsRNAs prozessiert. Die prozessierten Produkte (siRNAs) besitzen am 3'-Ende zwei überhängende Uridine und stellen die eigentlich aktiven Effektoren der RNA-Interferenz dar.

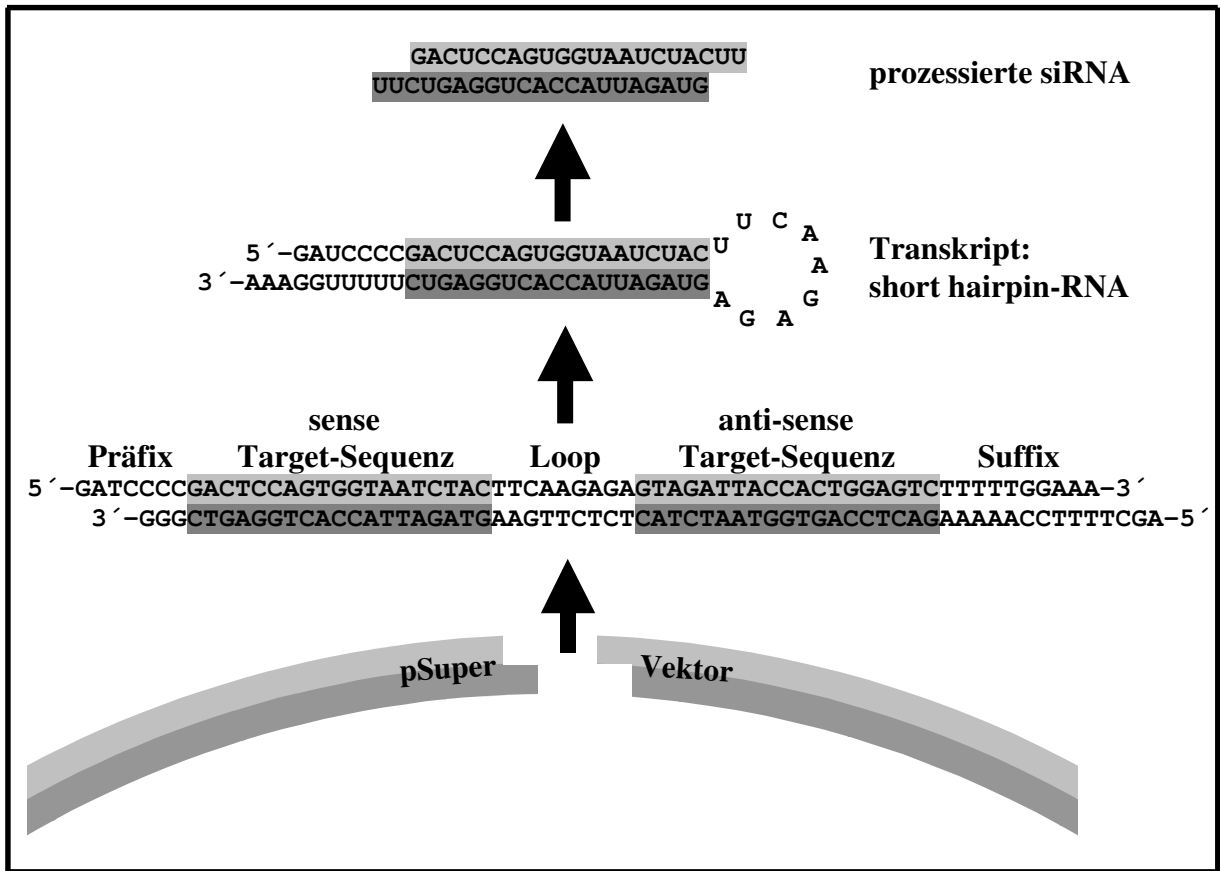


Abb. 12: pSuper-vermittelte RNAi - Schematische Darstellung der Prozessierung der siRNAs.

In den pSuper-Vektor werden zwei hybridisierte 64 Bp-DNA-Oligonukleotide kloniert, welche für sogenannte shRNAs kodieren. Diese Primärtranskripte dienen als Substrat für das Enzym „Dicer“, das die shRNAs ATP-abhängig zu kurzen dsRNAs prozessiert.

4. Zielsetzung

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) zählt nach wie vor zu den Infektionserregern mit überaus hoher medizinischer Relevanz, insbesondere da keine befriedigende Therapie für die weltweit etwa 350 Millionen chronischen Virusträger existiert. Für die Bekämpfung der Hepatitis-B sind daher neue Konzepte zur direkten Verhinderung der Erregervermehrung notwendig. Voraussetzung hierfür ist eine verbesserte Kenntnis der Struktur und der Biologie des Erregers.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Wechselspiel zwischen HBV und der Wirtszelle zu untersuchen und die daran beteiligten zellulären Komponenten und Mechanismen zu identifizieren und zu charakterisieren. Als Forschungsschwerpunkt wurde dabei die Frage des Sortierungs- und Transportmechanismus der viralen Substrukturen (HBV-Hüllproteine) zum Ort des Viruszusammenbaus näher untersucht.

Im Infektionszyklus des Hepatitis-B-Virus spielt das große L-Hüllprotein mit seiner präS1-Domäne eine zentrale Rolle. Es vermittelt die Bindung und Aufnahme in die Leberzelle, die Verpackung der Nukleokapside in die Virushülle, die Regulation der cccDNA-Amplifikation und eine transkriptionelle Aktivierung in der Wirtszelle. Zur Erfüllung seiner vielfältigen Aufgaben benötigt das L-Protein Unterstützung durch Wirtszellfaktoren, von denen einige im Rahmen vorheriger Untersuchungen durch Verwendung von präS1-Konstrukten als Fängerproteine im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert wurden (Hartmann-Stühler und Prange, 2001). Mehrere Klone, die im Hefe-Zwei-Hybrid-Test mit dem C-terminalen präS1-Fängerprotein (Aminosäure 44-108) isoliert werden konnten, enthielten Teile der cDNA von $\gamma 2$ -Adaptin, einem mutmaßlichen Mitglied der Clathrin-Adaptorprotein-Familie. Weitere Bindungsstudien (Koimmunpräzipitation) zeigten eine spezifische Interaktion zwischen der OH-Domäne des $\gamma 2$ -Adaptins und der präS1-Region von L.

Als Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit diente zunächst die Hypothese, dass bei späten Schritten von HBV-Infektionen das $\gamma 2$ -Adaptin, ein Adaptorprotein, welches intrazelluläre Transportprozesse steuert, eine vitale Rolle zu spielen scheint (Hartmann-Stühler und Prange, 2001). In Analogie zur Funktionsweise von Adaptin-Molekülen sollte geklärt werden, ob das $\gamma 2$ -Adaptin die Sprossung und Freisetzung von HBV initiiert und steuert (Abb. 13). Dazu wurde die Expression von $\gamma 2$ -Adaptin in HBV-replizierenden Zellkulturen entweder durch RNA-Interferenz oder durch den Einsatz *trans*-dominant-negativer Mutanten inhibiert. Darüber hinaus sollte der Prozess der Rekrutierung von $\gamma 2$ -Adaptin zum Ort der Virusmontage über Autofluoreszenz-Studien in Echtzeit beobachtet werden. Ein zusätzlicher Aspekt der Arbeit beschäftigte sich mit der Suche nach weiteren möglichen Interaktionspartnern viraler

Substrukturen mit dem $\gamma 2$ -Adaptin, die zur HBV-spezifischen Assembly-Plattform rekrutiert werden könnten.

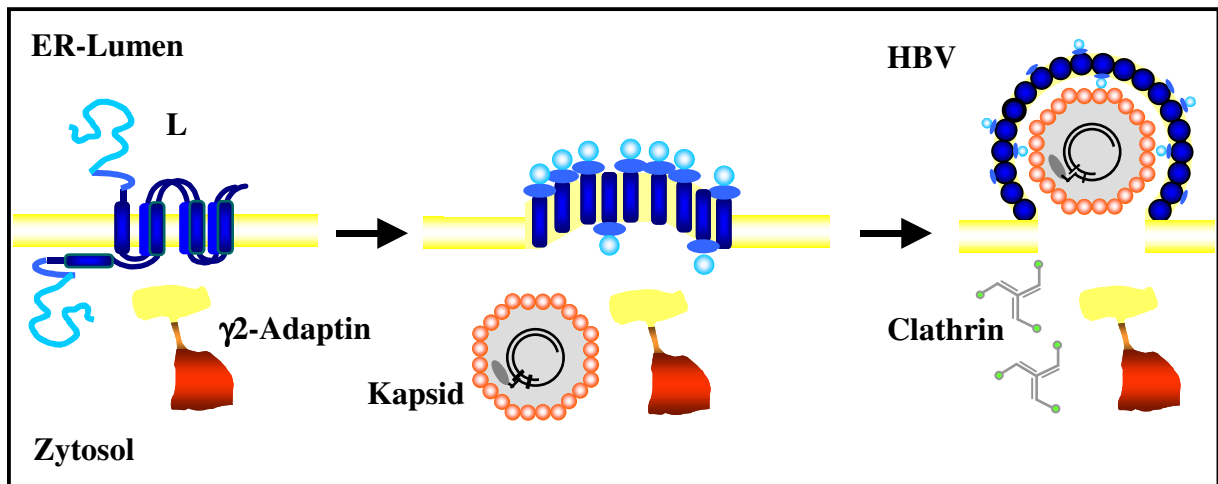


Abb. 13: Arbeitshypothese der Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin bei der HBV-Freisetzung.

Dieses Schaubild stellt die angenommene Funktion des Adaptorproteins $\gamma 2$ -Adaptin bei der HBV-Sprossung von der ER-Membran (gelb dargestellt) ins Zytosol dar. Dabei soll bei späten Schritten der HBV-Infektion das $\gamma 2$ -Adaptin zum Ort des Zusammenbaus rekrutiert werden um die Verpackung der Kapside zu initiieren und zu steuern.

Alle Untersuchungen zur Rekrutierung und Ausbeutung wirtseigener Zellkomponenten durch das Virus sollen außerdem dazu beitragen, mögliche Angriffspunkte therapeutischer Interventionen zu definieren.

II. MATERIAL

1. Zelllinien

1.1 Prokaryonten

Name	Bakterium	Eigenschaften	ATCC/Firma
DH5α	<i>E.coli</i>	<i>supE44 lacU 169 (Φ80lacZM15) hsdR17 recA endA1 gyrA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	ATCC 53868
Superkompetente One Shot [®] TOP10 Competent Cells	<i>E.coli</i>	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tab. 3: Zelllinien der Prokaryonten.

1.2 Eukaryonten

Name	Quelle	Organismus	Eigenschaft	ATCC/ECACC
COS7*	Nierentumor	<i>Cercopithecus aethiops</i>	adherent	CRL-1651
Hepa 1-6	Leberkrebs	<i>Mus musculus</i>	adherent	CRL-1830
HuH7	Leberkrebs	<i>Homo sapiens</i>	adherent	01042712
HepG2	Leberkrebs	<i>Homo sapiens</i>	adherent	HB-8065
293*	Nierentumor	<i>Homo sapiens</i>	adherent	CRL-1573
EcR-LHA-293*	Nierentumor	<i>Homo sapiens</i>	adherent	Lambert+Prange (2004)
HeLa	Gebärmutterhalskrebs	<i>Homo sapiens</i>	adherent	CCL-13
HuTK 143B	Knochenkrebs	<i>Homo sapiens</i>	adherent	CRL-8303
DG75	Burkitt-Lymphom	<i>Homo sapiens</i>	schwimmend	CRL-2625

Tab. 4: Zelllinien der Eukaryonten.

*Die Zelllinien COS7 und 293 und EcR-LHA-293 exprimieren das SV40 T-Antigen.

2. Medien

2.1 Zellkulturmedium

Alle eukaryontischen Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium; GibcoBRL) mit 10% (v/v) FCS (Fötales Kälberserum), ebenfalls von GibcoBRL, kultiviert.

2.2 Transfektionsmedium

Zur Transfektion mit Lipofectamine PlusTM (GibcoBRL) und LipofectamineTM 2000 (GibcoBRL) wurde das serumfreie Medium Opti-MEM (GibcoBRL) verwendet.

3. Inhibitoren des Protein-Abbaus

3.1 Proteasom-Inhibitoren

Es gibt verschiedene niedermolekulare Substanzen, die in die Zellen eindringen und selektiv den Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau hemmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteasom-Inhibitoren sind Peptid-Aldehyde, die reversibel das Proteasom-System inhibieren (Nandi *et al.*, 2006). Beide Inhibitoren blockieren die proteolytische Aktivität des 26S-Proteasoms, ohne dabei die ATPase- oder Isopeptidase-Aktivität zu beeinflussen (Lee *et al.*, 1998).

- | | | |
|---------|--|-------|
| • MG132 | N-CBZ-Leu-Leu-Leucinal | Sigma |
| • ALLN | N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (Calpain Inhibitor I) | Sigma |

3.2 Lysosom-Inhibitoren

Es gibt lysosomotrope Substanzen (schwache Basen), die den lysosomalen Abbau von Proteinen hemmen. Diese dringen in das Lysosom ein und neutralisieren die dort befindlichen Protonen (Ciechanover, 2005).

- | | |
|--|-------|
| • NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid) | Merck |
| • Chloroquin | Sigma |

4. Plasmide

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zur transienten Proteinexpression in Säugerzellen die wie folgt aufgeführten Plasmide verwendet. Plasmide, die für diese Arbeit erstellt wurden, sind dort mit (*) gekennzeichnet. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen. Unter der Bezeichnung eines Plasmids ist in Klammer die weiter verwendete Kurzform des Plasmid-Namens angegeben.

4.1 Plasmide des HBV-Genoms

Es wurde in dieser Arbeit der HBV-Subtyp *ayw* verwendet. Die Numerierung der Nukleotidsequenz erfolgt nach Galibert *et al.* (1979), wobei die singuläre *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle des HBV-Genoms als Numerierungsstartpunkt dient.

Name	Beschreibung
pHBV _{234/2922} (HBV _{1,1})	Dieser Vektor trägt ein 1,1-faches HBV-Genom (2922-84 nt), das unter der Kontrolle des hMTIIa Promoters steht (Radziwill <i>et al.</i> , 1990).
pHBV (HBV ₁)	pBR322; trägt in der singulären <i>EcoRI</i> -Schnittstelle das 3,2 kB große HBV-Genom.
pHBV _{L-} (HBV _{L-})	Um die Expression des HBV-Hüllproteins (L) im offenen Leserahmen (ORF) des Virus-Genoms zu unterbinden, wurde das Startkodon Met ¹ mutiert. Durch eine M13-Mutagenese mit dem Primer M1T, 5'-ATTCTGCCCCGTGCTGCAGATCTTGTTCCC-3' wurde anstelle der Aminosäure Methionin ein Threonin eingefügt, ohne dabei den überlappenden ORF der viralen Polymerase zu beeinträchtigen (Löffler-Mary <i>et al.</i> , 2000).
pHBV _{DM} (HBV _{DM})	Um die Expression der HBV-Hüllproteine (M und S) im ORF von L zu unterbinden, wurden die Startkodons Met ¹⁰⁹ und Met ¹⁶⁴ mutiert. Durch eine M13-Mutagenese mit den Primern: M109T: 5'-CACTGCGTGGCCTGAGGA-3' und M164T: 5'-GATGTTCTCCGTGTTTCAGC-3' wurde anstelle der Aminosäure Methionin jeweils ein Threonin eingefügt, ohne dabei den überlappenden ORF der viralen Polymerase zu beeinträchtigen (Löffler-Mary <i>et al.</i> , 2000).

Tab. 5: Plasmide des HBV-Genoms.

4.2 Fluoreszierende Plasmide

Die Transkription der folgenden fluoreszierenden Proteine (GFP, CFP und YFP) stehen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors ($P_{CMV IE}$). Gene, die in die MCS-Region kloniert werden, werden ebenfalls vom CMV-Promotor kontrolliert und als Fusionsproteine (Fusion am C- oder N-Terminus) exprimiert (Clontech).

Name	Beschreibung
pEGFP-C1	Dieser Vektor kodiert für das grün-fluoreszierende Aequorea victoria Protein (GFP). Das EGFP-Gen enthält im Vergleich zum Wildtypprotein zwei Aminosäure-Substitutionen (F64L; S65T).
pECFP-C1	Dieser Vektor kodiert für eine verstärkte cyano-Variante des grün-fluoreszierenden Aequorea victoria Proteins (GFP). Das ECFP-Gen enthält sechs Aminosäure-Substitutionen (Y66W; F64L; S65T; N146I; M153T; V163A).
pEYFP-C1	Dieser Vektor kodiert für eine verstärkte gelb-grüne Variante des grün-fluoreszierenden Aequorea victoria Proteins (GFP). Das EYFP-Gen enthält vier Aminosäure-Substitutionen (S65G; V68L; S72A; T203Y).
pEYFP-N1	Ähnlich wie pEYFP-C1, jedoch wird hier das zu fusionierende Gen an den N-Terminus des YFP-Gens kloniert.

Tab. 6: Fluoreszierende Plasmide.

4.3 Plasmide der HBV-Hüllproteine

Zur transienten Proteinexpression in Säugerzellen wurde die Gene der Hüllproteine in das Plasmid pNI2 kloniert. Die Transkription der jeweiligen Konstrukte steht unter der Kontrolle des humanen Metallothionein-IIa- (hMTIIa-) Promotors und tragen jeweils das HBV-spezifische Polyadenylierungssignal in der 3'-nichtkodierenden Region.

Name	Beschreibung
pNI2.L (L)	Das HBV-L-Gen steht unter der Kontrolle des hMTIIa-Promotors. Zur Amplifizierung des Plasmids in COS-7-Zellen trägt es die SV40-Promotor-Sequenz (Israel <i>et al.</i> , 1989).
pNI2.LHA (LHA)	Das HBV-L-Gen wurde am 3'-Ende mit einem Influenzavirus Hämagglutinin- (HA-) Epitop (YPYDVPDYA) markiert (Prange <i>et al.</i> , 1991).
pNI2.L _{DM} HA (L _{DM} HA)	Um die Expression der HBV-M- und S-Hüllproteine im offenen Leserahmen (ORF) von L zu unterbinden, wurden die entsprechenden Startkodons (Met ¹⁰⁹ und Met ¹⁶⁴) mutiert. Durch M13-Mutagenese wurde anstelle der Aminosäure Methionin jeweils ein Threonin eingefügt (Löffler-Mary <i>et al.</i> , 2000).
pNI2.SHA (SHA)	Das HA-Epitop wurde durch gezielte Mutagenese unter Verwendung des M13mp19.HBV-Bakteriophagen (Löffler-Mary <i>et al.</i> , 1997) und dem Antisense-Nukleotid 5'-G TTT TGT TAG GGT TTA <u>CAA GCT AGC GTA ATC GGT AAC ATC GTA TGG GTA AAT GTA TAC CCA AAG</u> -3' (die HA-spezifische Sequenz ist unterstrichen) direkt mit dem C-Terminus des S-Gens fusioniert.
pNI2.L _{DM} HA-YFP(*) (L _{DM} -YFP)	Das Gen des HA-markierten, doppelt mutierten L-Hüllproteins (L _{DM}) wurde mit dem Restriktionsenzym <i>Bam</i> HI aus dem Vektor pNI2.L _{DM} HA herausgeschnitten (766 Bp-Fragment) und N-terminal an das YFP-Gen in den mit <i>Bam</i> HI geöffneten pEYFP-N1-Vektor (5178 Bp-Fragment) kloniert.
pNI2.SHA-YFP(*) (S-YFP)	Das Gen des HA-markierten S-Hüllproteins wurde mit den Restriktionsenzymen <i>Psi</i> I und <i>Xho</i> I aus dem Vektor pNI2.LHA herausgeschnitten (738 Bp-Fragment) und N-terminal an das YFP-Gen in den mit <i>Xho</i> I und <i>Bam</i> HI geöffneten pEYFP-N1-Vektor (4690 Bp-Fragment) kloniert.

Tab. 7: Plasmide der HBV-Hüllproteine.

4.4 Plasmide der Adaptine

pcDNA-Vektoren eignen sich optimal zur transienten Expression in eukaryontischen Zellen.

Name	Beschreibung
pcDNA3	Expressionsvektor für Eukaryonten mit Cytomegalovirus-(CMV)-Promotor (Invitrogen). Es kommt zu einer episomale Replikation in Zelllinien, die das SV40 T-Antigen exprimieren (z.B. COS7- und 293-Zellen).
pcDNA3.1	Expressionsvektor für Eukaryonten. Er entspricht pcDNA3, besitzt aber einen modifiziertem Polylinker (Invitrogen).
pcDNA3-HA. γ 1 (HA- γ 1)	γ 1-Adaptin mit N-terminalem HA-Epitop in pcDNA3 (Takatsu <i>et al.</i> , 1998); Gabe aus dem Labor von K. Nakayama, Japan.
pcDNA3-HA. γ 2 (HA- γ 2)	γ 2-Adaptin mit N-terminalem HA-Epitop in pcDNA3 (Takatsu <i>et al.</i> , 1998); Gabe aus dem Labor von K. Nakayama, Japan.
pcDNA3-HA. γ 2 _{Δ528-785} (HA- γ 2 _{Δ528-785})	Deletion am C-Terminus von γ 2-Adaptin (<i>Xho</i> I- <i>Apa</i> I-Fragment 1629-2403 nt von γ 2-Adaptin deletiert; Numerierung nach GenBank Acc. Nr. AB015318), (Hartmann-Stühler <i>et al.</i> , 2001).
pcDNA3-HA. γ 2 _{Δ627-785} (HA- γ 2 _{Δ627-785})	Deletion am C-Terminus von γ 2-Adaptin (<i>Xho</i> I- <i>Bgl</i> II-Fragment 1926-2403 nt von γ 2-Adaptin deletiert; Numerierung nach GenBank Acc. Nr. AB015318), (Hartmann-Stühler <i>et al.</i> , 2001).
pcDNA3-HA. γ 2 _{Δ1-522} (*) (HA- γ 2 _{Δ1-522})	Deletion am N-Terminus von γ 2-Adaptin (<i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I-Fragment 49-1611 nt von γ 2-Adaptin deletiert; Numerierung nach GenBank Acc. Nr. AB015318).
CFP- γ 2 (*)	Das CFP-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen <i>Bgl</i> II und <i>Ase</i> I aus dem pECFP-C1-Vektor herausgeschnitten (1336 Bp-Fragment) und N-terminal an das HA. γ 2-Adaptin-Gen in den Vektor pcDNA3-HA. γ 2 kloniert, welcher mit den Restriktionsenzymen <i>Bsi</i> WI und <i>Nru</i> I geöffnet wurde (7102 Bp-Fragment). Das HA-Epitop wurde durch die Klonierung deletiert (zwei AS fehlen N-terminal).

Tab. 8: Plasmide der Adaptine.

4.5 Plasmide der pSuper-Konstrukte

Für das Vektor-basierte Silencing wurde der pSuper-Vektor von OligoEngine verwendet. In der „multiple cloning site“ befinden sich die beiden Schnittstellen (928 Bp, 934 Bp) für die Restriktionsenzyme *Bgl*III und *Hind*III zur Klonierung der Silencing-Primer.

Name	Beschreibung
pSuper.basic (pSuper)	Der Vektor basiert auf einem pBluesScript-KS und ist 3176 Bp groß. Die Transkription der einklonierten Primer steht unter der Kontrolle des H1-RNA-Promotors (OligoEngine). T7 Primer Bindungsstelle (AATACGACTCACTATAG): 627-643 Bp T3 Primer Bindungsstelle (CTTTAGTGAGGGTTAAT): 989-1005 Bp.
Für die folgenden Klonierungen wurde der pSuper.basic-Vektor in der „multiple cloning site“ mit den Restriktionsenzymen <i>Bgl</i> III und <i>Hind</i> III geöffnet und mit den jeweiligen hybridisierten 64 Bp-DNA-Primern (vgl. Tab. 11) ligiert, welche die Targetsequenzen für das entsprechende Gen enthielten:	
pSuper-GFP-Silencing	Targetsequenz: GAACGGCATCAAGGTGAAC (476 nt nach Startcodon) Dieser Vektor wurde im „Department of Genetics and Microbiology“ der „University Medical Centre“ in Genf (Schweiz) entwickelt und uns netterweise zur Verfügung gestellt.
pSuper-γ2 #1 (*)	Targetsequenz: ACTGCTCTACGTCCACATG (159 nt nach Startcodon)
pSuper-γ2 #2 (*)	Targetsequenz: ACTGATCGCCTCCTCCAGA (219 nt nach Startcodon)
pSuper-γ2 #3 (*)	Targetsequenz: ATGCCGGAATGCGGTCCT (851 nt nach Startcodon)
pSuper-γ2 #4 (*)	Targetsequenz: AGCAAAGAAGCAGCCCAGC (1804 nt nach Startcodon)

Tab. 9: Plasmide der pSuper-Konstrukte.

4.6 Bicistronische Plasmide

Zur Sicherstellung der Kotransfektion zwei verschiedener Plasmide wurden Bicistronische Konstrukte hergestellt.

Name	Beschreibung
HA- γ 2-LHA _{Bi} (*)	Das HA-markierte HBV-L-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen <i>HpaI</i> und <i>ScaI</i> aus dem pNI2.LHA-Vektor herausgeschnitten (3119 Bp-Fragment) und C-terminal an das HA-markierte γ 2-Adaptin-Gen in den Vektor pcDNA3-HA. γ 2 kloniert, welcher mit den Restriktionsenzymen <i>SmaI</i> und <i>BsmI</i> geöffnet wurde (6691 Bp-Fragment).
HA- γ 2 _{Δ1-522} -LHA _{Bi} (*)	Das HA-markierte HBV-L-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen <i>HpaI</i> und <i>ScaI</i> aus dem pNI2.LHA-Vektor herausgeschnitten (3119 Bp-Fragment) und C-terminal an das HA-markierte, deletierte γ 2-Adaptin-Gen in den Vektor pcDNA3-HA. γ 2 _{Δ1-522} kloniert, welcher mit den Restriktionsenzym <i>SmaI</i> geöffnet wurde (6227 Bp-Fragment).
HBV-pSuper- γ 2 _{Bi} #2 (*)	Die pSuper- γ 2-Adaptin-Silencing Transkriptionseinheit wurde aus dem Vektor pSuper- γ 2 #2 mit den Restriktionsenzymen <i>NotI</i> und <i>Xho</i> herausgeschnitten (349 Bp-Fragment) und in den mit <i>SmaI</i> geöffneten pHBV _{234/2922} -Vektor (6450 Bp-Fragment) kloniert.
HBV-pSuper- γ 2 _{Bi} #3 (*)	Die pSuper- γ 2-Adaptin-Silencing Transkriptionseinheit wurde aus dem Vektor pSuper- γ 2 #3 mit den Restriktionsenzymen <i>NotI</i> und <i>Xho</i> herausgeschnitten (349 Bp-Fragment) und in den mit <i>SmaI</i> geöffneten pHBV _{234/2922} -Vektor (6450 Bp-Fragment) kloniert.

Tab. 10: Bicistronische Plasmide.

5. Primer

5.1 DNA-Primer

5.1.1 Sequenzierung von pcDNA3-HA.γ2

Zur Sequenzierung der 5'- und 3'-Übergänge des pcDNA3-Vektors zur klonierten γ2-Adaptin-Nukleotidsequenz wurden folgende Primer eingesetzt:

γ2-Adaptin5: 5'-GCTCCTGGGCCTGAGTCT-3'

γ2-Adaptin3: 5'-CACCAGTCGGTGCAGGAG-3'

5.1.2 Klonierung der pSuper-Silencing-Konstrukte

In den pSuper-Vektor wurden die folgenden hybridisierten 64-Bp-Oligonukleotide kloniert:

Name	Sequenz	Position (nt)	Referenz (Reinigung)
pSuper-γ2 #1 Forward	5'-GATCCCC ACTGCTCTACGTCCACATG TTCAAG AGACATGTGGACGTAGAGCAGTTTTTTGGAAA-3'	159	Invitrogen (PAGE)
pSuper-γ2 #1 Reverse	5'-AGCTTTTCCAAAA ACTGCTCTACGTCCACAT GTCTCTTGAA CATGTGGACGTAGAGCAGT GGG-3'		
pSuper-γ2 #2 Forward	5'-GATCCCC ACTGATCGCCTCCTCCAGA TTCAAG AGAT TCTGGAGGAGGCGATCAGT TTTTTGGAAA-3'	219	Metabion (HPLC)
pSuper-γ2 #2 Reverse	5'-AGCTTTTCCAAAA ACTGATCGCCTCCTCCAG ATCTCTTGAA TCTGGAGGAGGCGATCAGT GGG-3'		
pSuper-γ2 #3 Forward	5'-GATCCCC ATGCCGGAATGCGGTCTT TTCAAG AGA AGGACCGCATTTC CGGCATTTTTTGGAAA-3'	851	Metabion (HPLC)
pSuper-γ2 #3 Reverse	5'-AGCTTTTCCAAAA ATGCCGGAATGCGGTCTT TTCTCTTGAA AGGACCGCATTTC CGGCATGGG-3'		
pSuper-γ2 #4 Forward	5'-GATCCCC AGCAAAGAAGCAGCCCAGC TTCAAG AGAGCTGGGCTGCTTCTTTGCTTTTTTGGAAA-3'	1804	Metabion (HPLC)
pSuper-γ2 #4 Reverse	5'-AGCTTTTCCAAAA AGCAAAGAAGCAGCCCAG CTCTCTTGAA GCTGGGCTGCTTCTTTGCT GGG-3'		

Tab. 11: DNA-Primer zur Klonierung der pSuper-γ2-Adaptin-Silencing-Konstrukte.

5.2 RNA-Primer

5.2.1 Kontroll-siRNAs

Für einen Funktionstest der RNAi wurde eine Kontroll-siRNA gegen das Protein Lamin A/C im Western-Blot und eine „non-silencing“ Fluorescein-markierte siRNA (beide aus dem RNAi Starter Kit von Qiagen) in der Autofluoreszenz eingesetzt.

5.2.2 γ 2-Adaptin-siRNAs

Es wurden fünf siRNAs passend zu verschiedenen γ 2-Adaptin-Nukleotidpositionen über Qiagen bezogen. Diese wurden HPLC-gereinigt und bereits hybridisiert geliefert.

Name	Sequenz	GC-Gehalt	Position (nt)
γ 2-siRNA #1	5' – CUGCUCUACGUCCACAUGU dTdT-3' –5' 3' –dTdT GACGAGAUGCAGGUGUACA –5'	47,6%	158
γ 2-siRNA #2	5' – GGCCUGGCCUUGUGCACUU dTdT-3' –5' 3' –dTdT CCGGACCGGAACACGUGAA –5'	57,1%	359
γ 2-siRNA #3	5' – CACGGACACCAGCCGAAAU dTdT-3' –5' 3' –dTdT GUGCCUGUGGUCGGCUUUA –5'	52,4%	832
γ 2-siRNA #4	5' – ACCCUGCUUUGCUGUUAU dTdT-3' –5' 3' –dTdT UGGGACGAAACGACAAUUG –5'	38,1%	2067
γ 2-siRNA #5	5' – CCCUGCUUUGCUGUUAUUC dTdT-3' –5' 3' –dTdT GGGACGAAACGACAAUAG –5'	42,9%	2068

Tab. 12: RNA-Primer zur RNAi mit γ 2-Adaptin-siRNAs.

6. Antikörper

6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Quelle
MA18/7	monoklonaler Maus-Antikörper gegen die präS1-Region von L (Epitop: DPAF)	WB: 1:1000 IF: 1:200	(Heermann <i>et al.</i> 1984)
K47	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die präS1-Region von L	IF: 1:100 KoIP: 1:29 IP: 1:167	(Löffler-Mary <i>et al.</i> , 1997)
K37	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das S-Protein von HBV	KoIP: 1:29 IP: 1:100	(Löffler-Mary <i>et al.</i> , 1997)
K46	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das Coreprotein von HBV	WB: 1:1000	(Rost <i>et al.</i> , 2006)
K45	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das Coreprotein von HBV	IF: 1:100	(Rost <i>et al.</i> , 2006)
α Core-Ag	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das Coreprotein von HBV	IP: 1:83	DAKO
α HBs-Ag (#70-HG15)	polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen das S-Protein von HBV	WB: 1:1000	Fitzgerald
α HBs-Ag (#3EF)	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das S-Protein von HBV	IF: 1:100	DAKO
$\alpha\gamma$ 2-Ag (8330)	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Ende des γ 2-Adaptins (Epitop: ₈₀₃ HQSVQEIFEVNNLPVESWQ ₈₂₂)	WB: 1:400	Eurogentech
$\alpha\gamma$ 2-Ag (8329)	polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Ende des γ 2-Adaptins (Epitop: ₈₀₃ HQSVQEIFEVNNLPVESWQ ₈₂₂)	IF: 1:200	Eurogentech
$\alpha\gamma$ 1-Ag	monoklonaler Maus-Antikörper	WB: 1:1000	Sigma
α Hsc70-Ag (SPA-815)	monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das konstitutiv-exprimierte Hsc70-Chaperon (Hsc73)	WB: 1:1000	StressGen
α Lamin A/C-Ag	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane Lamin A und C (NCL-Lamin-A/C)	WB: 1:100	Novocastra
α 58K-Ag Clone 58K-9	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das 58K-Protein der <i>cis/medial</i> Golgi-Kompartimente	IF: 1:100	Sigma
α HA-Ag	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Hämagglutinin (HA)-Epitop (YPYDVPDYA)	WB: 1:2000 IF: 1:200	BabCO
α GFP-Ag (JL-8)	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Fluoreszenz-Protein (GFP)	WB: 1:1000	BD Bioscience

Tab. 13: Primäre Antikörper.

6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Quelle
α -Maus-POX	polyklonal Ziegen-Antikörper (Peroxidase gekoppelt)	WB: 1:5000	Dianova
α -Ratte-POX	polyklonaler Ziegen-Antikörper (Peroxidase gekoppelt)	WB: 1:5000	Dianova
α -Kaninchen-POX	polyklonaler Ziegen-Antikörper Peroxidase gekoppelt	WB: 1:2000	Dianova
α -Maus-Ag	polyklonaler Ziegen-Antikörper FITC-gekoppelt (grüne Fluoreszenz)	IF: 1:100	Dianova
α -Kaninchen-Ag	polyklonaler Ziegen-Antikörper Cy3 TM -gekoppelt (rote Fluoreszenz)	IF: 1:200	Dianova
α -Maus-Ag (Alexa Fluor 488)	polyklonaler Esel-Antikörper 488nm (grüne Fluoreszenz)	IF: 1:500	Probiotics
α -Ziegen-Ag (Alexa Fluor 350)	polyklonaler Esel-Antikörper 350nm (blaue Fluoreszenz)	IF: 1:500	Probiotics
α -Kaninchen-Ag (Alexa Fluor 594)	polyklonaler Esel-Antikörper 594nm (rote Fluoreszenz)	IF: 1:500	Probiotics

Tab. 14: Sekundäre Antikörper.

6.3 Immunseren

Um in der Immunfluoreszenz unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die fixierten Zellen mit dem jeweilig passenden Tiernormalserum (5% in PBS) der Firma Jackson ImmunoResearch inkubiert. Das Serum sollte sich gegen den Stamm des zweiten Antikörpers richten.

- Mausnormalserum
- Ziegennormalserum
- Eselnormalserum

7. Molekulargewichtsmarker

7.1 DNA-Gewichtsmarker

1. Lambda-DNA

New England Biolabs

mit *EcoRI* und *HindIII* restringiert

2. 100 Bp Marker

Fermentas

7.2 Protein-Gewichtsmarker

1. Low Molecular Weight (LMW)-Marker		2. Molecular Weight (MW)-Marker	
Amersham Pharmacia Biotech:		Fermentas:	
Phosphorylase b	97 kDa	β -galactosidase	116 kDa
BSA	66 kDa	BSA	66,2 kDa
Ovalbumin	45 kDa	Ovalbumin	45 kDa
Carbonic anhydrase	30 kDa	Lactate dehydrogenase	35 kDa
Trypsin Inhibitor	20,1 kDa	REase Bsp98I	25 kDa
α -Lactalbumin	14,4 kDa	β -lactoglobulin	18,4 kDa
		Lysozyme	14,4 kDa

Tab. 15: Protein-Gewichtsmarker.

8. Zentrifugen

Bezeichnung	Name	Firma
Tischzentrifuge	pico Biofuge	Heraeus
Ultrazentrifuge	L8-70M	Beckman
Kühlzentrifugen	Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
	Minifuge RF	Heraeus

Tab. 16: Zentrifugen.

III. Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

Die grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1994) durchgeführt. Dazu zählen:

- das Anlegen von Bakterienkulturen in flüssigen und auf festen Kulturmedien
- Mini-, Midi- und Maxipräparationen von Plasmid-DNA
- Reinigung und Konzentration von Plasmid-DNA aus wässrigen Lösungen
- Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- Manipulation der Enden linearer DNA-Fragmente
- Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese
- Reinigung von DNA aus Agarosegelen
- Ligation von DNA-Fragmenten
- Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen
- Darstellung von Proteinen durch SDS-PAGE
- Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)
- Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)
- DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977)

2. Zellbiologische Methoden

2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle Zellen (COS7-; HuH7-; HepG2-; 293- und EcR-LHA-293-Zellen) wurden in Zellkulturmedium DMEM unter Zugabe von 10% (v/v) fötalem Rinderserum (FCS; GibcoBRL), 1 mM Natriumpyruvat (GibcoBRL) und entsprechender Antibiotika-Zugabe (vgl. Tab. 17) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden sie für eine Minute mit PBS, 2,5 mM EDTA pH 8,0 und 0,25% Trypsin inkubiert, der Überstand wurde abgenommen und die Inkubation für weitere fünf Minuten fortgesetzt. Abschließend wurden die Zellen mit Zellkulturmedium abgelöst, mit frischem Medium verdünnt und in eine Gewebekulturflasche (Greiner) überführt.

Zelllinie	Kultivierung unter Zugabe von:
COS7 / HuH7	100 U/ml Penicillin G (GibcoBRL), 100 µg/ml Streptomycin (GibcoBRL)
293 / EcR-LHA-293*	200 µg/ml Zeozin (Invitrogen) 200 µg/ml Gentamycin-418 (Invitrogen)
HepG2	ohne Zugabe von Antibiotika

Tab. 17: Antibiotika-Zugabe zur Kultivierung eukaryontischer Zellen.

*Die L-Protein-Induktion in den EcR-LHA-293-Zellen erfolgte durch die Zugabe von 4µM Ponasteron A (Sigma).

2.2 Einfrieren von eukaryontischen Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden alle eukaryontischen Zellen in DMEM mit 10% DMSO (Roth) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurde der Zellrasen einer 10cm Kulturschale (Greiner) zweimal mit PBS gewaschen, mit PBS, 2,5 mM EDTA und 0,25% Trypsin eine Minute lang inkubiert und dann mit 10ml DMEM abgelöst. Es folgte eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 1200rpm (Sorvall-Kühlzentrifuge). Das Zellpellet wurde in entsprechender Menge (5×10^6 Zellen/ml) kaltem DMEM mit 10% DMSO aufgenommen und sofort in 1ml vorgekühlten Cryo-Röhrchen (Greiner) aliquotiert. Vor der endgültigen Stickstofflagerung wurden die Zellen in einer kalten Isopropanol-Gefrierbox 24 Stunden lang langsam auf -70°C gebracht.

2.3 Auftauen von eukaryontischen Zellen

Die in Stickstoff gelagerten Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in 5ml DMEM überführt. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Sorvall-Kühlzentrifuge (5 Minuten; 1500rpm) wurde das Zellpellet in 10ml frischem DMEM vorsichtig resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dann konnten die Zellen je nach Wachstum vereinzelt werden.

2.4 Transiente Proteinexpression

Zur transienten Transfektion der adhären Zellskulturen wurden zwei Systeme angewandt, die beide auf dem Prinzip der Lipofektion beruhen (Shih *et al.*, 1997). Hierbei bilden sich durch polykationische Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nukleinsäure an Liposomen aus. Diese sind in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Optimale Voraussetzung für beide Lipofektionsverfahren war eine Endotoxin-freie Aufreinigung (Ethanol-Fällung) der Plasmid-DNA aus den transformierten *E.coli*-Stämmen, sowie subkonfluente (80% konfluent), vitale Zellskulturen zum Zeitpunkt der Transfektion. Die zu transformierenden Zellen wurden am Tag zuvor nach Angaben des Herstellers in eine gewünschte Gewebekulturschale von Greiner (6-Loch-Platte, 6cm- oder 10cm-Schale) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.4.1 Lipofectamine PlusTM

Zur Transfektion von HuH7- und COS7-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine PlusTM von GibcoBRL eingesetzt.

Es wurden zum Zeitpunkt der Transfektion zwei Ansätze hergestellt:

1. Die zu transfizierende DNA wurde in Opti-MEM gelöst und dann mit der entsprechenden Menge an Plus-Reagenz für 15 Minuten prä-komplexiert.
2. Das Lipofectamine-Reagenz wurden ebenfalls in Opti-MEM vorgemischt.

Nach der Inkubationszeit wurden beide Ansätze vereinigt und erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen vorbereitet, in dem das Wachstumsmedium DMEM abgesaugt und durch das Transfektionsmedium Opti-MEM ersetzt wurde. Zum Schluss wurde der DNA-Transfektionskomplex auf die Zellen gegeben und drei Stunden lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium gegen frisches DMEM ausgetauscht. Die transiente Proteinexpression erfolgte über 72 Stunden. Die folgende Tabelle 18 listet die Mengen zur Transfektion von Zellen auf, welche entweder für

Immunfluoreszenz in 6-Well, für Proteinanalysen in 6cm- oder für DNA-Analysen in 10cm-Gewebekulturschalen ausgesät wurden.

Substanz	für Immunfluoreszenz 6-Well (10cm ²)	für Protein-Analysen 6cm-Gewebekultur- schale (20cm ²)	für DNA-Analysen 10cm-Gewebekultur- schale (60cm ²)
1. DNA in Opti-MEM + Plus-Reagenz	4µg in 100µl 6µl	8µg in 250µl 8µl	10µg in 750µl 20µl
2. Lipofectamine- Reagenz in Opti-MEM	4µl in 100µl	12µl in 250µl	30µl in 750µl
Opti-MEM auf Zellen	0,8ml	2ml	5ml
Transfektionsvolumen	1ml	2,5ml	6,5ml
Frisches Medium (3h)	2ml	5ml	12ml

Tab. 18: Mengenangaben zur Transfektion von COS7- und HuH7-Zellen mit Lipofectamin PlusTM.

2.4.2 LipofectamineTM 2000

Zur Transfektion von 293- und HepG2-Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz LipofectaminTM 2000 von GibcoBRL transfiziert.

Es wurden zum Zeitpunkt der Transfektion zwei Ansätze hergestellt:

1. Die zu transfizierende DNA wurde in Opti-MEM gelöst.
2. Das LipofectamineTM 2000-Reagenz wurden ebenfalls in Opti-MEM fünf Minuten präinkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden beide Ansätze vereinigt und 20 Minuten bei Raumtemperatur komplexiert. Zum Schluss wurde der DNA-Transfektionskomplex zum Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben und sechs Stunden lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium gegen frisches DMEM ausgetauscht. Die transiente Proteinexpression erfolgte über 72 Stunden. Die folgende Tabelle 19 listet wiederum die Mengen zur Transfektion von Zellen auf, welche entweder für Immunfluoreszenz in 6-Well, für Proteinanalysen in 6cm- oder für DNA-Analysen in 10cm-Gewebekulturschalen ausgesät wurden.

Substanz	für Immunfluoreszenz 6-Well (10cm ²)	für Protein-Analysen 6cm-Gewebekultur- schale (20cm ²)	für Protein-Analysen 10cm-Gewebekultur- schale (60cm ²)
DMEM auf den Zellen vor Transfektion	1,5ml	4ml	12ml
1. DNA in Opti-MEM	4µg in 250µl	8µg in 500µl	24µg in 1,5ml
2. Lipofectamine TM 2000 in Opti-MEM	10µl in 250µl	20µl in 500µl	60µl in 1,5ml
Transfektionsvolumen	2ml	5ml	15ml
Frisches DMEM (6h)	2ml	5ml	15ml

Tab. 19: Mengenangaben zur Transfektion von 293- und HepG2-Zellen mit LipofectaminTM 2000.

2.5 Aufarbeitung nach Transfektion

2.5.1 Überstände

Das Medium von transfizierten Zellen (Überstand) wurde 48-72 Stunden nach Transfektion abgenommen und durch Zentrifugation (10 Minuten; Raumtemperatur; 2500rpm; Sorvall-Kühlzentrifuge) von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand konnte somit für weitere Analysen (zum Beispiel ELISA) verwendet werden.

2.5.2 Zelllyse

Zur Aufarbeitung der transfizierten Zellen wurden diese 48-72 Stunden nach Transfektion zweimal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Dann wurde 1ml Lysepuffer auf die Zellen gegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden von der Gewebekulturschale abgeschabt und durch gründliches Mischen (2 x 30 Sekunden) aufgebrochen. Durch Zentrifugation wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Der klare Überstand wurde für weitere Analysen verwendet. Tabelle 20 erläutert die verschiedenen Zelllyse-Bedingungen für einen anschließenden Western-Blot, eine folgende Koimmunpräzipitation oder eine Immunpräzipitation.

Puffer	Western-Blot	Koimmunpräzipitation	Immunpräzipitation
Waschpuffer	PBS	TBS	TBS
Lysepuffer	TBS pH 7,5; 0,5% (v/v) NP-40	200mM NaCl; 50 mM HEPES pH 7,5; 2%CHAPS; 20 mM NEM; Protease-Inhibitoren: 1,5µg/ml Antipain; 3µg/ml Chymostatin; 2µg/ml Pepstatin; 10µg/ml Aprotinin	10 mM Tris HCl pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1% NP-40
Zentrifugation	5 Minuten; 4°C; 16000 x g	20 Minuten, 4°C; 16000 x g	5 Minuten; 4°C; 16000 x g
Kühlzentrifuge	(Minifuge)	(Minifuge)	(Minifuge)

Tab. 20: Zelllyse transfizierter Zellen für Western-Blot, Koimmunpräzipitation und Immunpräzipitation.

2.5.3 Zellkernpräparation

Zur Zellkernpräparation wurde der Zellrasen einer 10cm Gewebekulturschale 48-72 Stunden nach Transfektion direkt im Kulturmedium abgeschabt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 16000 x g und 4°C abzentrifugiert (Minifuge-Kühlzentrifuge) und nach einmaligem Waschen

in PBS mit 1ml Homogenisationspuffer (10 mM HEPES pH 7,5; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2) resuspendiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei -20°C wurden die Zellen durch den Einsatz eines „Dounce“-Homogenisators aufgebrochen und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (10 Minuten; 4°C ; 3500rpm) in einem „swing-out“-Rotor (SS34; Sorvall) in der Ultrazentrifuge pelletiert. Die Kernextrakte wurden in Homogenisationspuffer resuspendiert, durch eine Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht (3 x 45 Sekunden bei 40% Leistung im 80-er Intervall; Branson Sonifier 250) und durch erneute Zentrifugation in der Zentrifuge (10 Minuten; 4°C ; 10000rpm) im SS34-Rotor von unlöslichem Material abgetrennt.

2.6 Inhibition von proteasomalem und lysosomalem Abbau

Es wurden verschiedene chemische Substanzen eingesetzt, um den Abbau von Proteinen zu blockieren. Es wurde zwischen proteasomalen und lysosomalen Inhibitoren unterschieden, die wie folgt dem Medium zugegeben wurden:

Proteasom-Inhibitoren:

- MG132 10 μM (in DMSO)
- ALLN 25 μM (in DMSO)

Lysosom-Inhibitoren:

- NH_4Cl 10 μM (in DMEM, pH 7,0)
- Chloroquin 10 μM (in DMEM, pH 7,0)

HuH7-Zellen wurden in einer 6cm Gewebekulturschale mittels Lipofectamine PlusTM (vgl. 2.4.1) transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen in 10ml frischem Medium (DMEM; 2%FCS) aufgenommen. 48 Stunden nach Transfektion wurde den Zellen die entsprechenden Inhibitoren dem Medium zugegeben. 72 Stunden nach Transfektion erfolgte dann die Zelllyse (vgl. 2.5.2), so dass die Inhibitoren 24 Stunden auf die Zellen wirken konnten.

3. Immunologische Methoden

3.1 Koimmunpräzipitation

Ziel einer Koimmunpräzipitation ist es, eine physikalische Interaktion zweier Proteine nachzuweisen. Dazu werden Zellen mit den potentiellen Interaktionspartnern transfiziert (vgl. 2.4). Nach Lyse der Zellen (vgl. 2.5.2) wird zunächst ein Protein durch Immunpräzipitation mit spezifischen, immobilisierten Antikörpern isoliert und nachfolgend der mögliche Interaktionspartner mit einem zweiten Antikörper identifiziert (Koimmunpräzipitation).

In dieser Arbeit erfolgte die Immobilisierung von polyklonalem Kaninchenantiserum spezifisch gegen HBs-Protein (K37) und gegen die präS1-Region des L-Proteins (K47) an Protein-G-Sepharose-Kügelchen (Beads) der Firma Virofem Diagnostika. Dazu wurden zu jedem Lysat 100µl einer 10%-igen Protein-G-Sepharose-Lösung (in TBS-Puffer) und 7µl Antiserum gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C in einer Überkopfschaukel (10rpm). Durch Zentrifugation bei 16000 x g und Raumtemperatur für 20 Sekunden in einer Tischzentrifuge wurde die Agarose sedimentiert und anschließend mit je 1ml TBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100µl TBS aufgenommen und mit Laemmli-Auftragspuffer für fünf Minuten bei 100°C gekocht. Zur Analyse der Proben erfolgte eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und ein Western-Blot.

3.2 HBsAg-ELISA (Abbott)

Ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Proteine können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, welche zuvor mit einem Enzym markiert wurden. Die durch das Enzym katalysierte Farbreaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Proteins.

Für den Nachweis von HBs-Protein wurde der „Auszyme Monoklonal Diagnostic Kit“ (Abbott) verwendet. In diesem ELISA dienten an eine Kugel immobilisierte, monoklonale anti-HBsAg-Mausantikörper als spezifische Fangantikörper. Diese Kugel wurde in einer ELISA-Platte (NUNC) mit 200µl der zu untersuchenden Probe (Zellkulturüberstand oder Zelllysat) inkubiert. Dem Ansatz wurden zusätzlich 50µl eines Konjugates zugegeben, welches den mit Meerrettich-Peroxidase (HRPO = Horseradish-peroxidase) gekoppelten, monoklonalen anti-HBsAg-Detektionsantikörper in löslicher Form enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 75-80 Minuten im Wasserbad bei 40°C, erfolgten mehrere Waschschrte mit Aqua bidest. (Qwik-

Wash; Abbott). Die HRPO-katalysierte Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 300µl OPD- (Ortho-Phenyldiamindihydrochlorid) Substratlösung ausgelöst. Nach Abstoppen der Farbentwicklung (30-35 Minuten im Dunkeln) mit 1ml H₂O₂ konnte die Konzentration an gebundenem HBs-Protein durch photometrische Messung im Abbott-Reader Quantum II bei 492nm detektiert werden. Für die Messung im Abbott-Reader musste die Probe in ein spezielles Röhrchen überführt werden.

3.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

In der Immunfluoreszenz werden der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Damit kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe ein Protein vorhanden ist und auch, in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert sein könnte. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht. Mittels verschiedener Detektionssysteme können schon geringe Mengen an Epitop verstärkt dargestellt werden. Das Ziel ist es, ein Signal am Ort des Epitops (und nur dort) in ausreichender Stärke zu erkennen.

Für Immunfluoreszenz-Analysen dieser Arbeit wurden eukaryontische Zellen vor der entsprechenden Transfektionsmethode (vgl. 2.4) auf Deckgläschen (Roth) in 6-Loch-Platten ausgesät. Für eine bessere Haftung der 293- und der HepG2-Zellen wurden die Deckgläschen 30 Minuten mit 10µg/ml Poly-L-Lysin (Sigma) vorbehandelt. Die Aufarbeitung zur Immunfluoreszenz erfolgte bis zu 48-72 Stunden nach Transfektion. Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch eine Inkubation von 30 Minuten mit 1ml Methanol und 2 mM EGTA bei -20°C. Das Methanol wurde durch gründliches Waschen mit PBS entfernt und unspezifische Bindungsstellen mit 50µl eines 5%-igem Tiernormalserums (vgl. 6.3) in PBS (v/v) blockiert (30 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer). Nach erneutem gründlichen Waschen mit PBS erfolgte eine die Zugabe des primären Antikörpers (50µl mit der entsprechenden Verdünnung (vgl. Tab. 13) in PBS). Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Bei Koimmunfluoreszenzen wurde nachfolgend der zweite und eventuell auch der dritte primäre Antikörper nach dem gleichen Verfahren gebunden. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in 50µl PBS verdünnt (vgl. Tab. 14) und entweder einzeln oder gemeinsam (Koimmunfluoreszenz) direkt auf das Deckglas getropft. Die Inkuba-

tion der sekundären Antikörper erfolgte ebenfalls für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. Danach wurde nochmals überschüssiger Antikörper durch gründliches Waschen mit PBS entfernt. Abschließend wurde das Deckglas in Aqua bidest. getaucht, um Salzkristallbildung beim Trocknen zu verhindern und die getrockneten Proben mit Histogel (Sigma) eingedeckt. Die Mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200) und einer AxioCam Digitalkamera (Zeiss) bei einer 100fachen Vergrößerung erstellt. Die Überlagerung der Doppel- beziehungsweise Trippelimmunfluoreszenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms AxioVision 3.0 (Zeiss).

4. RNA-Interferenz (RNAi)

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man einen natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der gezielt die Expression von einzelnen Genen unterdrückt. Diese Genregulation wird durch siRNA-vermittelte Target-Erkennung auf der mRNA initiiert. Es kommt zur Spaltung der mRNA, wodurch eine Translation zum Protein unterbunden wird. Inzwischen bedient man sich der Technik der RNAi in Laborversuchen, um gezielt Gene auszuschalten.

Die in dieser Arbeit verwendeten RNAi-Systeme basieren zum einen auf der *in vivo*-Transkription der siRNAs mit Hilfe des pSuper-Vektors (OligoEngine), die eine stabile Expression von siRNAs ermöglicht, und zum anderen auf bereits hybridisierte RNAs (siRNAs), die chemisch synthetisiert wurden (Qiagen).

4.1 Target-Auswahl

Die Targets zur RNA Interferenz wurden unter der Berücksichtigung verschiedener Empfehlungen des jeweiligen Herstellers ausgewählt.

	pSuper(OligoEngine)	siRNA (Qiagen)
GC-Gehalt	>30%	45-50%
Position	100 nt nach dem Startkodon	50-100 nt nach dem Startkodon
Poly-N-Sequenzen	Vermeidung von 4 oder mehr Adenine oder Thymidine hintereinander (Poly-A- und Poly-T-Sequenzen können einen vorzeitigen Abbruch des Transkriptes zur Folge haben).	Vermeidung von mehr als drei Guanosine oder Cytosine hintereinander (Poly-G- und Poly-C-Sequenzen können Agglomerate bilden und potentiell mit dem siRNA Silencing-Mechanismus interferieren).
Target	19 nt doppelsträngige, komplementäre Region und ein 2-nt 3'-Überhang an jedem Ende: 1. AA (19NT) TT 2. AA (19NT) Wenn möglich, sollte das Target mit zwei Adenosinen beginnen. Damit ist die siRNA resistenter gegen Nukleasen, und es können dTdT Überhänge gemacht werden.	
Homologien	Die Target-Sequenz sollte keine Homologien mit einem anderen Gen aufweisen. Ein „BLAST Search“ (über PubMed) wird empfohlen, um unerwünschte Silencing-Effekte anderer Gene auszuschließen.	

Tab. 21: Empfehlungen zur Target-Auswahl für RNAi.

4.2 Vektor-basierte RNAi (pSuper)

Zur Ausschaltung des $\gamma 2$ -Adaptin-Gens wurden vier verschiedene pSuper-Silencing-Vektoren konstruiert. Dazu wurden in den leeren pSuper-Vektor zwei hybridisierte 64 Bp-DNA-Oligonukleotide kloniert, die nach Transfektion eine stabile Expression von potentiellen siRNAs gegen $\gamma 2$ -Adaptin ermöglichten.

4.2.1 Herstellung der pSuper-Konstrukte

Folgende vier 64 Bp-Primer-Paare wurden bei Invitrogen bestellt:

Vorwärts Primer: „sense“ „antisense“
 5'-GATCCCC-**19NT**-TTCAAGAGA-**19NT**-TTTTTGAAA-3'

Rückwärts Primer: „sense“ „antisense“
 5'-AGCTTTTCCAAAA-**19NT**-TCTCTTGAA-**19NT**-GGG-3'

In die fettgedruckte Position wurde die entsprechende 19 nt Target-Sequenz (vgl. Tab. 11) einmal in „sense“ und einmal in „antisense“ Orientierung eingesetzt. Diese 64 Bp-Primer-Paare wurden hybridisiert und phosphoryliert. Der pSuper-Vektor selbst wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Hind*III geöffnet und die 5'-Phosphat-Gruppen mit CIP (Calf Intestine Phosphatase) entfernt. Anschließend wurde der geöffnete Vektor mit den hybridisierten Oligos ligiert. Eine genaue Beschreibung ist aus dem Protokoll von OligoEngine zu entnehmen. Nach Transformation von Bakterien wurde eine Minipräparation der Plasmid-DNA durchgeführt, die mittels der Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Hind*III untersucht wurde. Positive Klone zeigten in einem Agarosegel ein Insert von 360 Bp, während negative Klone ein Insert von nur 300 Bp aufwiesen. Nach Maxipräparation der DNA konnten die pSuper-Konstrukte auf eine mögliche Induktion der RNA-Interferenz in eukaryontischen Zellen getestet werden.

4.3 siRNA (Qiagen)

Es wurden fünf verschiedene siRNAs bei Qiagen bestellt, die als potentielle Kandidaten zur Ausschaltung des $\gamma 2$ -Adaptin-Gens in Betracht kamen.

4.3.1 Herstellung doppelsträngiger siRNAs

Die lyophilisierten, synthetisch-hergestellten und noch einzelsträngigen „sense“ und „antisense“ RNAs (vgl. Tab. 12) wurden mit „siRNA Suspension Puffer“ (aus dem RNAi Starter

Kit von Qiagen) so gelöst, dass die gebrauchsfertigen Lösungen eine Endkonzentration von 20 μM aufwiesen. Nach Hybridisierung (eine Minute bei 90°C und anschließend 60 Minuten bei 37°C) erhielt man die gebrauchsfertigen, doppelsträngigen RNAs (siRNAs).

4.3.2 Transfektion von siRNAs

Zur transienten Transfektion von doppelsträngiger RNA mit und ohne DNA wurden ebenfalls Transfektionsreagenzien ausgewählt, die nach dem Prinzip der Lipofektion arbeiten (vgl. 2.4). Optimale Voraussetzung für beide Lipofektionsverfahren war eine RNase-freie Aufreinigung durch Ethanol-Fällung der Plasmid-DNA aus den transformierten *E.coli*-Stämmen, RNase freies Arbeiten sowie subkonfluente (80% konfluent), vitale Zellkulturen zum Zeitpunkt der Transfektion.

Die zu transformierenden Zellen wurden am Tag zuvor nach Angaben des Herstellers in eine gewünschte 6cm Gewebekulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.3.2.1 RNAiFectTM

Um die siRNA alleine effektiv in die Zellen einzubringen, wurde mit dem RNAiFectTM Transfektionsreagenz von Qiagen gearbeitet. Zur Transfektion wurden 5 μg der zu transfizierenden siRNA in 85 μl Puffer EC-R (Qiagen) gelöst. Anschließend wurden 15 μl RNAiFectTM Transfektionsreagenz dazugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen vorbereitet, in dem das Wachstumsmedium DMEM durch 600 μl frisches DMEM ersetzt wurde. Zum Schluss wurde der siRNA-Transfektionskomplex tropfenweise auf die Zellen gegeben und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium gegen 2ml frisches DMEM ausgetauscht. Die Lyse der Zellen (vgl. 2.5.2) erfolgte 48-72 Stunden nach Transfektion.

4.3.2.2 TransMessengerTM

Um siRNA zusammen mit Plasmid-DNA effektiv in Zellen einzubringen, wurde das Transfektionsreagenz TransMessengerTM von Qiagen verwendet. Zur Transfektion wurden 2 μg der zu transfizierenden Plasmid-DNA in 10 μl sterilem PBS gelöst. Dann wurden zu 24 μl „Enhancer R“ (Qiagen) ein entsprechendes Volumen „EC-R-Puffer“ (Qiagen) zugegeben, so dass das Gesamtvolumen nach Zugabe von 1 μg siRNA und 2 μg DNA 1ml entsprach. Es folgte eine Inkubation des Transfektionskomplexes bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Nach der Zu-

gabe von 25µl TransMessengerTM-Transfektionsreagenz erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten. In der Zwischenzeit wurden die Zellen vorbereitet. Dazu wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Zum Schluss wurde 1ml frisches DMEM zu dem Nukleinsäure-TransMessengerTM-Reagenz-Komplex gegeben und die Komplexe wurden sofort tropfender Weise auf die Zellen verteilt. Die Inkubationszeit betrug drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Dann wurde das Transfektionsmedium wieder abgenommen, die Zellen wurden erneut mit sterilem PBS gewaschen, und letztlich erfolgte eine Zugabe von 2ml frischem DMEM. 48-72 Stunden nach Transfektion erfolgte die Aufarbeitung der Zellen wie in 2.5.2 beschrieben.

5. Nachweis von HBV-DNA mit Southern-Dot-Blot

Beim Southern-Blot handelt es sich um eine 1975 von Edwin Southern entwickelte molekularbiologische Untersuchungsmethode für DNA (Southern, 1975). Sie ermöglicht den Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch (z.B. dem gesamten Genom eines Organismus) innerhalb kurzer Zeit, ohne dass sämtliche Sequenzen des Gemisches entschlüsselt werden müssen.

Für einen quantifizierbaren und stabilen HBV-DNA-Nachweis wurden HuH7-Zellen mit dem HBV_{1,1}-Genom transfiziert. Immunpräzipitierte Zelllysate und Zellkulturüberstände konnten nach HBV-DNA-Extraktion mittels eines Dot-Blots-Verfahrens auf eine Membran „gespotet“, und über einen anschließenden Southern-Blot mit spezifischen Sonden sichtbar gemacht werden.

5.1 Virusproduktion

Für eine effiziente Virusproduktion wurden HuH7-Zellen mit dem pMHBV_{1,1}-Vektor mittels Lipofectamine PlusTM transfiziert (vgl. 2.4.1). Das Transfektionsmedium wurde drei Stunden nach der Transfektion gegen DMEM mit 2% FCS (keine Antibiotika-Zugabe) ausgetauscht. Nach 72 Stunden transients Proteinexpression wurden die Zellen wie in 2.5.2 beschrieben lysiert und die Überstände laut 2.5.1 abzentrifugiert.

5.2 Immunpräzipitation der Viren

Um einen Nachweis viraler DNA zu gewährleisten, mussten die Lysate mit einem Anti-Core-Antikörper und die Überstände mit präS1-spezifischen Antikörper (K37 und K47) immunpräzipitiert werden. Die Antikörper wurden an eine 50%-ige Protein-G-Sepharose über Nacht in einer Überkopfschaukel bei 4°C immobilisiert (vgl. Tab. 22).

Zugabe von	pro 500µl Lysat	pro 10ml Überstand
Sepharose (50%-ig)	50µl	100µl
Polyklonale Antiseren	3µl Anti-Core (DAKO)	5µl K37 3µl K47
TBS	200µl	400µl

Tab. 22: Immobilisierung der Antikörper für Southern-Blot-Analysen.

Durch eine anschließende Zentrifugation (Lysate: 20 Sekunden in der Tischzentrifuge bei 16000 x g und RT; Überstände: 1 Minute in der Sorvall-Kühlzentrifuge bei 2500rpm und RT)

wurde die Agarose sedimentiert und anschließend zwei mal mit TBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in soviel TBS aufgenommen, dass das Ausgangsvolumen wieder erreicht wurde.

Nach Vorbeschichtung der Protein-G-Sepharose-Beads wurden zu 10ml des Überstandes 100µl gekoppelte Beads und zu 500µl des Zelllysates 50µl gekoppelte Beads gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C in einer Überkopfschaukel. Durch Zentrifugation bei Raumtemperatur der Lysate (16000 x g; 20 Sekunden; Tischzentrifuge) und der Überstände (2500rpm; 1 Minute; Sorvall-Kühlzentrifuge) wurde die Agarose sedimentiert und anschließend dreimal mit je 750µl Waschpuffer (50 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0) gewaschen. Das Agarosesediment wurde mittels einer Glasspritze (Hamilton) trockengelegt.

5.3 Extraktion der viralen DNA

Um die transfizierte DNA zu entfernen, folgte ein DNase-Verdau. Zur bereits sedimentierten Agarose wurde zu jedem Lysat 100µl und zu jedem Überstand 200µl des folgenden Puffers gegeben: 10 mM Tris pH 8,0; 10 mM NaCl; 200µg/ml DNaseI (Promega); 20 mM MgCl₂. Der Reaktion erfolgte bei 37°C im Wasserbad und wurde durch eine fünf Minuten lange Inkubation bei 65°C abgestoppt. Der anschließende Proteinase-Verdau sorgte dafür, dass die HBV-Corepartikel aufgebrochen wurden und die darin enthaltene DNA zugänglich wurde. Dieser Virenaufschluss erfolgte in einem Endvolumen von 500µl in einer Überkopfschaukel über Nacht bei 37°C im Brutschrank unter der Zugabe von 0,5% SDS, 1 mM EDTA, 40µg t-RNA/ml, 200µg/ml Protein-KinaseK (Sigma), 0,1% β-Mercaptoethanol (Sigma), 10 mM Tris pH 8,0 und 10 mM NaCl. Die Isolierung der nun zugänglichen HBV-DNA erfolgte über eine Phenol-Chlorform-Extraktion (Sambrook *et al.*, 1989) mit einer anschließenden Konzentrierung der DNA durch eine salzfreie Ethanol-Präzipitation (Sambrook *et al.*, 1989). Nach abschließender Zentrifugation bei 4°C, 16000 x g für 30 Minuten (Minifuge-Kühlzentrifuge) wurde das Pellet luftgetrocknet und in 50µl Aqua bidest. aufgenommen und bis zur Verwendung für den Dot-Blot bei -20°C gelagert.

5.4 Dot-Blot

Nach der präparativen Aufreinigung der viralen DNA wurde diese im alkalischen Dot-Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran transferiert. Der Vorteil eines Dot-Blots liegt darin, dass das Ausgangsmaterial punktuell auf eine Membran übertragen und damit aufkonzentriert

werden kann. Die zu analysierenden Proben (je 50 µl des Lysates und Überstandes) wurden mit 0,4N NaOH und 10 mM EDTA für zehn Minuten im Wasserbad denaturiert, anschließend bei Raumtemperatur und 16000 x g kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge) und bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Eine Nylonmembran (Roche) und zwei Lagen Chromatographiepapier (3 MM; Whatman) wurden für zehn Minuten in Aqua bidest. eingelegt und dann wie folgt in die Dot-Blot-Apparatur (S&S Minifold I; Schleicher & Schuell) eingebaut:

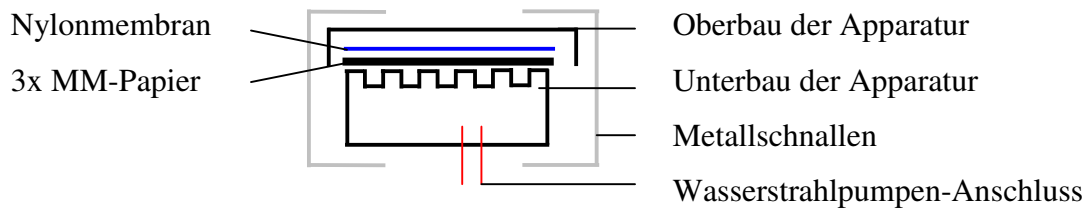


Abb. 14: Schematische Darstellung der Dot-Blot-Apparatur.

Nach Anschließen der Wasserstrahlpumpe wurde durch jedes benötigte Loch erst Aqua bidest. (500 µl) zum Spülen, dann die Probe und zum Schluss 0,4N NaOH (500 µl) zur Denaturierung gesaugt. Dann wurde die Membran aus der Apparatur entfernt, gründlich mit 2xSSC-Puffer (0,3 M NaCl; 30 mM Na₃Citrat2H₂O; pH 7,0) gewaschen und zwischen zwei MM-Papieren luftgetrocknet und bis zur Hybridisierung bei 4°C gelagert.

5.5 Southern-Blot

Die auf der Nylonmembran denaturierte DNA kann nun mit spezifischen Sonden über Hybridisierung detektiert werden. In dem wie folgt beschriebenen Southern-Blot-Verfahren wurden zur Hybridisierung Digoxigenin-markierte Sonden verwendet.

5.5.1 DIG-Markierung der Sonde

Um DNA als Sonde verwenden zu können, wurde sie mit dem Digoxigenin-DNA-Labeling-System (Nr. 1093657) von Roche markiert. Das dabei verwendete Verfahren der "random primed" DNA-Markierung mit Digoxigenin-11-UTP (DIG) basiert auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984).

Als Sonde zur Detektion von HBV-DNA wurde das klonierte HBV-Genom (pBR322) mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert. Nach zehnminütiger Hitzedenaturierung der linearisierten DNA (1 µg/15 µl) im kochenden Wasserbad und Zwischenlagerung im Eiswasserbad wurden zu der DNA 2 µl Hexanucleotid Mix und 2 µl dNTP Labeling Mix (1 mM dATP;

1 mM dGTP; 1 mM dCTP; 0,65 mM dTTP; 0,35 mM DIG-11-dUTP pH 7,5) gegeben. Nach der Zugabe von 1µl Klenow-Enzym (2U/µl) wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2µl EDTA-Lösung (0,2M; pH 8,0) und durch zehnmütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Die Länge der entstandenen DIG-markierten Fragmente variieren laut Hersteller von 200 bis 1000 Bp.

5.5.2 Überprüfung der Markierungseffizienz

Zur Kontrolle der Markierungseffizienz wurde eine Verdünnungsreihe (0pg, 0,01pg, 0,03pg, 0,1pg, 0,3pg, 1pg, 3pg und 10pg) der markierten DNA neben einer solchen Reihe mit DIG-markierter Kontroll-DNA (pBR322 mit *Bam*HI linearisiert) auf eine Nylonmembran gespotet. Um die DNA auf der Membran zu fixieren, wurde diese für 30 Minuten bei 120°C im Hybridisierungsöfen gebacken. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur und unter ständig, leichtem Schütteln durchgeführt. Die dafür notwendigen Lösungen entstammten entweder dem "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Nr. 1093657), oder dem "DIG Wash and Block Buffer Set" (Nr. 1585762) von Roche. Die Nylonmembran wurde für fünf Minuten in Malonsäurepuffer äquilibriert, dann mit Blockpuffer 30 Minuten abgesättigt, anschließend mit Antikörper-Lösung (α -DIG-AP; 1:5000 in Blockpuffer) für 30 Minuten inkubiert und zum Schluss zweimal je 15 Minuten im Waschpuffer gewaschen. Zur Farbdetektion wurde die Membran fünf Minuten lang in Detektionspuffer (1M Tris-HCl; 1M NaCl pH 9,5) äquilibriert und abschließend in 2ml frisch angesetzter Farbsubstrat-Lösung (40µl NBT/BCIP in 2ml Detektionspuffer) bis zur gewünschten Farbentwicklung im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Membran mit TE-Puffer abgestoppt.

5.5.3 Hybridisierung und Detektion

Der Nachweis der Hybridisierung erfolgte durch einen Enzym-Immunoassay (polyklonaler Schaf- α -Digoxigenin-AP; Fab-Fragmente die mit alkalischer Phosphatase konjugiert wurden) über eine Farbreaktion mit dem Substrat NBT/BCIP. Die dafür benötigten Lösungen entstammten entweder dem "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Nr. 1093657), dem "DIG Easy Hyb" (Nr. 1603558) oder dem "DIG Wash and Block Buffer Set" (Nr. 1585762) von Roche.

Die DNA auf der Nylonmembran (vgl. 5.4) wurde zuerst 30 Minuten lang bei 120°C fixiert und anschließend gründlich in 2xSSC gewaschen. Die folgende Hybridisierung erfolgte in einem runden, verschließbaren Plastikgefäß unter stringenten Bedingungen in einem Hybridi-

sierungsofen. Die Membran wurde für eine Stunde im vorgewärmtem Prähybridisierungslösung bei 68°C prähybridisiert. 125ng DIG-markierte Sonde wurden fünf Minuten lang bei 95°C denaturiert und in 5ml vorgewärmter Hybridisierungslösung aufgenommen. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch die Hybridisierungslösung ersetzt. Nach erfolgreicher Hybridisierung (über Nacht bei 68°C) wurde die Membran zweimal je fünf Minuten mit 2xSSC und 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend wurde zweimal je 15 Minuten eine Stringenzwäsche in 0,5 x SSC und 0,1% SDS bei 68°C durchgeführt.

Zur immunologischen Detektion und anschließenden Visualisierung der Sonde wurde die Membran nach der Hybridisierung für fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen. Das anschließende Blockieren der Membran und Detektieren der DNA erfolgte wie bereits in 5.5.2 beschrieben.

IV. Ergebnisse

Mit dieser Arbeit sollte die Hypothese geklärt werden, ob das zelluläre $\gamma 2$ -Adaptin, ein neues angenommenes Mitglied der Clathrin-Adaptor-Proteinfamilie, ein vitaler Sprossungs- und Freisetzungsfaktor des Hepatitis-B-Virus (HBV) ist, das die Knospung und somit die Evasion von HBV initiiert und steuert. Zudem war ein weiteres Ziel der Arbeit zu untersuchen, ob und welche der viralen Proteine einen $\gamma 2$ -Adaptin-vermittelten Transportprozess nutzen, um an ihren Zielort des Zusammenbaus zu gelangen. Dies sollte in HBV-replizierenden Leberzellkulturen untersucht werden, in denen das $\gamma 2$ -Adaptin gezielt inaktiviert wird. Ebenso sollte durch differentielle GFP-Markierung die $\gamma 2$ /L-Interaktion in Echtzeit analysiert und charakterisiert werden.

1. Nachweis von endogenem $\gamma 2$ -Adaptin

Um das endogene $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypprotein untersuchen zu können, war es für diese Arbeit Voraussetzung, dieses Protein mit molekularbiologischen Methoden (z.B. Western-Blot oder Immunfluoreszenz) über geeignete Antikörper darstellen zu können. Dazu wurden zwei polyclonale Antikörper, $\alpha \gamma 2$ -Ag (8330) und $\alpha \gamma 2$ -Ag (8329), aus Kaninchen näher charakterisiert. Beide Antikörper sind gegen die C-terminale Sequenz $_{803}\text{HQS}\text{VQEI}\text{FEV}\text{NNLPVES}\text{-WQ}_{822}$ des $\gamma 2$ -Adaptins gerichtet. Ein Vergleich der humanen $\gamma 2$ -Adaptin-Proteinsequenzen (GenBank Acc. Nr. AB015318) mit der $\gamma 2$ -Adaptin-Proteinsequenz der Maus (GenBank Acc. Nr. AAC67391) zeigte bereits, dass sich diese C-terminale Sequenz in vier Aminosäuren unterscheidet:

GenBank Acc. Nr. AB015318 $\gamma 2$ -Adaptin (human): HQSVQEIFEVNNLPVESWQ

GenBank Acc. Nr. AAC67391 $\gamma 2$ -Adaptin (Maus): GQPVQEIFEVDNLPVETWQ

Da für diese Arbeit auch Zelllinien anderer Organismen (z.B. Affe) zum Einsatz kamen, deren $\gamma 2$ -Adaptin-Sequenz nicht bekannt ist, stellte sich hier die Frage, in wie weit die Antikörper in der Lage sind, das gewünschte Protein Spezies-übergreifend zu erkennen. Folglich wurden acht verschiedene eukaryontische Zelllinien (COS7: Affen-Nierenzellen; Hepa: Maus-Leberzellen; HepG2 und HuH7: humane Leberzellen; HuTK: humane Knochenzellen; 293: humane Nierenzellen; DG75: humane Burkitt-Lymphom-Zellen; Hela: humane Gebärmutterhalszellen) lysiert und mittels einer Gelelektrophorese und eines Western-Blot-Transfers analysiert (Abb. 15, Spuren 2-9). Als Positivkontrolle dienten HA- $\gamma 2$ -transfizierte COS7-Zellen,

die vergleichend untersucht wurden (Spur 1). Die Detektion des $\gamma 2$ -Adaptins erfolgte mit dem $\gamma 2$ -Adaptin-spezifischen Antikörper $\alpha \gamma 2$ -Ag (8330), da dieser im Western-Blot besser geeignet schien als der Antikörper $\alpha \gamma 2$ -Ag (8329).

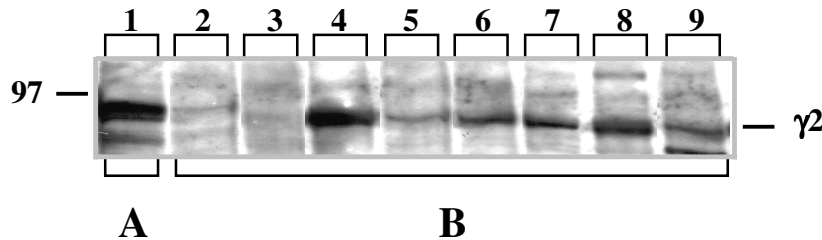


Abb. 15: Nachweis von endogenem $\gamma 2$ -Adaptin in eukaryontischen Zelllinien.

Die Spuren 1-9 korrespondieren mit folgenden Zelllinien: (1) COS7 (HA- $\gamma 2$ transfiziert); (2) COS7; (3) Hepa 1-6; (4) HepG2; (5) HuTK; (6) HuH7; (7) 293; (8) DG75; (9) Hela. (A) Ist eine Kontrolle mit HA- $\gamma 2$ transfizierten, lysierten COS7-Zellen. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte mit dem $\alpha \gamma 2$ -Ag (8330). (B) Sind alles nicht transfizierte, lysierte eukaryontische Zelllinien. Auch hier erfolgte der Nachweis im Western-Blot mit dem $\alpha \gamma 2$ -Ag (8330). Das Molekulargewicht des mitgeführten Markerproteins ist links in kDa notiert.

In eukaryontischen Zellen aus nicht-humanem Organismus, wie zum Beispiel Affe (COS7) und Maus (Hepa 1-6), konnte mit diesem Antikörper kein $\gamma 2$ -Adaptin detektiert werden (Spuren 2+3). Das bedeutet, dass innerhalb dieser C-terminalen Sequenz, die der Antikörper erkennt, bereits vier Substitutionen ausreichen, um eine Anbindung des Antikörpers an das $\gamma 2$ -Adaptin zu vereiteln. Dementsprechend kann man vermuten, dass sich dieser C-terminale Bereich des $\gamma 2$ -Adaptins sich auch zwischen Mensch und Affe unterscheiden könnte. In allen humanen Zelllinien (HepG2, HuTK, HuH7, 293, DG75 und Hela) konnte das $\gamma 2$ -Adaptin nachgewiesen werden (Spuren 4-9), wobei der Nachweis in HepG2-Zellen (humanen Leberzellen) am deutlichsten erfolgte (Spur 4).

Da das $\gamma 2$ -Adaptin eine 49%-ige Homologie mit dem $\gamma 1$ -Adaptin gerade im Erkennungsbereich des Antikörpers, also in der C-terminalen Ohr-Domäne aufweist (Takatsu *et al.*, 1998), musste zudem noch eindeutig sicher gestellt werden, dass es mit dem $\gamma 2$ -Adaptin-spezifischen Antikörper zu keiner Kreuzreaktion mit dem $\gamma 1$ -Adaptin kommt.

GenBank Acc. Nr. AB015318 $\gamma 2$ -Adaptin (human): HQSVQEIFEVNNLPVESWQ

GenBank Acc. Nr. BAA33389 $\gamma 1$ -Adaptin (human): GSAMQDLAEVNNFPQSWQ

Dazu wurden humane HepG2-Zellen entweder mit dem jeweiligen Adaptin-Plasmid (Spur 1: $\gamma 2$ -Adaptin oder Spur 3: $\gamma 1$ -Adaptin) oder zur Kontrolle mit dem leeren Vektor pcDNA3.1 (Spuren 2+4) transfiziert, anschließend lysiert und mittels einer Gelelektrophorese und eines Western-Blot-Transfers analysiert. Die Detektion erfolgte entweder mit dem $\gamma 2$ -Adaptin-spezifischen Antikörper $\alpha \gamma 2$ -Ag (8330) oder mit einem $\gamma 1$ -Adaptin-spezifischen Antikörper ($\alpha \gamma 1$ -Ag).

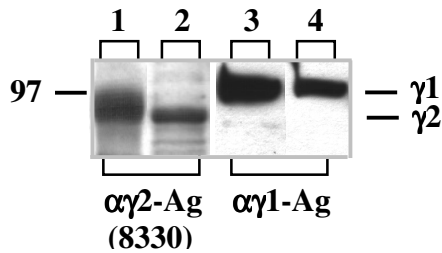


Abb. 16: Unterscheidung zwischen γ2- und γ1-Adaptin. HepG2-Zellen wurden wie folgt transfiziert: (1) HA-γ2; (3) HA-γ1; (2+4) pcDNA3.1. Die Detektion erfolgte im Western-Blot entweder mit dem γ2-Adaptin-spezifischen αγ2-Ag (8330) oder mit dem γ1-Adaptin-spezifischem αγ1-Ag. Das Molekulargewicht des mitgeführten Marker-proteins ist links in kDa notiert.

Die beiden Proteine γ2- (≈90 kDa) und γ1-Adaptin (≈100 kDa) konnten im Western-Blot aufgrund ihres Molekulargewichtes deutlich voneinander unterschieden werden. Da alle Zelllysate sowohl das endogene γ1- als auch das endogene γ2-Adaptin enthielten, waren diese Proteine in allen Lysaten, auch in den pcDNA3.1-kontrolltransfizierten Lysaten, nachweisbar (Abb. 16 Spuren 2+4). Nach ektopischer Expression der Proteine γ2- und γ1-Adaptin (Spuren 1+3), konnte allerdings wesentlich mehr vom jeweiligen Protein im Western-Blot dargestellt werden, weshalb die Bande stärker erscheint. Entscheidend war jedoch der Befund, dass sich das γ2-Adaptin mit Hilfe des γ2-spezifischen Antikörpers αγ2-Ag (8330) spezifisch nachweisen ließ, und es zu keinerlei Kreuzreaktion mit dem γ1-Adaptin kam. Damit konnte der αγ2-Ag (8330) für alle Versuchsansätze eingesetzt werden.

2. Sequenzierung des Vektors pcDNA3-HA.γ2

Für die spätere Herstellung verschiedener γ2-Adaptin-Deltionsmutanten musste der Ursprungsvektor pcDNA3-HA.γ2 sequenziert werden, da die Übergänge des Vektors zur γ2-Adaptin-Sequenz in der Literatur (Takatsu *et al.*, 1998) nicht klar beschrieben waren. Die Abb. 17 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung.

```

5' pcDNA3 . . . GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTAC
TGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTACCATGTACCCGTACG
ACGTGCCCCGACTACGCGGGATCCACCATGTGGTGCCTTCGCTGAAGCTTCAGGACCTCATC
GAAGAGATTGCGGGGCCAAGACTCAGGCCAGGAGCGGGAGGTGATCCAAAGGAGTGTGC
CCAC . . . γ2 . . . GCCCCCTGCGGCTAAAGCTGCGCCTCACCTACGACCACCTTTCACCAGT C
GGTGCAGGAGATCTTTGAGGTGAACAACTTGCTGTGGAATCGTGGCAGTAACTGTCTCCAC
TCACAGCCTGAAATTCTCCTGTGTCCCAAACCCAGGGGGCCCTATTCTATAGTGTACACCTA
AATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA . . . pcDNA3-3'
    
```

Abb. 17: Sequenzierung des Vektors pcDNA3-HA.γ2.

Die kodierenden Proteinbereiche sind durch verschiedene Farben voneinander abgesetzt. Das N-terminale HA-Epitop ist in grau und das γ2-Adaptin-Gen in blau dargestellt. Die rot unterlegten Bereiche verdeutlichen die Start- und Stoppkodons. Unterstrichene Bereiche zeigen die Primer-Positionen für die durchgeführte Sequenzierung an, während die Pfeilspitzen die Richtung der Amplifikation angeben.

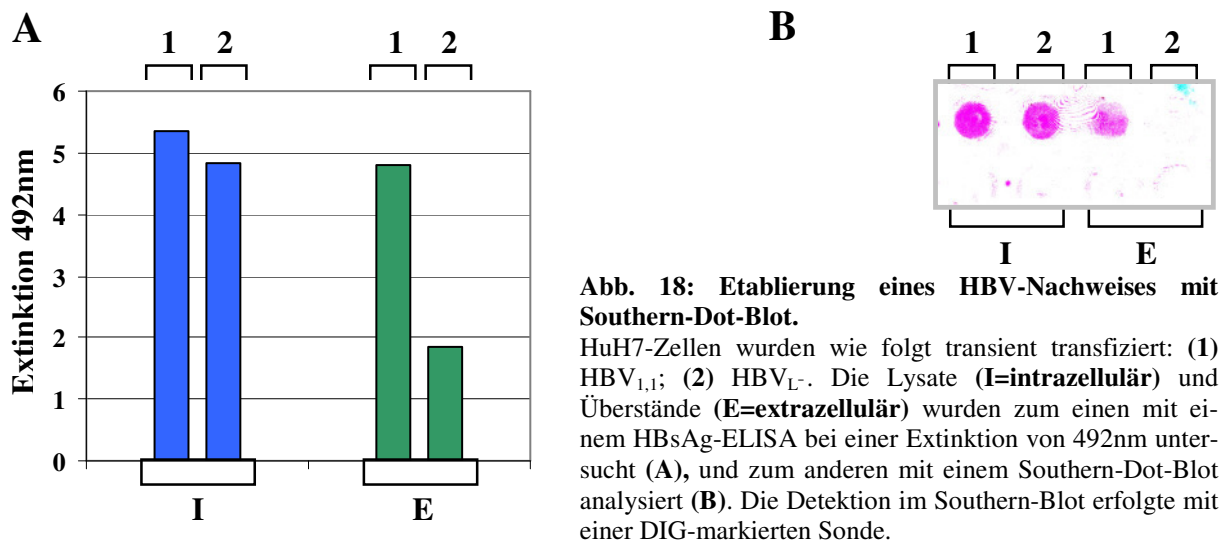
3. Etablierung eines HBV-Nachweises mit Southern-Dot-Blot

Da zum Zeitpunkt der praktischen Laborarbeit dieser Dissertation kein Zellkultursystem zur Verfügung stand, welches im Labor mit HBV infiziert werden konnte, musste auf die bereits gut charakterisierte Methode der *in vitro*-Infektion von humanen Leberzellen (Hirschman und Garfinkel, 1980) zurückgegriffen werden. Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem 1,1-fachen HBV-Vektor transfiziert, welche dann durch *in vitro*-Replikation in der Lage sind Viren zu generieren, die in Zelllysaten und in Überständen (Virionen) nachgewiesen werden konnten. Das 1,1-fach klonierte HBV-Genom beginnt mit der präCore-Sequenz, welche als Wiederholungssequenz bis über das Polyadenylierungssignal im Core-Bereich hinaus (vgl. Abb. 2) noch einmal vorkommt. Dieses PolyA-Signal wird von allen HBV-Genen genutzt und ist für die Stabilität der transkribierten mRNAs wichtig.

Hinweise über die Viruslast in Lysaten und Überständen kann man auch durch den Einsatz des HBsAg-ELISAs gewinnen. Jedoch detektiert der gekoppelte Fangantikörper (HBsAg) dieses ELISAs nicht nur Viren, sondern auch subvirale, nicht-infektiöse Partikel, die hauptsächlich aus viralen Hüllproteinen und Lipid bestehen, aber kein virales Genom besitzen. Die Etablierung einer spezifischeren Nachweismethode für virale DNA, und somit Virionen wurde notwendig.

Um einen sensitiven Virusnachweis zu etablieren, wurde die Methode des Southern-Dot-Blots gewählt. Zuerst musste eine DIG-markierte Sonde, die das Virus-Genom erkennt, zunächst auf Sensitivität getestet werden (Ergebnisse sind nicht dargestellt). Im Anschluss wurde untersucht, ob diese Sonde in der Lage ist, nach Transfektion der Zellen, Zelllyse, Immunpräzipitation, Extraktion der viralen DNA, Dot-Blot-Verfahren und nach abschließender Southern-Blot-Analyse die virale DNA auf der Membran zu detektieren.

Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem pHBV_{1,1}-Vektor transfiziert. Eine Negativkontrolle erfolgte durch eine Transfektion mit dem L-defizienten pHBV_{L-}. Um die Expression des HBV-Hüllproteins (L) im offenen Leserahmen (ORF) zu unterbinden, wurde in diesem Vektor das erste Startkodon mutiert. Da das HBV-L-Hüllprotein mit seiner i-Form für die Umhüllung der Nukleokapside eine essentielle Rolle spielt, können L-defekte Konstrukte keine Viren bilden. Eine Folge davon ist, dass im Überstand von Zellen, die mit diesem Vektor transfiziert wurden, keine Virionen vorliegen und somit auch keine virale DNA, die man mit dem Southern-Dot-Blot erkennen könnte. Die Zelllysate und Überstände wurden mit einem HBsAg-ELISA und einem Southern-Dot-Blot (Abb. 18A+B) analysiert.



Der Nachweis der viralen DNA mit einem Southern-Dot-Blot konnte erfolgreich etabliert werden. Es wurde nach Transfektion mit den Vektoren pHBV_{1,1} und pHBV_{L-} in beiden Lysaten im ELISA in etwa dieselbe Menge HBsAg (Viren und subvirale Partikel) und im Southern-Dot-Blot eine vergleichbare Menge virale DNA gefunden (Abb. 18 I=intrazellulär). Ein Vergleich der Überstände zwischen pHBV_{1,1}- und pHBV_{L-}-transfizierten Zellen dagegen brachte unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 18 E=extrazellulär). Da mit dem HBsAg-ELISA nicht nur Viren, sondern ebenso subvirale Partikel detektiert werden, zeigte der Überstand der L-defizienten Transfektion (pHBV_{L-}) noch ein schwaches Signal, welches durch die Freisetzung subviraler Partikel entstanden sein muss. Dem gegenüber steht die spezifische Erkennung viraler DNA durch den Southern-Dot-Blot. Nach Transfektion mit pHBV_{L-} konnte im Überstand keine virale DNA nachgewiesen werden. Zusammengefasst dargestellt konnte eine spezifische Nachweismethode für virale DNA etabliert werden, die in den folgenden Versuchen ihre Anwendung findet.

4. Etablierung der RNAi-Technik

Die molekularbiologische Forschung setzt synthetisch-hergestellte siRNAs (small interfering RNAs) ein, um durch RNA Interferenz (RNAi) die Expression von spezifischen Zielgenen zu kontrollieren. Die siRNAs werden in Zellen eingebracht, und die mRNA des Zielgens wird abgebaut. Die resultierende Verringerung der Genprodukte, das sogenannte „Gene-Silencing“, ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Gens zu erhalten. 2001 wurde diese Technik vom Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen erstmals publiziert (Elbashir *et al.*, 2001).

Für die vorliegende Arbeit habe ich die Methode der RNA Interferenz angewandt, um durch ein Silencing des zellulären γ 2-Adaptin-Gens Rückschlüsse auf dessen funktionelle Bedeutung für die Morphogenese des Hepatitis-B-Virus zu ziehen.

Zur Herstellung funktioneller siRNAs können unterschiedliche Techniken verwendet werden:

1. Von einer doppelsträngigen, linearen DNA-Matritze, die eine Promotorsequenz als Transkriptionsstart enthält, welche von einer RNA-Polymerase (z.B. T7-, T3- oder SP6-Promotorsequenz) erkannt wird, können kurze siRNAs (21-25 Nukleotide) *in vitro* transkribiert werden. Nach Aufreinigung und Hybridisierung der RNAs zur doppelsträngigen siRNA kann diese dann durch Transfektion in die gewünschten Zielzellen transfiziert werden.

Vorteil: geringe Kosten

Nachteile: aufwendiger Herstellungs- und Aufreinigungsprozess der siRNAs mit einhergehenden Mengenverlusten; Arbeiten mit instabiler RNA

2. In verschiedene DNA-Vektoren (z.B. pSuper oder pSilencer), die bereits eine integrierte Promotorsequenz für RNA-Polymerasen enthalten, können gezielt ausgewählte doppelsträngige DNA-Sequenzen (Primer) so eingebaut werden, dass es nach Transfektion des klonierten Vektors in die gewünschten Zielzellen zu einer *in vivo*-Synthese sogenannter shRNAs (short hairpin-RNAs) kommt (vgl. Einleitung 3.2).

Vorteile: geringe Kosten; kein Arbeiten mit instabiler RNA

Nachteil: Hairpinloop-siRNAs erfüllen nicht die idealen Voraussetzungen für ein effektives „Gene-Silencing“

3. Kauf synthetisch-hergestellter RNA-Sequenzen, die direkt nach einem Annealing-Schritt in Form doppelsträngiger siRNAs zur Transfektion eingesetzt werden können.

Vorteil: große Mengen HPLC-gereinigter siRNA

Nachteile: hohe Kosten; Arbeiten mit instabiler RNA

4.1 Vektor-basierte RNAi (pSuper)

Das in dieser Arbeit zuerst verwendete RNAi-System basierte auf der Technik der *in vivo*-Transkription von siRNAs mit Hilfe des pSuper-Vektors (**S**uppression of **e**ndogenous **R**NA) und erlaubte eine stabile Expression von siRNAs in den gewünschten Zellen.

4.1.1 Kontrollen der Vektor-basierten RNAi

Zur Etablierung dieser Methode war es zweckmäßig, sie zuerst an einem leicht zu beobachtenden Protein auszutesten. Die Wahl fiel dabei auf das grün-fluoreszierende Aequorea victoria Protein (GFP), mit dem nicht nur die Transfektionseffizienz, sondern auch der anschließende Silencing-Effekt leicht durch seine autofluoreszierenden Eigenschaften oder über einen GFP-spezifischen Antikörper im Western-Blot kontrolliert werden konnte. Das GFP wurde mit Hilfe des pSuper-GFP-Silencing-Vektors ausgeschaltet. Dieser Vektor wurde im „Department of Genetics and Microbiology“ der „University Medical Centre“ in Genf (Schweiz) entwickelt und uns netterweise zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt wurde hergestellt, indem eine ausgewählte doppelsträngige DNA-Sequenz des GFP-Proteins (GAACGGCATCAAGGTGAAC) in die „multiple cloning site“ über die Schnittstellen (928 Bp, 934 Bp) für die Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Hind*III kloniert wurde.

Zur Untersuchung des Silencing-Effektes des pSuper-GFP-Silencing-Vektors wurden HuH7-Zellen mit dem leeren GFP-Vektor (pEGFP-C1), seiner verstärkten gelb-grünen- (pEYFP-C1) oder seiner verstärkten cyano-Variante (pECFP-C1) und dem pSuper-GFP-Silencing-Vektor (ko)transfiziert. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert und die Proteine mit einem GFP-spezifischen Western-Blot analysiert (Abb. 19A). Alle fluoreszierenden Proteine wurden gemäß ihres Molekulargewichtes (GFP und CFP mit 29 kDa; YFP mit 26 kDa) exprimiert. Nach 72 Stunden konnte ein Silencing durch den pSuper-GFP-Silencing-Vektor in der Expression der fluoreszierenden Proteine GFP und YFP von bis zu 95% erreicht werden (Abb. 19A, Spuren 2+4). Dagegen war so gut wie kein Effekt hinsichtlich einer Reduktion der CFP-Expression zu verzeichnen (Spur 6). Dies könnte darin Erklärung finden, dass die *in vivo* synthetisierte GFP-siRNA nicht zu 100% zur mRNA des CFPs passt, da sich diese in zwei Nukleotiden von der des GFPs unterscheidet, was einen Aminosäureaustausch zur Folge hat (GTG (Val) → GCC (Ala)). Die Autofluoreszenzanalyse *in vivo* zeigte, dass bereits 48 Stunden nach Kotransfektion der HuH7-Zellen mit dem GFP-Vektor und dem pSuper-GFP-Silencing-Vektor eine Reduktion der GFP-Proteinexpression um 70% verzeichnet werden konnte (Abb. 19B).

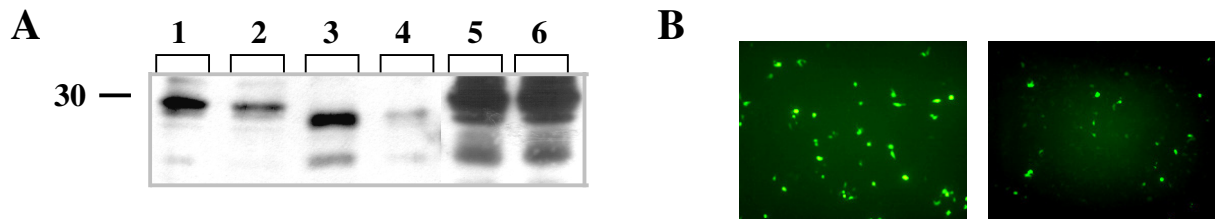


Abb. 19: Kontrollen der Vektor-basierten RNAi.

(A) HuH7-Zellen wurden wie folgt transfiziert: (1) pEGFP-C1; (2) pEGFP-C1 + pSuper-GFP-Silencing; (3) pEYFP-C1; (4) pEYFP-C1 + pSuper-GFP-Silencing; (5) pECFP-C1; (6) pECFP-C1 + pSuper-GFP-Silencing. Es folgte eine GFP-spezifische Western-Blot-Analyse. Das Molekulargewichte des mitgeführten Markerproteins ist links in kDa notiert.

(B) Autofluoreszenzanalyse von transfizierten HuH7-Zellen: (1) pEGFP-C1; (2) pEGFP-C1 + pSuper-GFP-Silencing.

4.2 RNAi mit synthetisch-hergestellten siRNAs

Die zweite Technik der RNAi dieser Arbeit basiert auf den Kauf synthetisch-hergestellter, HPLC-gereinigter siRNAs der Firma Quiagen, die dann unter RNAsen-freien Bedingungen in die gewünschten Zellen transfiziert wurden.

4.2.1 Kontrollen der siRNA-basierenden RNAi

Zur Sicherstellung der richtigen Anwendung der synthetisch-hergestellten siRNAs wurden zwei verschiedene Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde durch das Western-Blot-Verfahren das Silencing der Lamin-Proteine A (72 kDa) und C (64 kDa) durch eine käufliche, synthetisch-hergestellte Lamin-siRNA getestet (Abb. 20A). Als Lamine werden Typ-V-Intermediärfilamente bezeichnet. Lamine findet man im Zellkern eukaryontischer Zellen, wo sie über eine Vielzahl an membrangebundenen Proteinen mit der inneren Kernmembran verankert sind (Rober *et al.*, 1990). Dementsprechend erfolgte im Anschluss an die Zelllyse eine Zellkernpräparation der Lamin-siRNA-transfizierten HuH7-Zellen. Die Detektion im Western-Blot wurde mit einem Lamin-spezifischen Antikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine sogenannte „mock“-Transfektion mit Aqua bidest.. Zum anderen wurde die Transfektionseffizienz der siRNAs mit einer Fluorescein-markierten „non-silencing“ siRNA mikroskopisch untersucht (Abb. 20B). Dafür wurden ebenfalls HuH7-Zellen mit der „non-silencing“, Fluorescein-markierten siRNA transfiziert und nach vier Stunden durch Autofluoreszenz untersucht. Im Western-Blot zeigte sich, dass bereits 72 Stunden nach der Transfektion der Lamin-siRNA durch RNAiFectTM die Lamin-Proteine A und C im Zellkern zu 100% ausgeschaltet wurden (Abb. 20A). Zudem stellte sich die Transfektionseffizienz der „non-silencing“ siRNA mit etwa 80% als ausreichend dar (Abb. 20B).

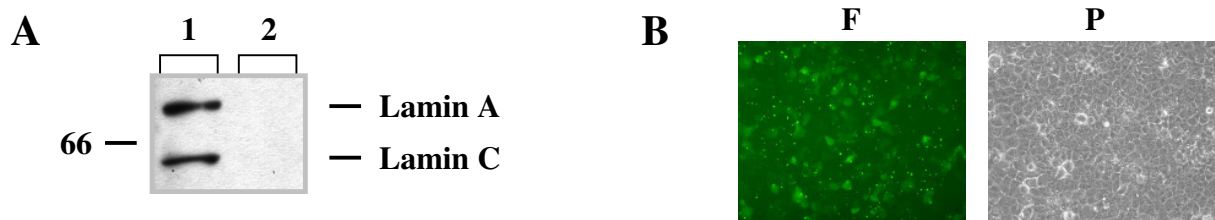


Abb. 20: Kontrollen der siRNA-basierenden RNAi.

(A) HuH7-Zellen wurden wie folgt transfiziert: (1) Aqua bidest.; (2) Lamin-siRNA. Nach Lyse der Zellen und anschließender Zellkernpräparation wurden die Zellkerne im Western-Blot mit einem Lamin-spezifischen Antikörper (α Lamin A/C-Ag) analysiert. Das Molekulargewicht des mitgeführten Markerproteins ist links in kDa notiert.

(B) HuH7-Zellen wurden mit einer Fluorescein-markierte Kontroll-siRNA („non-silencing“ siRNA) transfiziert. Die Zellen wurden vier Stunden nach Transfektion zum einen durch Autofluoreszenz (F) und zum anderen mit einer Phasenkontrastaufnahme (P) mikroskopisch analysiert.

5. Etablierung der „Live Cell Imaging“-Technik

Mit "Live Cell Imaging" lassen sich mikroskopische Zeitraffer-Aufnahmen lebender, sich bewogender Zellen anfertigen. Dafür ist jedoch eine spezielle Apparatur notwendig, die gewährleistet, dass die am Lichtmikroskop beobachteten Zellen während der gesamten Beobachtungsphase, die sich über Tage hinziehen kann, entsprechend begast und temperiert werden. Ein Computer steuert in dieser Zeit eine Digitalkamera, die dann in festgelegten Intervallen Fotos aufnimmt. So ergibt sich ein Zeitrafferfilm, in dem entweder die Zellbewegung selbst sichtbar wird, oder markierte Proteine im Verlauf ihres Transportes durch die Zelle beobachtet werden können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein solches „Live Cell

Imaging“-System aufgebaut und angewandt, um den Transport des γ 2-Adaptins durch die Zelle zu verfolgen.

6. Interaktion von $\gamma 2$ -Adaptin mit dem HBV-L-Hüllprotein

Eine Schlüsselrolle im Infektionszyklus des HBV spielt das große HBV-L-Hüllprotein, da es mit seiner ungewöhnlichen doppelten Membranstruktur vielfältige Funktionen bei der Erregervermehrung ausübt. Während seine topologische e-Isoform die Bindung an den Hepatozyten-Rezeptor und somit die Invasion der Viren vermittelt (Neurath *et al.*, 1986), ist die i-Form für die Umhüllung der HBV-Nukleokapside notwendig (Bruss und Vieluf, 1995). Darüber hinaus scheint diese Form die Persistenz und Pathogenität von HBV zu begünstigen.

Das $\gamma 2$ -Adaptin scheint intrazelluläre Sortierungs- und Transportprozesse von Membranproteinen mit Hilfe von Clathrin-umhüllter Vesikel zu vermitteln, indem es Frachtmoleküle an Spendermembranen abschnüren, verpacken und sie zu Zielmembranen mit anschließender Fusion eskortieren könnte (Meyer *et al.*, 2000).

Mit Hilfe verschiedener *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen konnte bereits eine hoch spezifische Wechselwirkung zwischen $\gamma 2$ -Adaptin und L nachgewiesen werden (Hartmann-Stühler und Prange, 2001). Noch bedeutungsvoller ist jedoch die bereits erzielte Beobachtung, dass $\gamma 2$ -Adaptin durch das L-Protein zu dem angenommen Ort des Viruszusammenbaus (Post-ER/*cis*-Golgi-Membranen) rekrutiert wird (Hartmann-Stühler und Prange, 2001), weshalb $\gamma 2$ -Adaptin einen vitalen HBV-Sprossungsfaktor darstellen könnte.

6.1 Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins

Die Verteilung des L-Proteins innerhalb der Zellen wurde zunächst durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

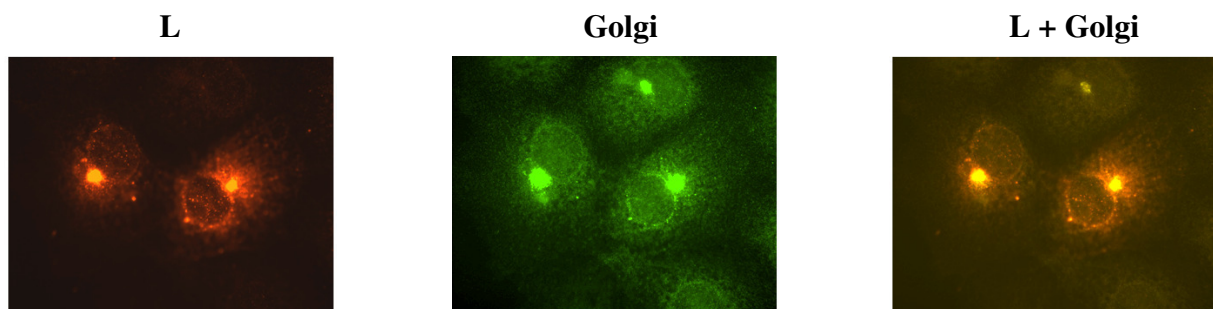


Abb. 21: Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse transfizierter COS7-Zellen. Die Zellen wurden mit einem präS1-spezifischen (K47) und einem Golgi-spezifischen ($\alpha 58K$ -Ag) Antikörper koinkubiert. Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem Cy3TM-markierten (linkes Bild) bzw. einem FITC-markierten Antikörper (mittleres Bild) detektiert. Im rechten Bild ist eine Überlagerung der Fluoreszenzen gezeigt.

COS7-Zellen wurden mit dem Vektor pNI2.L transfiziert, und das L-Protein wurde nach dreitägiger Expression mit einem präS1-spezifischen Antiserum (K47) und indirekter Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

reszenzmarkierung detektiert. Durch eine Doppelfärbung mit einem anti-58K-Antikörper, der spezifisch ein peripheres Membranprotein mit einer Größe von 58 kDa erkennt, welches an der zytoplasmatischen Seite des Golgi-Apparates lokalisiert ist, wurde die Lokalisation des L-Proteins an *cis*-Golgi-Membranen bestätigt (Abb. 21). Das L-Protein wird folglich zu Golgi-ähnlichen Strukturen transportiert.

6.2 Intrazelluläre Kolokalisation von L und $\gamma 2$ -Adaptin

Die Verteilung der Proteine L und $\gamma 2$ -Adaptin wurde ebenfalls durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Dazu wurden wiederum COS7-Zellen mit den Vektoren pNI2.L und pcDNA3-HA. $\gamma 2$ kotransfiziert. Während das L-Protein nach dreitägiger Expression wie bereits in 6.1 beschrieben durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung mit dem Antiserum K47 detektiert wurde, erfolgte der Nachweis des $\gamma 2$ -Adaptins über das N-terminale HA-Epitop mit einem α HA-Ag. Wurde $\gamma 2$ -Adaptin alleine exprimiert, so zeigte es eine rein zytosolische Verteilung in der Zelle (Abb. 22A). Durch Koexpression mit L konnte eine Rekrutierung des $\gamma 2$ -Adaptins durch L zu *cis*-Golgi-Membranen bestätigt werden (Abb. 22B).

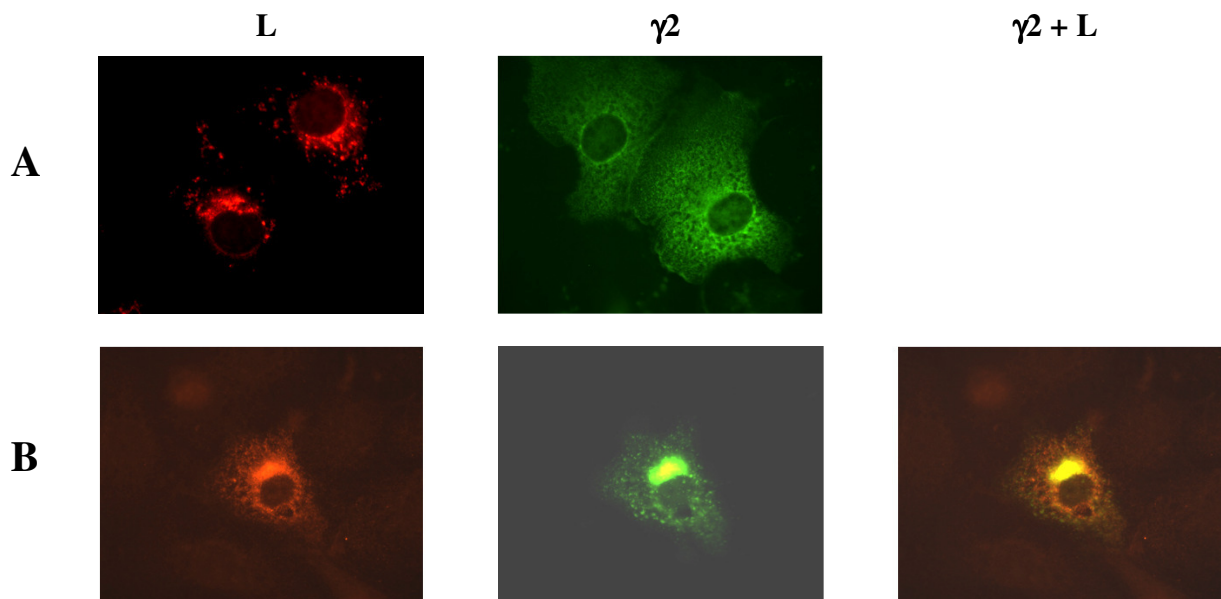


Abb. 22: Intrazelluläre Kolokalisation von L und $\gamma 2$ -Adaptin.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse transfizierter COS7-Zellen. (A) Individuelle Expression des $\gamma 2$ -Adaptins und des L-Proteins. Zur Lokalisation von L und HA- $\gamma 2$ wurden die Zellen mit einem präS1-spezifischen Antiserum (K47) beziehungsweise mit einem HA-spezifischen Antiserum inkubiert. Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem Cy3TM-markierten (linkes Bild), beziehungsweise mit einem FITC-markierten Antikörper (rechtes Bild) detektiert. (B) Koexpression des HA- $\gamma 2$ -Adaptins und des L-Proteins. Die exprimierten Proteine wurden wie in (A) beschrieben detektiert. Im rechten Bild ist eine Überlagerung der Fluoreszenzen gezeigt.

6.3 „Live Cell Imaging“ der $\gamma 2$ /L-Interaktion

6.3.1 Differentielle GFP-Markierung

Um den Rekrutierungsprozess des $\gamma 2$ -Adaptins zum *cis*-Golgi in seiner Dynamik beobachten und analysieren zu können, wurden für das „Live Cell Imaging“ autofluoreszierende Proteine konstruiert. Dazu wurde das gelb-fluoreszierende Protein (YFP) an den C-Terminus des L-Proteins fusioniert (Abb. 23). Da sich die drei viralen Hüllproteine des Virus in einem gemeinsamen, offenen Leserahmen (ENV-ORF) befinden, welcher drei unterschiedliche Startstellen für das L-, M- und S-Protein und ein gemeinsames Stoppkodon besitzt, haben alle Hüllproteine einen einheitlichen C-Terminus. Um eine resultierende Expression von YFP-markierten M- und S-Proteinen zu unterbinden, wurden die internen Startkodons für das M- und das S-Protein inaktiviert (Doppelmutante: L_{DM}). Im Gegensatz dazu wurde das $\gamma 2$ -Adaptin N-terminal mit einem blau-fluoreszierenden Protein (CFP) fusioniert (CFP- $\gamma 2$). Als Kontroll-Fusionsprotein wurde das kleine HBV-Hüllprotein (S) ebenso C-terminal mit YFP fusioniert (S-YFP). Das S-Protein eignete sich in diesem Falle gut als Negativkontrolle, da es keine Interaktion mit dem $\gamma 2$ -Adaptin zeigt (Hartmann-Stühler und Prange, 2001).

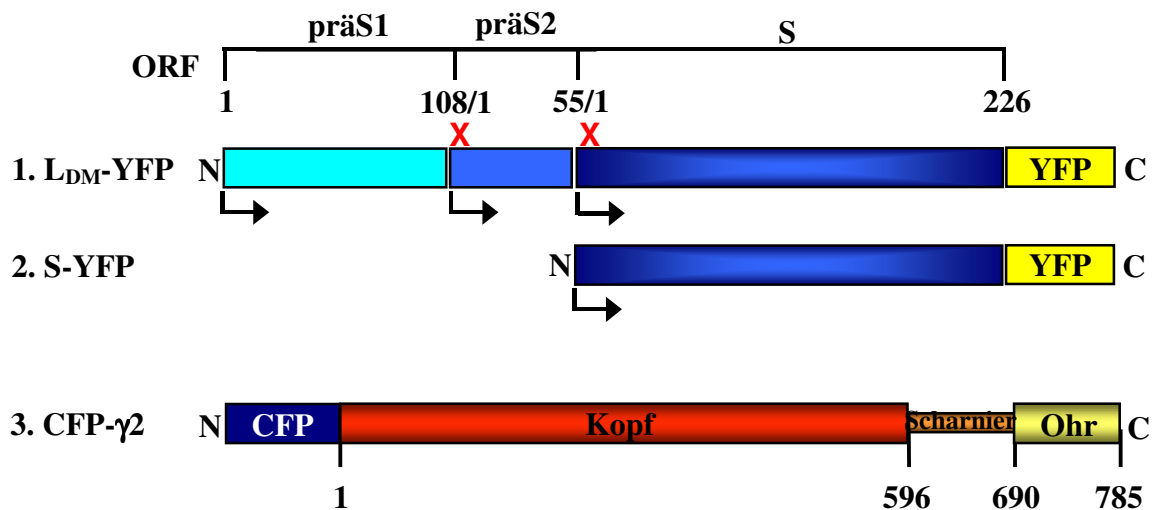


Abb. 23: Schematische Darstellung der GFP-markierten Proteine.

Die verschiedenen Proteinbereiche sind farblich unterschiedlich dargestellt:

1. und 2.: Die präS1-Region ist hellblau, die präS2-Region ist mittelblau und die S-Region ist dunkelblau dargestellt. Beide Proteine besitzen ein C-terminales YFP-Protein (gelb). Die Pfeile markieren Translationsstartstellen der drei Hüllproteine (L, M und S); ein rotes X zeigt eine Mutation der Startstelle an. Die Zahlen oberhalb des Schemas geben die Aminosäureposition der entsprechenden Proteinbereiche an. Dabei wird jedes der drei Hüllproteine mit "1" beginnend nummeriert.

3.: Die Kopf-Region ist rot, der Scharnier-Bereich ist orange und die Ohr-Domäne ist gelb dargestellt. Das CF-Protein ist N-terminal an das $\gamma 2$ -Adaptin fusioniert. Die Zahlen unterhalb der Schemata geben die Aminosäureposition der entsprechenden Bereiche an.

6.3.2 Charakterisierung der GFP-Konstrukte

Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen können nachteilig wirken. Durch die Vergrößerung der Proteine um den 26 kDa- (YFP) oder 29 kDa- (CFP) großen GFP-Tag kann es zu Beeinträchtigungen in ihrem nativen Verhalten kommen. Dies galt es zuerst durch Charakterisierung der Fusionsproteine durch Autofluoreszenz und Koimmunpräzipitation auszuschließen.

6.3.2.1 Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Autofluoreszenz

Die Funktionalität der Fusionsproteine wurde zuerst durch eine Autofluoreszenzanalyse untersucht. Dazu wurden COS7-Zellen mit den GFP-Konstrukten entweder individuell transfiziert (CFP- γ 2, S-YFP und L_{DM}-YFP) oder kotransfiziert (CFP- γ 2 mit L_{DM}-YFP und CFP- γ 2 mit S-YFP) und die fluoreszierenden Proteine wurden nach dreitägiger Expression mikroskopisch untersucht.

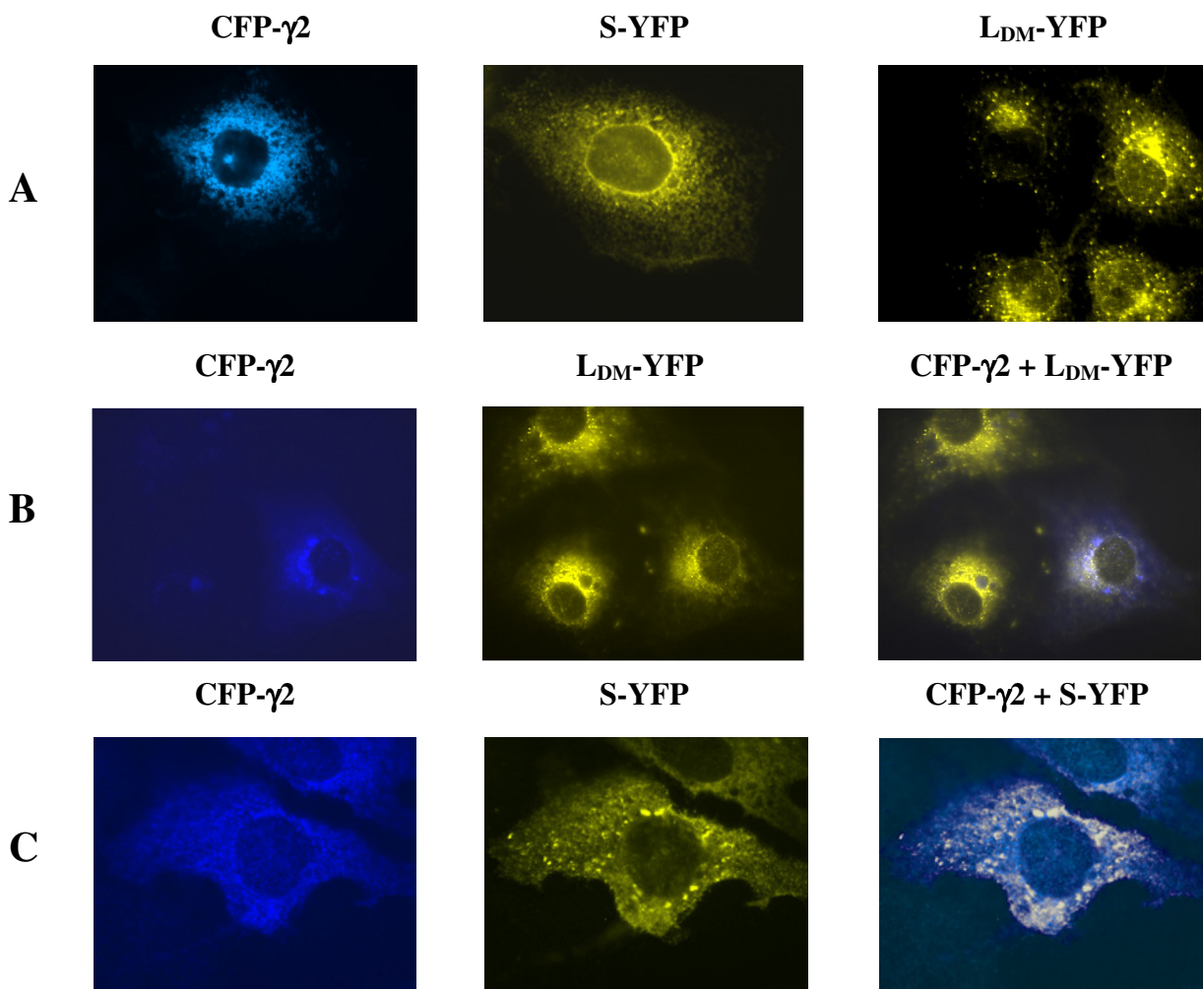


Abb. 24: Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Autofluoreszenz.

Direkte Autofluoreszenzanalyse transfizierter COS7-Zellen. (A) Individuelle Expression der Proteine CFP- γ 2 (linkes Bild), L_{DM}-YFP (mittleres Bild) und S-YFP (rechtes Bild). (B) Koexpression der Proteine CFP- γ 2 (linkes Bild) und L_{DM}-YFP (mittleres Bild). (C) Koexpression der Proteine CFP- γ 2 (linkes Bild) und S-YFP (mittleres Bild). In den rechten Bildern von (B) und (C) ist eine Überlagerung der Autofluoreszenzen gezeigt.

Wie erhofft, verhielten sich alle exprimierten GFP-Konstrukte korrespondierend zu ihrem jeweiligen Wildtypprotein. Das CFP- $\gamma 2$ wurde im Zytosol und das S-YFP im ER lokalisiert, wohingegen sich das L_{DM}-YFP an *cis*-Golgi-Membranen befand (Abb. 24A). Nach Koexpression von CFP- $\gamma 2$ und L_{DM}-YFP wurde das blau-fluoreszierende $\gamma 2$ -Adaptin zu *cis*-Golgi-Membranen rekrutiert (Abb. 24B), während das gelb-fluoreszierende S-YFP-Konstrukt wie erwartet dieses Verhalten nicht zeigte und weiterhin im ER blieb (Abb. 24C).

6.3.2.2 Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Koimmunpräzipitation

Mit einer Koimmunpräzipitation können Proteininteraktionen nachgewiesen werden. Um mögliche Defekte in der Bindung zwischen den Fusionsproteinen und ihren Interaktionspartnern festzustellen, wurden Koimmunpräzipitationsanalysen durchgeführt, indem COS7-Zellen mit dem jeweiligen Fusionsprotein und seinem zu untersuchenden Partner kotransfiziert (CFP- $\gamma 2$ + LHA; S-YFP + HA- $\gamma 2$ und L_{DM}-YFP + HA- $\gamma 2$) und nach dreitägiger Expression lysiert wurden. Das Zelllysate wurde anschließend mit spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen das S-Protein (K37) und gegen die präS1-Region des L-Proteins (K47) inkubiert, die zuvor an Protein-G-Sepharose kovalent gebunden wurden. Durch mehrere Waschschritte wurden die gebundenen Proteine vom übrigen Lysat abgetrennt und abschließend mittels einer Gelelektrophorese und eines Western-Blot-Transfer analysiert. Der Proteinnachweis der HA-markierten (LHA und HA- $\gamma 2$) und der GFP-fusionierten Proteine (CFP- $\gamma 2$, L_{DM}-YFP und S-YFP) erfolgte mit einem α HA-Ag beziehungsweise mit einem α GFP-Ag. Als Kontrolle wurde zu den Kotransfektionen eine entsprechende individuelle Transfektion der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte durchgeführt (CFP- $\gamma 2$ oder HA- $\gamma 2$), um unspezifische Bindungen des $\gamma 2$ -Adaptins an die Sepharose ausschließen zu können.

Die Untersuchung der Zelllysate zeigte zunächst, dass alle Fusionsproteine entsprechend ihres errechneten Molekulargewichtes exprimiert wurden (CFP- $\gamma 2$: 113 kDa; S-YFP: 52/55 kDa; L_{DM}-YFP: 67/70 kDa). Entscheidend war jedoch die Analyse der Immunpräzipitate (IP). Diese wies nach, dass sowohl bei der Präzipitation des LHA-Proteins als auch des L_{DM}-YFP-Fusionsproteins eine Kopräzipitation des CFP- $\gamma 2$ -Adaptins (Abb. 25, Spur 1) bzw. des $\gamma 2$ -Adaptins (Spur 5) erfolgte. Hingegen kam es, wie erwartet, zu keiner Immunpräzipitation des $\gamma 2$ -Adaptins durch das Fusionsprotein S-YFP (Spur 3). Eine unspezifische Bindung des $\gamma 2$ -Adaptins beziehungsweise des CFP- $\gamma 2$ -Adaptins an die Protein-G-Sepharose konnte anhand der mitgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden (Spuren 2, 4 und 6).

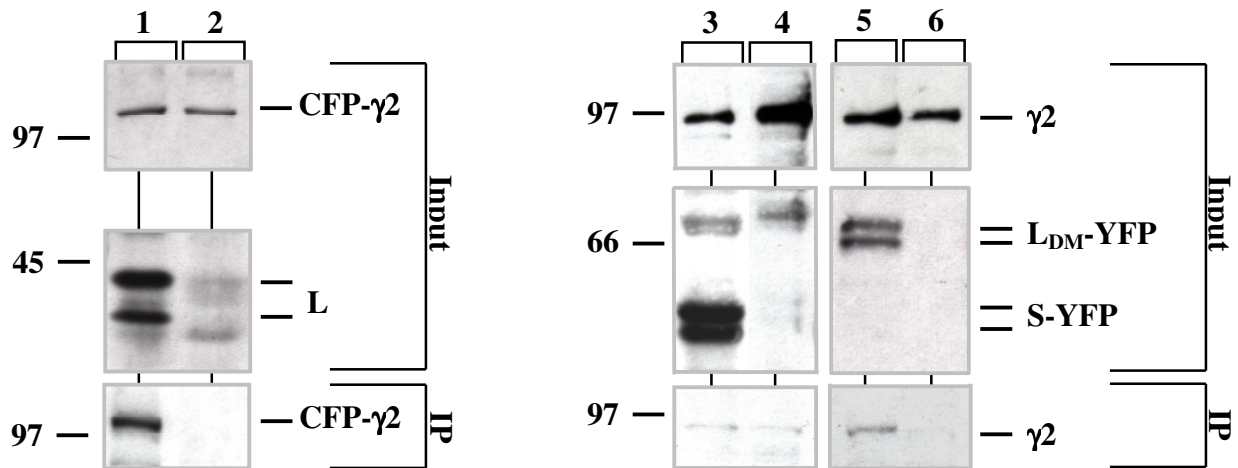


Abb. 25: Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Koimmunpräzipitation.

COS7-Zellen wurden wie folgt transfiziert und lysiert: (1) CFP- γ 2 + LHA; (2) CFP- γ 2; (3) HA- γ 2 + S-YFP; (4) HA- γ 2; (5) HA- γ 2 + L_{DM}-YFP; (6) HA- γ 2. Das Lysat wurde entweder direkt durch SDS-PAGE aufgetrennt (**Input**) oder zuerst immunpräzipitiert und dann in einem SDS-Gel analysiert (**IP**). Nach Western-Transfer wurden die Proteine mit einem HA-spezifischen, beziehungsweise mit einem GFP-spezifischen Antikörper detektiert. Die Molekulargewichte mitgeführter Markerproteine sind links in kDa notiert.

Zusammenfassend zeigt dies, dass weder L noch γ 2-Adaptin durch die jeweilige Fusion mit dem fluoreszierenden Marker (CFP oder YFP) in ihrer Funktionalität beeinträchtigt wurden. Diese Fusionsproteine konnten folglich im weiteren Verlauf zur Untersuchung der L-vermittelten Rekrutierung des γ 2-Adaptins zu *cis*-Golgi-Membranen eingesetzt werden.

6.3.3 Rekrutierung von CFP- γ 2 durch L-YFP in COS7-Zellen

Um das Rekrutierungsgeschehen in lebenden Zellen und in Echtzeit zu untersuchen, wurden COS7-Zellen mit den Vektoren CFP- γ 2 und L_{DM}-YFP kotransfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen am Mikroskop in 6cm Gewebekulturschalen unter einem speziellen Inkubator kultiviert, der für eine gleichmäßige Temperierung von 37°C und für eine 5%-ige CO₂-Zufuhr sorgte. Es wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen über Nacht im Abstand von zehn Minuten gemacht. Für diese Beobachtung der Fusionsproteine musste eine gewisse Stabilität der CFP- bzw. der YFP-Fluoreszenz gewährleistet sein, die leider nicht vorhanden war. Bereits nach kurzer Zeit verringerte sich die Autofluoreszenz derart, dass keine weiteren Aufnahmen mehr möglich waren. Zudem wurde die Untersuchung dadurch erschwert, dass kotransfizierte Zellen eher selten zu finden waren.

6.3.4 Rekrutierung von CFP- $\gamma 2$ in EcR-LHA-293-Zellen

Eine Abhilfe der Probleme hinsichtlich der Stabilität der Autofluoreszenz und der Kotretransfektionsrate der Fusionsproteine brachte der Einsatz der sehr gut charakterisierten EcR-LHA-293-Nierenzelllinie (Lambert *et al.*, 2004). Mit dieser Zelllinie ist es möglich, eine regulierte Expression des L-Proteins durch eine temporäre (vier Stunden) Induktion mit Ponasteron A zu erzielen. Bereits vier Stunden nach Induktion kann eine ausreichende und gleichmäßige L-Expression in allen Zellen nachgewiesen werden. Somit entfiel die Suche nach kotretransfizierten Zellen, so dass die Rekrutierung des individuell transfizierten CFP- $\gamma 2$ -Adaptins wenige Stunden nach L-Induktion durch seine autofluoreszierende Eigenschaft verfolgt werden konnte. Ein erster Test sollte zeigen, ob sich die Proteine L und $\gamma 2$ -Adaptin auch in der EcR-LHA-293-Zelllinie erwartungsgemäß verhalten. Dazu wurde das CFP- $\gamma 2$ nach Transfektion und das L nach Induktion zuerst einzeln exprimiert. Während CFP- $\gamma 2$ transfizierte Zellen durch Autofluoreszenz untersucht werden konnten, wurden die L-induzierten Zellen mit einem präS1-spezifischen, polyklonalen Antiserum immunologisch nachgewiesen.

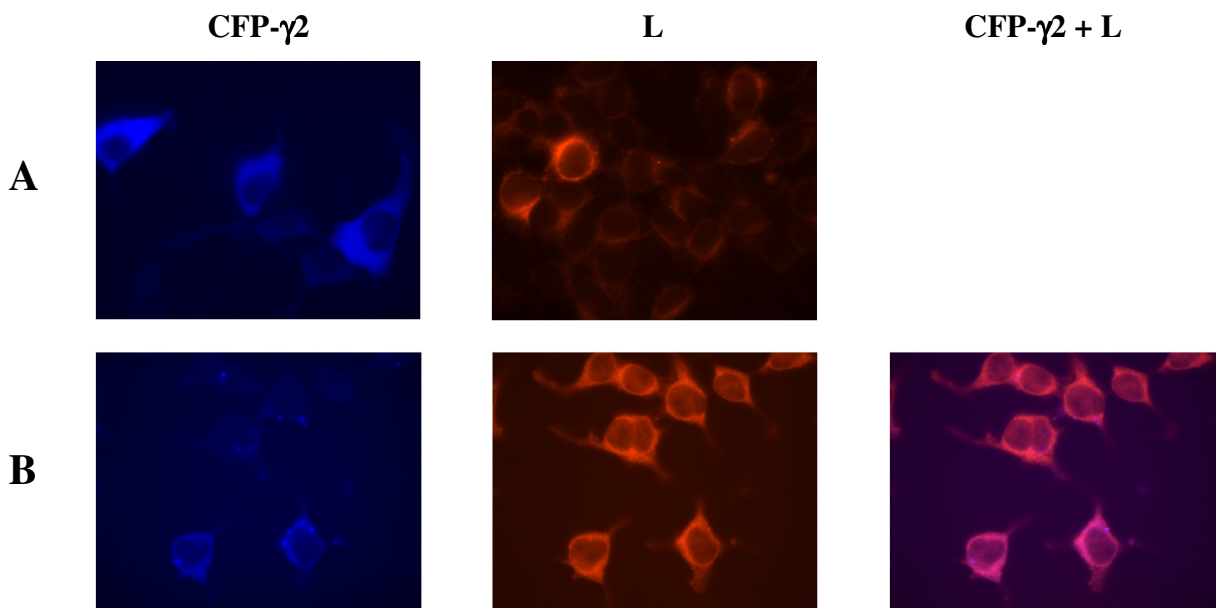


Abb. 26: Rekrutierung von CFP- $\gamma 2$ in EcR-LHA-293-Zellen.

Fluoreszenzanalyse transfizierter und/oder L-induzierter EcR-LHA-293-Zellen. (A) Individuelle Expression des CFP- $\gamma 2$ -Adaptins und des L-Proteins. Zur Lokalisation von CFP- $\gamma 2$ wurden die Zellen nach Fixierung direkt durch Autofluoreszenz untersucht (linkes Bild). Zur Lokalisation von L wurden die Zellen nach Fixierung mit einem präS1-spezifischen Antiserum (K47) inkubiert. Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem Cy3TM-markierten Antikörper detektiert (rechtes Bild). (B) Koexpression des CFP- $\gamma 2$ -Adaptins und des L-Proteins. Die Detektion beider Proteine erfolgte wie in (A) beschrieben. Im rechten Bild ist eine Überlagerung der Fluoreszenzen gezeigt.

Das individuell exprimierte CFP- $\gamma 2$ zeigte wie erwartet eine zytosolische Verteilung in allen Zellen (Abb. 26A, linkes Bild), während das individuell exprimierte L auch in den Affen-

Nierenzellen seine typische perinukleäre *cis*-Golgi-Lokalisation zeigte (Abb. 26A, rechtes Bild).

Zur Untersuchung der Kolokalisation von CFP- γ 2 und L wurden die EcR-LHA-293-Zellen zuerst mit CFP- γ 2 transfiziert und 24 Stunden später mit Ponasteron A induziert. Nach Fixierung der Zellen erfolgte eine Autofluoreszenz- und eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse (vgl. oben). Das Ergebnis zeigte, dass das CFP- γ 2 bei Koexpression mit L seine zytosolische Verteilung aufgibt und eher eine perinukleäre L-typische Lokalisation annimmt (Abb. 26B). Da es auch in EcR-LHA-293-Zellen zu einer Rekrutierung des CFP- γ 2-Adaptins durch L zu *cis*-Golgi-Membranen kommt, konnten diese für alle folgenden Untersuchungen eingesetzt werden.

6.3.5 „Live Cell Imaging“ der Rekrutierung von CFP- γ 2 in EcR-LHA-293-Zellen

Zur Beobachtung der Rekrutierung von CFP- γ 2 in lebenden Zellen (*in vivo*) musste von der Fixierung der Zellen und damit von einem Nachweis des L-Proteins durch Immunfluoreszenzanalyse abgesehen werden. Doch durch die stabile Expression von L (Abb. 26A) in allen mit Ponasteron A induzierten Zellen konnte dieser Nachweis vernachlässigt werden. Für den Versuch wurden CFP- γ 2 transfizierte EcR-LHA-293-Zellen 24 Stunden nach Transfektion induziert. Nach weiteren vier Stunden konnten Autofluoreszenzaufnahmen im Abstand von fünf Minuten gemacht werden.

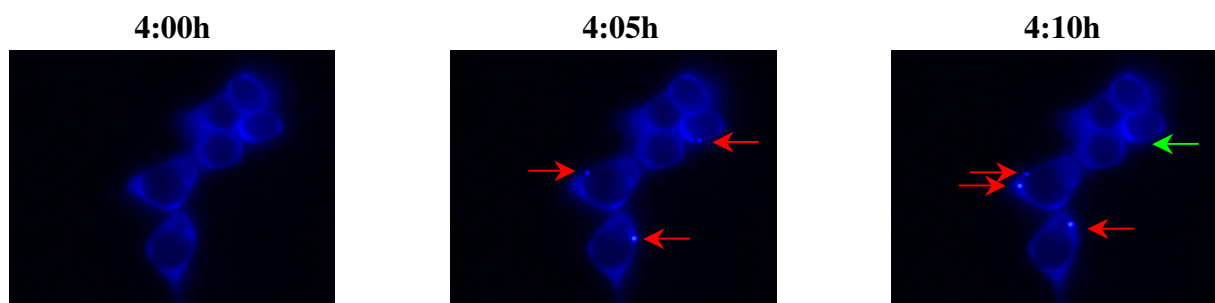


Abb. 27: „Live Cell Imaging“ der Rekrutierung von CFP- γ 2 in EcR-LHA-293-Zellen.

Zur *in vivo*-Beobachtung von CFP- γ 2 wurden die Zellen nach Transfektion von CFP- γ 2 und Induktion von L in einem Inkubator direkt durch Autofluoreszenz untersucht (linkes Bild). Die roten Pfeile verfolgen die Wanderung der CFP- γ 2-Transportvesikel entlang des Zellkerns in Richtung der *cis*-Golgi-Membran. Der grüne Pfeil weist auf ein bereits aufgelöstes Transportvesikel hin. Es wurden Aufnahmen im Abstand von fünf Minuten gemacht.

In Abbildung 27 kann die Rekrutierung des CFP- γ 2-Adaptins durch L sehr gut beobachtet werden (siehe rote Pfeile). Es wandern kleine punktförmige Strukturen, sogenannte

Transportvesikel, entlang des Zellkerns (perinukleär) zum Zielort der *cis*-Golgi-Membran. Dort angekommen lösen sich die Transportvesikel wieder auf (grüner Pfeil).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das $\gamma 2$ -Adaptin spezifisch mit dem HBV-L- jedoch nicht mit dem HBV-S-Protein *in vitro* und *in vivo* interagiert. Die gezeigte Interaktion führt zu einer zellulären Kolo-kalisation von L und $\gamma 2$ -Adaptin in einer punktförmigen Struktur an der *cis*-Golgi-Membran. Die Rekrutierung von $\gamma 2$ -Adaptin in dieses Kompartiment wird vermutlich durch das L-Protein initiiert. Durch eine GFP-Markierung der an der Interaktion beteiligten Proteine (L und $\gamma 2$ -Adaptin) konnte der Rekrutierungsvorgang von $\gamma 2$ -Adaptin (CFP- $\gamma 2$) in Echtzeit beobachtet werden, welcher relativ schnell und effizient durch sogenannte Transportvesikel entlang des Nukleolus zu erfolgen scheint.

7. Die Bedeutung struktureller Domänen des $\gamma 2$ -Adaptins für die Interaktion mit dem L-Hüllprotein

Das $\gamma 2$ -Adaptin ist aus drei strukturellen Domänen (Kopf, Scharnier und Ohr) aufgebaut (Takatsu *et al.*, 1998). Um die Bedeutung dieser einzelnen Domänen in Hinblick auf die Interaktion mit dem HBV-L-Hüllprotein zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten verschiedener $\gamma 2$ -Adaptin-Proteinbereiche hergestellt.

7.1 Vorstellung der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte

Zur Aufklärung der Interaktion zwischen dem L-Protein und $\gamma 2$ -Adaptin wurde untersucht, welche Domäne/n von $\gamma 2$ -Adaptin für die Interaktion mit L verantwortlich sein könnte/n. Als potentielle Domänen für eine mögliche Bindung gelten die Ohr- bzw. die Scharnierregion von $\gamma 2$ -Adaptin (Hartmann-Stühler *et al.*, 2001). Dieser Hypothese entsprechend wurde zu den bereits vorhandenen C-terminal verkürzten Mutanten $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ eine weitere Mutante konstruiert ($\gamma 2_{\Delta 1-522}$), welcher N-terminal große Bereiche der Kopfdomäne fehlen. Alle Mutanten tragen ein N-terminales HA-Epitop. In der folgenden Abbildung 28 sind alle wichtigen $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte schematisch dargestellt.

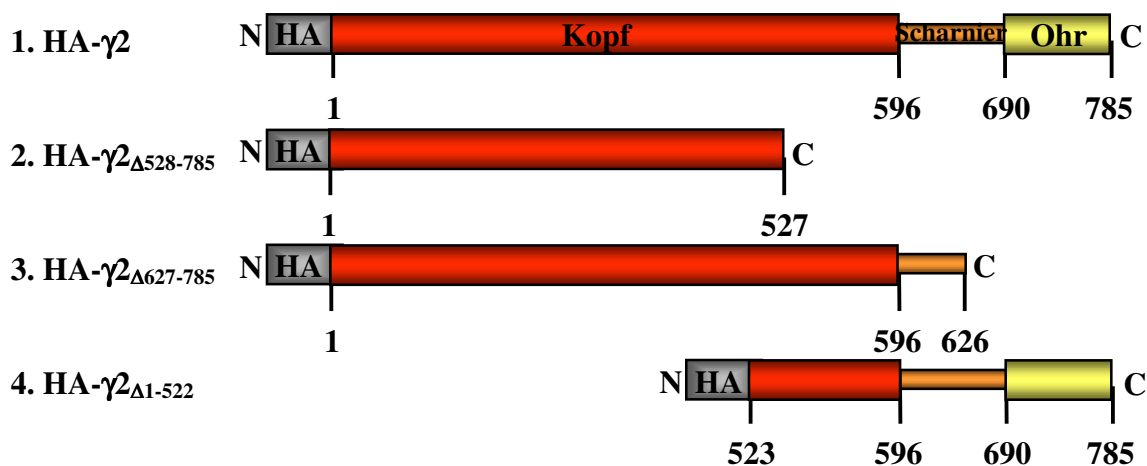


Abb. 28: Schematische Darstellung der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte.

Die verschiedenen Proteinbereiche sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die Kopf-Region ist rot, der Scharnier-Bereich ist orange und die Ohr-Domäne ist gelb dargestellt. Alle Proteine besitzen ein N-terminales HA-Epitop (hellgrau). Die Zahlen unterhalb der Schemata geben die Aminosäureposition der entsprechenden Bereiche an.

Im Folgenden wurden alle $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte durch Koimmunpräzipitation und Fluoreszenzanalysen mit dem $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypprotein verglichen. Dabei richtete sich das Augen-

merk im Besonderen auf die funktionelle Interaktion der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte mit dem L-Protein.

7.2 $\gamma 2$ /L-Interaktion ist von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig

Es wurden erneut Koimmunpräzipitationsversuche in COS7-Zellen durchgeführt. Die (Ko)Expression des $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypproteins oder der deletierten $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$, $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 1-522}$) mit dem L-Protein konnte im Western-Blot durch einen HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, da alle exprimierten Proteine ein HA-Epitop trugen. Um unspezifische Bindungen der Adaptin-Moleküle an die Sepharose auszuschließen, erfolgte eine Kontrolle mit dem jeweiligen, individuell transfizierten $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukt.

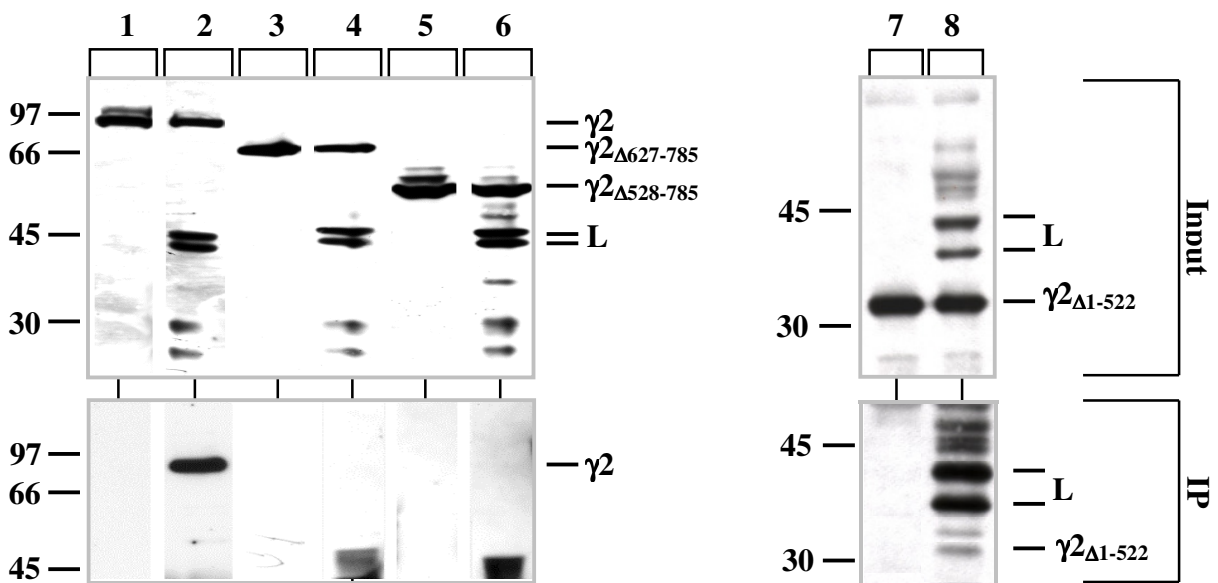


Abb. 29: $\gamma 2$ /L-Interaktion von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig.

COS7-Zellen wurden wie folgt transient transfiziert und lysiert: (1) HA- $\gamma 2$; (2) HA- $\gamma 2$ + LHA; (3) HA- $\gamma 2_{\Delta 627-785}$; (4) HA- $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ + LHA; (5) HA- $\gamma 2_{\Delta 528-785}$; (6) HA- $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ + LHA; (7) HA- $\gamma 2_{\Delta 1-522}$, (8) HA- $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ + LHA. Die Lysate wurden entweder direkt durch SDS-PAGE aufgetrennt (**Input**), oder vorher zusätzlich mit Antikörpern gegen das HBs-Protein (K37) und gegen die präS1-Region des L-Proteins (K47) immunpräzipitiert (**IP**). Alle Proteine wurden durch einen HA-spezifischen Western-Blot nachgewiesen. Die Molekulargewichte mitgeführter Markerproteine sind links in kDa notiert. Anmerkung: Die schwarzen Flecken in der 43 kDa Region in den Spuren 4 und 6 (**IP**) stammten von immunpräzipitiertem L-Protein.

Die Abbildung 29 zeigt, dass in transient transfizierten Zellen alle drei Deletionsmutanten stabil exprimiert werden konnten. Die Mutanten $\gamma 2_{\Delta 627-785}$, $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ wiesen im SDS-Gel eine elektrophoretische Beweglichkeit entsprechend ihrem errechneten MW von 68 kDa, 57 kDa beziehungsweise 32,5 kDa auf (Input). Entscheidend jedoch war die Analyse der Immunpräzipitate (IP). Diese zeigte, dass beide C-terminal verkürzten Mutanten ($\gamma 2_{\Delta 627-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 528-785}$) zu keinerlei Wechselwirkung mit dem L-Protein befähigt waren (Spuren 4+6).

Hingegen zeigte das N-terminal verkürzte Konstrukt ($\gamma 2_{\Delta 1-522}$) eine, mit dem $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypprotein verglichen (Spur 2), abgeschwächte Interaktion mit dem L-Protein (Spur 8). Eine unspezifische Bindung aller $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte an die Protein-G-Sepharose konnte anhand der mitgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden (Spuren 1, 3, 5 und 7).

7.3 Rekrutierung des $\gamma 2$ -Adaptins durch L ist von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig

Zur Untersuchung der intrazellulären (Ko) Lokalisation der $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutanten mit L wurden COS7-Zellen transient mit den $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukten HA- $\gamma 2_{\Delta 528-785}$, HA- $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ beziehungsweise HA- $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ und L (ko)transfiziert. Zur indirekten Immunfluoreszenzanalyse der Proteine wurde das L-Protein mit einem präS1-spezifischen, polyklonalen Antiserum (K47) detektiert. Durch eine Doppelfärbung mit einem anti-HA-Antikörper konnten die HA-gekoppelten $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte sichtbar gemacht werden.

Zuerst zeigte die individuelle Expression der $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutanten (Abb. 30A), dass alle Konstrukte weiterhin in der Zelle zytosolisch vorliegen. Allerdings unterschied sich das netzartige Verteilungsmuster der N-terminal verkürzten Mutante ($\gamma 2_{\Delta 1-522}$) von der homogenen zytosolischen Verteilung des $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypproteins und der Konstrukte $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$. Die Kotransfektion von L mit der jeweiligen Deletionsmutante bestätigt das Ergebnis der Koimmunpräzipitation (vgl. 7.2). Beide C-terminal verkürzten Mutanten $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ waren nicht mehr in der Lage, mit dem L-Protein zu interagieren. Dies zeigte sich in der Immunfluoreszenz dadurch, dass trotz Koexpression von L beide Konstrukte ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$) nicht mehr zu *cis*-Golgi-Strukturen rekrutiert werden konnten, sondern weiterhin eine zytosolische Verteilung zeigten (Abb. 30B und C). Demgegenüber steht die N-terminale Deletionsmutante $\gamma 2_{\Delta 1-522}$, welche bei Koexpression mit L eine perinukleäre Kolokalisation am *cis*-Golgi aufwies (Abb. 30D).

Die Ergebnisse der Untersuchung der funktionellen Interaktion zwischen dem L-Protein und den $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukten zusammenfassend interpretiert, kann man sagen, dass für die spezifische Wechselwirkung die Ohrdomäne (C-terminal) von $\gamma 2$ -Adaptin essentiell und ausreichend zu sein scheint, da mit den C-terminal verkürzten $\gamma 2$ -Adaptin-Mutanten weder *in vivo* noch *in vitro* eine Interaktion festgestellt werden konnte.

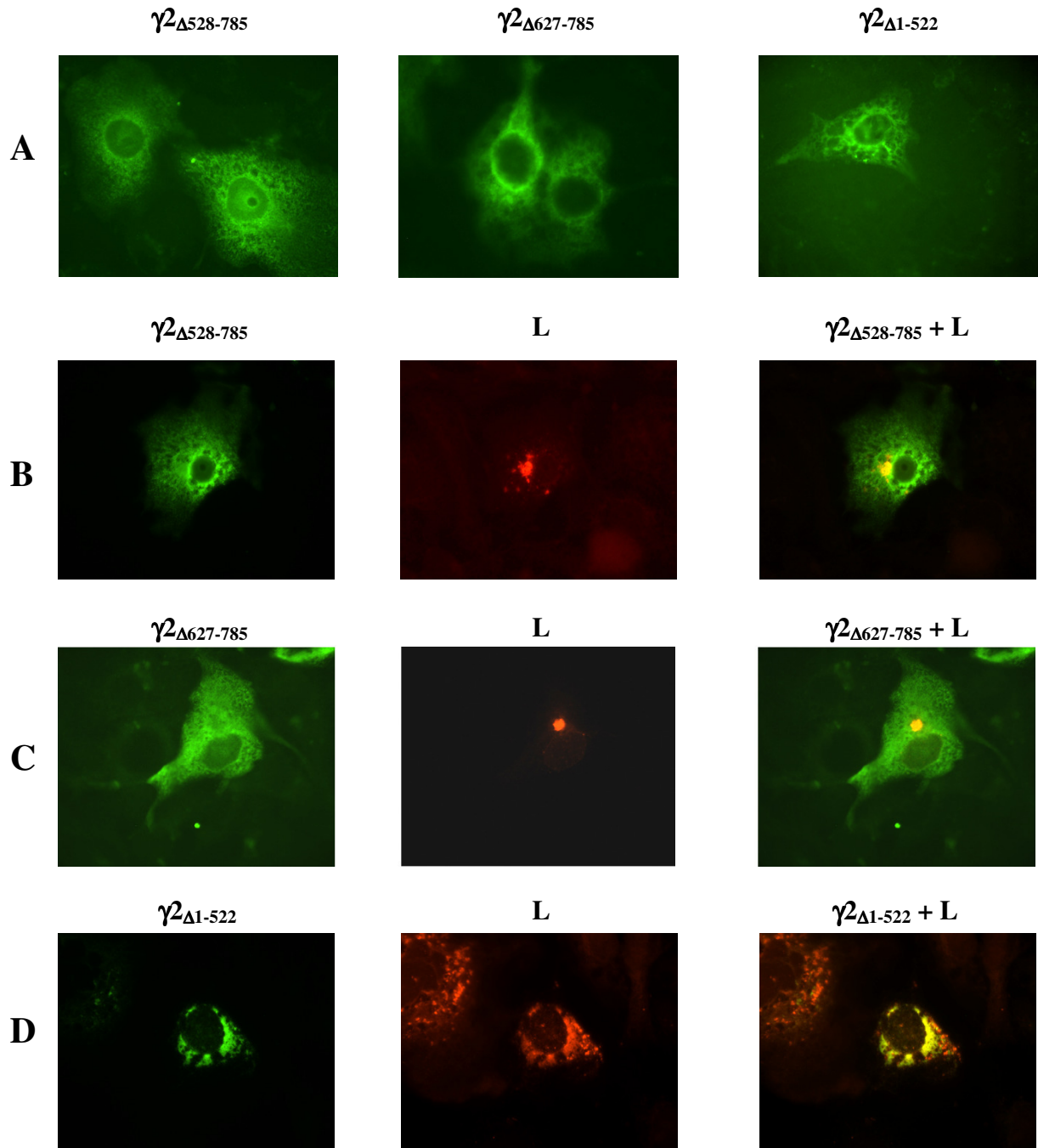


Abb. 30: Rekrutierung des $\gamma 2$ -Adaptins von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse transfizierter COS7-Zellen. (A) Individuelle Expression der $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutanten. Zur Lokalisation der Deletionsmutanten wurden die Zellen mit einem HA-spezifischen Antiserum (α HA-Ag) inkubiert. Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem FITC-markierten detektiert. (B, C und D) Koexpression der jeweiligen $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutante und des L-Proteins. Die Zellen wurden mit einem präS1-spezifischen Antiserum (K47) und einem HA-spezifischen Antikörper koinkubiert. Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem FITC-markierten (linkes Bild) bzw. mit einem Cy3TM-markierten Antikörper (mittleres Bild) detektiert. In den rechten Bildern ist eine Überlagerung der Fluoreszenzen gezeigt.

8. Interaktion von $\gamma 2$ -Adaptin mit weiteren HBV-Proteinen

Viele Membranproteine sind auf intrazelluläre Sortierungs- und Transportprozesse angewiesen, um zu ihrer Zielmembran zu gelangen. Vom ubiquitären $\gamma 2$ -Adaptin wird vermutet, dass es entscheidend an der Steuerung und/oder Vermittlung solcher Prozesse beteiligt sein könnte. Somit lag die Vermutung nahe, dass das $\gamma 2$ -Adaptin nicht nur mit dem L-Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus interagieren könnte, sondern auch mit weiteren viralen Proteinen. Diese könnten über das Adaptorprotein gemeinsam zur sogenannten HBV-Assembly-Plattform rekrutiert werden, um den letzten Schritt der HBV-Morphogenese, den Zusammenbau zu initiieren.

8.1 Mögliche Interaktion des $\gamma 2$ -Adaptins mit dem HBV-Coreprotein

Um erste Interaktionen weiterer HBV-Proteine mit dem $\gamma 2$ -Adaptin aufzudecken, wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Dabei geht man davon aus, dass die räumliche Nähe der zu untersuchenden Proteine (Kokalisation) ein erster Hinweis auf eine tatsächliche Interaktion dieser beiden Proteine sein könnte. Um die HBV-Proteine zur Expression zu bringen, wurden HuH7-Zellen entweder mit dem 1,1-fach-klonierten HBV-Genom (pHBV_{1,1}) oder mit einem L-defizienten Vektor (pHBV_{L-}) transfiziert. Durch den Vektor pHBV_{L-} konnte die Expression des HBV-L-Hüllproteins im offenen Leserahmen unterbunden, jedoch die Expression aller weiteren viralen Proteine (auch M und S) in vollem Umfang gewährleistet werden. Eine Kotransfektion erfolgte mit dem $\gamma 2$ -Adaptin-Vektor. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen fixiert und mit drei verschiedenen Antikörpern koinkubiert: einem HBs-spezifischen, polyklonalen Antiserum; einem Core-spezifischen Antikörper und einem HA-spezifischen Antikörper. Die Detektion erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung (Trippel-Färbung; Abb. 31).

In den Zellen, in denen das HBV-L-Protein exprimiert wurde (Abb. 31B), rekrutierte das koexprimierte $\gamma 2$ -Adaptin, wie bereits in 6.2 beschrieben, zur *cis*-Golgi-Membran (roter Pfeil). Diese Kokalisation konnte in den Zellen, welche mit der L-defizienten HBV-Mutante (pMHBV_{L-}) und dem $\gamma 2$ -Adaptin-Vektor kotransfiziert wurden nicht beobachtet werden (Abb. 31A), da in diesen Zellen kein L exprimiert wurde. Das blaue Fluoreszenzsignal in den L-defizienten Zellen wird vom primären HBs-spezifischen Antiserum erzeugt, das nicht nur das HBV-L-, sondern auch das M- und das S-Protein erkennt, welches in diesen Zellen noch exprimiert wird.

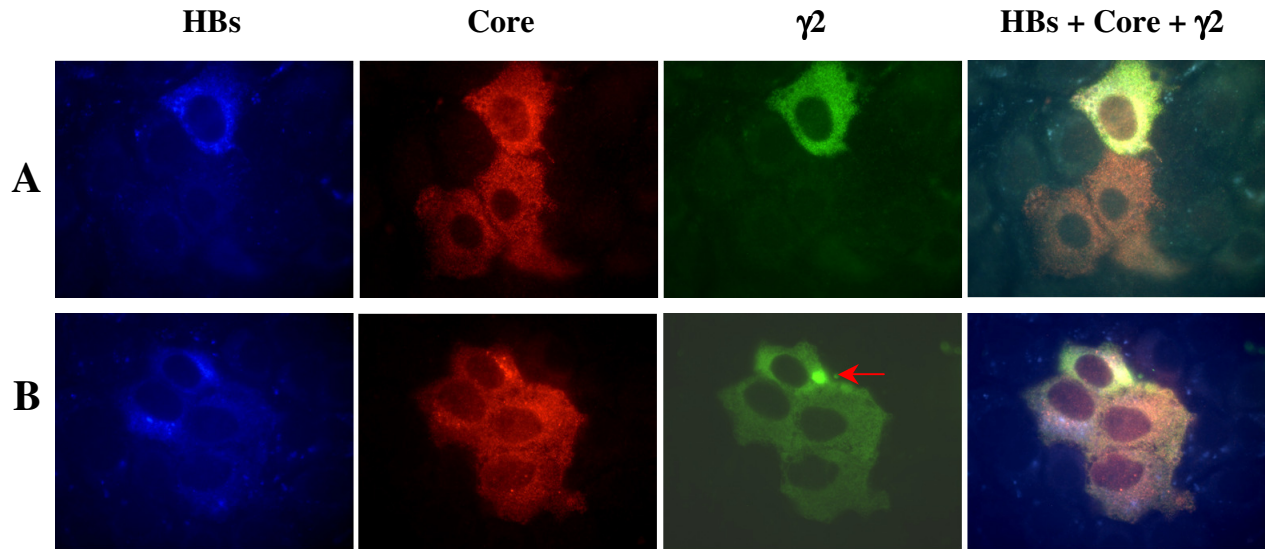


Abb. 31: Mögliche Interaktion des $\gamma 2$ -Adaptins mit dem HBV-Coreprotein.

Indirekte Immunfluoreszenzanalyse in HuH7-Zellen. Die Zellen wurden mit dem HA- $\gamma 2$ -Adaptin-Vektor transfiziert. Eine Kotretransfektion erfolgte entweder mit dem L-defizienten (A) pMHBV_L- oder mit dem (B) pMHBV_{1,1}-Vektor. Nach Fixierung der Zellen wurden diese mit einem HBs-spezifischen Antikörper (α HBs-Ag), einem Core-spezifischen Antikörper (K45) und einem HA-spezifischen Antikörper (α HA-Ag) inkubiert. Die gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mit einem α -Ziegen-Ag (Alexa Fluor 350; blau), einem α -Kaninchen-Ag (Alexa Fluor 594; rot) und einem α -Maus-Ag (Alexa Fluor 488; grün) detektiert. Im rechten Bild ist eine Überlagerung der Fluoreszenzen gezeigt. Der rote Pfeil hebt die Akkumulation des $\gamma 2$ -Adaptins an *cis*-Golgi-Strukturen in L-exprimierenden Zellen hervor.

In pHBV_{1,1} transfizierten Zellen konnte tatsächlich eine Kolo-kalisation des HBV-Coreproteins (rote Fluoreszenz) mit dem kotretransfizierten $\gamma 2$ -Adaptin festgestellt werden (Abb. 31B). Anhand der punktuellen Anhäufung des Coreproteins am Rekrutierungsort des $\gamma 2$ -Adaptins (*cis*-Golgi-Membran) könnte man vermuten, dass das HBV-Core ebenfalls dorthin rekrutiert werden könnte. Diese Vermutung gilt es jedoch noch über weitere molekularbiologische und immunologische Methoden, wie z.B. der Koimmunpräzipitation zu bestätigen. Zudem ist noch unklar, ob das Coreprotein durch eine direkte Interaktion mit dem $\gamma 2$ -Adaptin rekrutiert wird, oder ob die Rekrutierung der Cores zum Ort des Virus-Zusammenbaus von weiteren zellulären Hilfsfaktoren abhängt.

9. Silencing des $\gamma 2$ -Adaptins

Um die Frage zu klären, ob $\gamma 2$ -Adaptin ein vitaler Sprossungs- und Freisetzungsfaktor von HBV ist, das die Knospung und somit die Evasion von HBV initiiert und steuert, wurde in dieser Arbeit versucht, das $\gamma 2$ -Adaptin gezielt durch den Einsatz verschiedener siRNAs auszuschalten.

9.1 Vektor-basierte $\gamma 2$ -Adaptin-RNAi

Der durch die direkte Transfektion chemisch synthetisierter siRNA-Moleküle in Säugerzellen erzielte RNAi-Effekt ist nur transient. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die intrazelluläre Synthese siRNA-ähnlicher Transkripte, sogenannter „short hairpin RNAs“ (shRNAs) mit Hilfe spezieller Expressionsvektoren. Im folgenden Teil der Arbeit sollte unter Verwendung des pSuper-RNAi-Systems (Brummelkamp *et al.*, 2002) getestet werden, ob mit Hilfe dieser Methode eine $\gamma 2$ -Adaptin-RNAi in Zellkultur erreicht werden kann.

9.1.1 Silencing des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in HuH7-Zellen

Nach erfolgreicher Etablierung der RNA Interferenz mit dem pSuper-Vektor (vgl. 4.1), wurden vier pSuper-Silencing-Konstrukte (#1 - #4) hergestellt, mit denen ein effektives Silencing des $\gamma 2$ -Adaptin-Gens erreicht werden sollte. Dazu wurden in den pSuper-Vektor je zwei hybridisierte 64 Bp-DNA-Oligonukleotide kloniert (vgl. Material 5.1.2), welche homolog zu den entsprechenden 19 Bp-Regionen im $\gamma 2$ -Adaptin-Gen waren (Abb. 32).

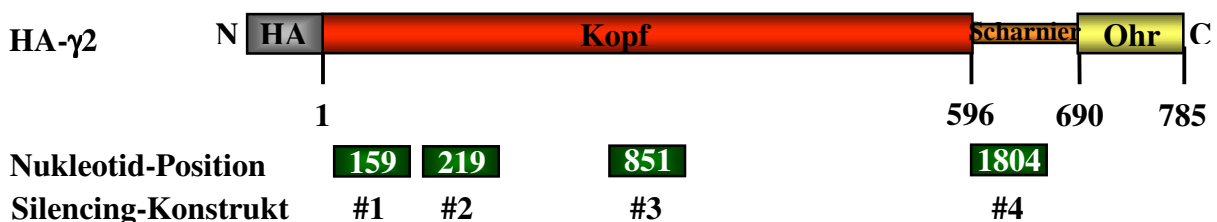


Abb. 32: Schematische Darstellung der siRNA-Positionen im $\gamma 2$ -Adaptin-Gen (Vektor-basiert).

Die verschiedenen $\gamma 2$ -Adaptin-Proteinbereiche sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die Kopf-Region ist rot, der Scharnier-Bereich ist orange und die Ohr-Domäne ist gelb dargestellt. Hellgrau hervorgehoben ist das N-terminale HA-Epitop. Die Zahlen unterhalb des Schemas geben die Aminosäurepositionen der entsprechenden Bereiche an. Die grünen Kästchen verdeutlichen die Nukleotid-Position der entsprechenden siRNA.

Zur Induktion der RNA-Interferenz wurde eine konstante Menge des HA- $\gamma 2$ -Expressionsvektors (2 μ g) und je zwei unterschiedliche Mengen (2 und 3 μ g) des entsprechenden pSuper-

γ 2-Silencing-Konstruktes mit der Nukleotid-Target-Position 159 (#1), 219 (#2), 851 (#3) oder 1804 (#4) in Leberzellkulturen (HuH7-Zellen) kotransfiziert. Die fehlende DNA-Menge zur Transfektion von insgesamt 5 μ g wurde mit dem leeren pcDNA3.1-Vektor ergänzt. Als Negativkontrolle diente eine Kotransfektion des HA- γ 2-Vektors mit dem leeren pSuper-Vektor. Nach dreitägiger Expression wurden die Zellen lysiert und durch einen HA-spezifischen Western-Blot analysiert (Abb. 33A). Zusätzlich wurde die Gesamtproteinmenge der Lysate im Western-Blot mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper kontrolliert (Abb. 33B).

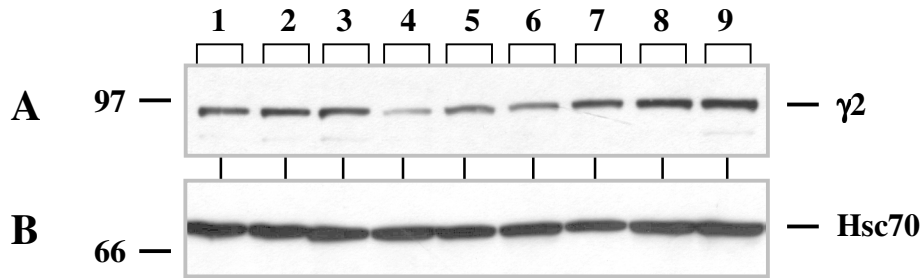


Abb. 33: Silencing des transfizierten γ 2-Adaptins mit pSuper in HuH7-Zellen.

Es wurden HuH7-Zellen wie folgt transfiziert:

	HA- γ 2 + pcDNA3.1 + pSuper- γ 2-Silencing-Konstrukt in einem Verhältnis von (μ g an Vektor-DNA):				
(1)	2	:	1	:	2 (pSuper- γ 2 #1)
(2)	2	:	0	:	3 (pSuper- γ 2 #1)
(3)	2	:	1	:	2 (pSuper- γ 2 #2)
(4)	2	:	0	:	3 (pSuper- γ 2 #2)
(5)	2	:	1	:	2 (pSuper- γ 2 #3)
(6)	2	:	0	:	3 (pSuper- γ 2 #3)
(7)	2	:	1	:	2 (pSuper- γ 2 #4)
(8)	2	:	0	:	3 (pSuper- γ 2 #4)
(9)	2	:	0	:	3 (pSuper)

Die Lysate wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem HA-spezifischen (A) und einem Hsc70-spezifischen Antikörper (B) im Western-Blot analysiert. Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert.

Die Western-Blot-Analyse mit dem HA-spezifischen Antikörper zeigte, dass zwei (#2 und #3) von vier pSuper- γ 2-Silencing-Konstrukten einen Silencing-Effekt bezüglich der Expression des HA- γ 2-Proteins zu haben scheinen. Es konnte eine Reduktion der γ 2-Adaptin-Expression von bis zu 70% durch den Einsatz von #2 (Abb. 33A, Spur 4) erreicht werden. Dabei zeigte sich die Effektivität des Silencings abhängig von der Menge des transfizierten pSuper- γ 2-Silencing-Konstruktes. Je mehr Konstrukt eingesetzt wurde, desto geringer fiel die Expression des HA- γ 2-Proteins aus (Spuren 4+6). Die beiden Silencing-Konstrukte #1 und #4 dagegen zeigten keinerlei Wirkung auf die γ 2-Adaptin-Expression (Spuren 1, 2, 7+8). Die Untersuchung der Hsc70-Expression verdeutlichte, dass sich in allen Ansätzen eine vergleichbare Gesamtprotein-Menge befand (Abb. 33B). Somit lassen sich die detektierten Differenzen in der γ 2-Adaptin-Expression nicht auf unterschiedliche Mengen an lysiertem Protein zurück-schließen. Es wurde vermutet, dass es durch eine Kotransfektion der pSuper- γ 2-Silencing-Konstrukte #2 und #3 eventuell noch zu einer Steigerung des Silencing-Effektes (> 70%) kommen könnte.

kommen könnte. Dies konnte aber leider nicht bestätigt werden (Ergebnisse sind nicht dargestellt).

9.1.2 Transkriptionsverstärkung des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in COS7-Zellen

In COS7-Zellen konnte durch die Kotransfektion der Vektoren HA- $\gamma 2$ und pSuper- $\gamma 2$ -Silencing-Konstrukt #2 ein interessantes Phänomen beobachtet werden. Wie Abbildung 34 zeigt, kam es durch steigende Mengen des zu transfizierenden Silencing-Konstruktes #2 (0-4,5 μ g) anstatt zu dem erwünschten Silencing, zu einer Transkriptionsverstärkung des kotransfizierten $\gamma 2$ -Adaptins. Auch hier wurde bei der Transfektion die fehlende, zu transfizierende DNA-Menge mit dem leeren pcDNA3.1-Vektor auf 5 μ g aufgefüllt. Die Zellen wurden nach drei Tagen lysiert. Der Proteinnachweis erfolgte im Western-Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper.

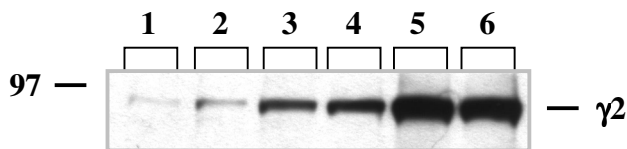


Abb. 34: Transkriptionsverstärkung des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in COS7-Zellen.

Es wurden COS7-Zellen wie folgt transfiziert:

μ g an Vektor-DNA in einem Verhältnis von:

	HA- $\gamma 2$ + pSuper- $\gamma 2$ #2 + pcDNA3.1		
(1)	0,5	:	1 : 3,5
(2)	0,5	:	2 : 2,5
(3)	0,5	:	3 : 1,5
(4)	0,5	:	4 : 0,5
(5)	0,5	:	4,5 : 0
(6)	0,5	:	0 : 4,5

Der Western-Blot erfolgte mit einem HA-spezifischen Antikörper. Das Molekulargewicht des mitgeführten Markerproteins ist links in kDa notiert.

Diese unerwartete Transkriptionsverstärkung könnte dadurch entstanden sein, dass COS7-Zellen stabil mit dem SV40 T-Antigen transfiziert sind und dieses Protein konstitutiv exprimieren. Besitzt nun ein Plasmid, wie z.B. pcDNA, in welches das Gen des $\gamma 2$ -Adaptins kloniert wurde, eine SV40 Erkennungssequenz, so bindet das T-Antigen nach Transfektion des Plasmids an diesen Sequenzabschnitt. Dies führt im Zellkern dazu, dass eine Vermehrung des Plasmids stattfindet, wodurch mehr Plasmidmoleküle pro Zelle entstehen. Es kommt zu einer extrem verstärkten Proteinexpression, gegen die das sonst funktionierende pSuper- $\gamma 2$ -Silencing-Konstrukt #2 nicht ausreichend wirken kann.

9.1.3 Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in HBV-replizierenden Zellen

Nachdem zwei funktionierende pSuper- $\gamma 2$ -Silencing-Konstrukte (#2 und #3) erfolgreich etabliert schienen, sollten diese bezüglich ihres Einflusses auf die HBV-Morphogenese untersucht werden. Für die gleichzeitige Produktion von HBV-Viren und der entsprechenden siRNA gegen das $\gamma 2$ -Adaptin war eine Kotransfektion des pMHBV_{1,1}-Vektors und des jeweiligen pSuper-Silencing-Konstruktes notwendig. Bei Kotransfektionen kann jedoch nicht immer sichergestellt werden, dass beide Vektoren in alle Zellen gleichermaßen transfiziert und somit deren Produkte exprimiert werden. Deshalb stellen die Transfektionsraten einer Kotransfektion oft ein Problem bei der quantitativen Fragestellungen dar. Um solche Kotransfektionsprobleme zu vermeiden, wurde der RNA-Promotor zusammen mit dem shRNA-codierenden Bereich aus den pSuper- $\gamma 2$ -Silencing-Konstrukten #2 und #3 herausgeschnitten und C-terminal mit dem pMHBV_{1,1}-Vektor fusioniert (vgl. Material 4.6). Die resultierenden bicistronischen Plasmide wurden als HBV-pSuper- $\gamma 2_{Bi}$ #2 und HBV-pSuper- $\gamma 2_{Bi}$ #3 bezeichnet. Anschließend wurden HuH7-Zellen mit diesen bicistronischen Plasmiden transfiziert und die gewünschten Proteine im Western-Blot nach dreitägiger Expression analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe verschiedener Antikörper. Aus den Lysaten wurde das endogene $\gamma 2$ -Adaptin mit dem $\gamma 2$ -Adaptin-spezifischen (8330), und das HBV-L-Protein mit einem L-spezifischen Antikörper (MA18/7) nachgewiesen. Zusätzlich wurden sowohl die Lysate als auch die Überstände zum einen im Western-Blot mit einem Core-spezifischen Antikörper bezüglich der Core-Expression untersucht und zum anderen im HBsAg-ELISA auf Viren und subvirale Partikel hin überprüft. Als Positivkontrolle diente eine individuelle Transfektion mit dem pMHBV_{1,1}-Vektor. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 35 dargestellt.

Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass es trotz der vermeintlichen Sequenzspezifität der pSuper-generierten $\gamma 2$ -siRNAs #2 (219 nt) und #3 (851 nt), zu unspezifischen Silencing-Effekten kam. Bereits in den HBV-replizierenden Zellen konnte ein Verlust an zellulärem HBV-L-, Core- und S-Protein verzeichnet werden (Abb. 35B, C und E die Lysate). Dementsprechend niedriger fielen auch die nachweisbaren Mengen an HBV-Core- und S-Protein im Überstand aus (Abb. 35D und E die Überstände). Dieser Effekt wurde durch das vermeintlich besser funktionierende siRNA-Konstrukt HBV-pSuper- $\gamma 2_{Bi}$ #2 sogar noch verstärkt (Abb. 35, Spur 3).

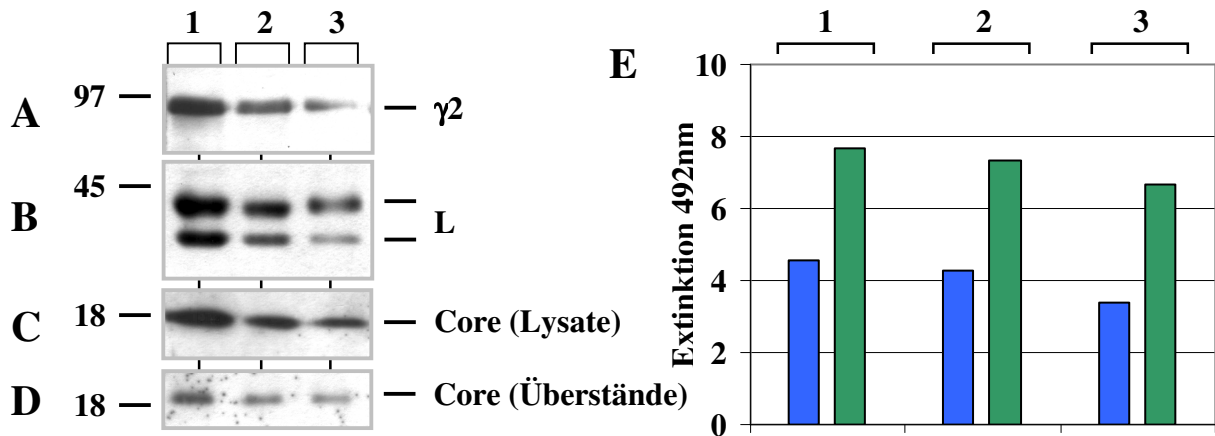


Abb. 35: Silencing des endogenen γ 2-Adaptins mit pSuper in HBV-replizierenden Zellen.

Es wurden HuH7-Zellen wie folgt transfiziert: (1) HBV_{1,1}; (2) HBV-pSuper- γ 2_{Bi} #3; (3) HBV-pSuper- γ 2_{Bi} #2. Die Lysate wurden im Western-Blot mit folgenden Antikörpern analysiert: (A) γ 2-Adaptin-spezifisch ($\alpha\gamma$ 2-Ag (8330)); (B) L-spezifisch (MA18/7) und (C) Core-spezifisch (K46). Die Überstände wurden ebenfalls im Western-Blot mit einem Core-spezifischen Antikörper analysiert (K46) (D). Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert. Mit einem HBsAg-ELISAs (E) wurde die Menge an HBs-Protein sowohl in den Lysaten (blau dargestellt) als auch in den Überständen (grün dargestellt) bei einer Extinktion von 492nm ermittelt.

Dieser Silencing-Effekt würde bedeuten, dass die Reduktion der γ 2-Adaptin-Expression (Abb. 35A) in der Zelle bereits direkte Folgen auf die Synthese, die Stabilität und/oder die Halbwertszeit viraler Proteine hätte. Durch den Einsatz synthetisch-hergestellter siRNAs sollte geklärt werden, ob dies tatsächlich der Fall sein könnte, oder ob es sich hier um einen Artefakt handelte.

9.2 γ 2-Adaptin-RNAi mit synthetisch-hergestellten siRNAs

Da das „Gene-Silencing“ des γ 2-Adaptins im pSuper-Silencing-System maximal nur 70% erreichte und zusätzlich die Vermutung aufkam, dass der Silencing-Effekt unspezifisch sein könnte, da er sich auch auf weitere virale Proteine (L, S und Core) zu erstrecken schien (Abb. 35), wurde trotz des nur transient wirkenden RNAi-Effektes auf synthetisch-hergestellte siRNAs von Qiagen ausgewichen.

9.2.1 Silencing des transfizierten γ 2-Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HuH7-Zellen

Nach erfolgreicher Etablierung eines Silencing-Systems wurden fünf synthetisch-hergestellte siRNAs (#1 - #5) zur Ausschaltung des γ 2-Adaptins getestet (Abb. 36). Dabei korrespondierten drei der 21 Nukleotid-langen siRNA-Targets mit der Proteinsequenz in der Kopfregion

(#1, #2 und #3), und zwei mit der Scharnierregion des Adaptins (#4 und #5). Im Folgenden wurde untersucht, ob und wie gut der Silencing-Effekt der einzelnen siRNA war.

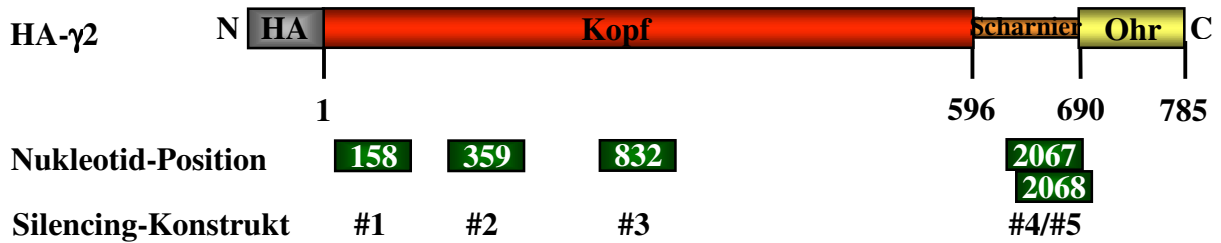


Abb. 36: Schematische Darstellung der siRNA-Positionen im γ2-Adaptin-Gen (synthetische siRNAs).

Die verschiedenen γ2-Adaptin-Proteinbereiche sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die Kopf-Region ist rot, der Scharnier-Bereich ist orange und die Ohr-Domäne ist gelb dargestellt. Hellgrau hervorgehoben ist das N-terminale HA-Epitop. Die Zahlen unterhalb des Schemas geben die Aminosäurepositionen der entsprechenden Bereiche an. Die grünen Kästchen verdeutlichen die Nukleotid-Position der entsprechenden siRNA.

Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem HA-γ2-Expressionsvektor transfiziert. Eine Kotransfektion erfolgte durch jeweils eine der fünf synthetisch-hergestellten siRNAs (#1- #5) gegen das γ2-Adaptin. Die gleichzeitige Transfektion von DNA und RNA wurde dabei mit dem Transfektionsreagenz TransMessenger™ gewährleistet. Die Expression des transient transfizierten γ2-Adaptins konnte im Western-Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper verfolgt werden (Abb. 37A). Zusätzlich wurde die Gesamtproteinmenge der Lysate im Western-Blot mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper kontrolliert (Abb. 37B). Als Negativ-Kontrolle diente eine Kotransfektion des HA-γ2-Vektors mit der käuflich erworbenen Fluorescein-markierten „non-silencing“ Kontroll-siRNA, welche auf das γ2-Adaptin keinen Silencing-Effekt zeigte (Abb. 37, Spur 1).

Durch die Hsc70-Kontrolle war sichergestellt, dass sich in allen Lysaten eine vergleichbare Gesamtproteinmenge befand (Abb. 37B). Eine deutliche Reduktion der transienten Expression des γ2-Adaptins (bis zu 95%) konnte durch den Einsatz der γ2-siRNA #5 (Abb. 37A, Spur 2) verzeichnet werden. Die nur um ein Nukleotid verschobene Targetsequenz der γ2-siRNA #4 erzielte eine Reduktion der γ2-Adaptin-Expression um etwa 30% (Spur 3). Die restlichen siRNAs passend zu den Nukleotidpositionen in der Kopf-Region des γ2-Adaptins (#1, #2 und #3) schienen keinen Silencing-Effekt auf die γ2-Adaptin-Expression zu haben.

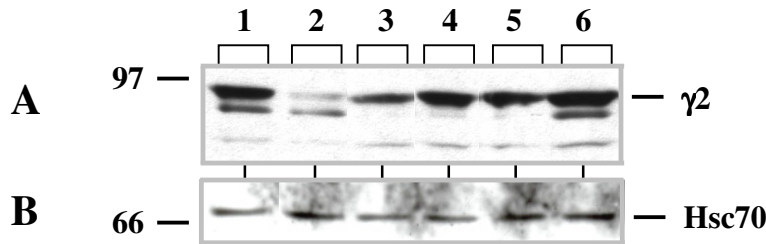


Abb. 37: Silencing des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HuH7-Zellen.

Es wurden HuH7-Zellen wie folgt transfiziert: (1) HA- $\gamma 2$ + Fluorescein-markierte „non-silencing“ siRNA; (2) HA- $\gamma 2$ + $\gamma 2$ -siRNA #5; (3) HA- $\gamma 2$ + $\gamma 2$ -siRNA #4; (4) HA- $\gamma 2$ + $\gamma 2$ -siRNA #3; (5) HA- $\gamma 2$ + $\gamma 2$ -siRNA #2; (6) HA- $\gamma 2$ + $\gamma 2$ -siRNA #1. Die Lysate im Western-Blot mit einem HA-spezifischen (A) und einem Hsc70-spezifischen Antikörper analysiert (B). Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert.

Ein anschließender Versuch sollte klären, ob der Einsatz einer funktionellen siRNA sich tatsächlich bereits auf die Synthese viraler Proteine auswirkt.

9.2.2 Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HBV-replizierenden Zellen

Durch die funktionellen $\gamma 2$ -siRNAs #4 und #5 kommt es zu einem Verlust beziehungsweise zu einer Reduktion des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins. Welche Bedeutung dieses Protein-Silencing für die HBV-Morphogenese hat, wird im Folgenden untersucht. Dazu wurden erneut HuH7-Zellen mit je einer siRNA und dem pMHBV_{1,1}-Vektor kotransfiziert (TransMessengerTM) und nach dreitägiger Expression lysiert. Die Detektion der Proteine in den Lysaten erfolgte im Western-Blot mit zwei verschiedenen Antikörpern. Zum einen wurde das endogene $\gamma 2$ -Adaptin mit einem $\gamma 2$ -Adaptin-spezifischen (8330) und zum anderen das HBV-L-Protein mit einem L-spezifischen Antikörper (MA18/7) nachgewiesen (Abb. 38A+B). Zudem wurden die Lysate und die Überstände mit einem Core-spezifischen Antikörper (K46) auf die Core-Expression hin untersucht (Abb. 38C+D), und die Menge an viraler DNA mit Hilfe des Southern-Dot-Blots bestimmt (Abb. 38E+F). Mit einem HBsAg-ELISA wurde die Menge der exprimierten und sezernierten HBV-Hüllproteine gemessen (Abb. 38G). Eine Positivkontrolle erfolgte durch eine Kotransfektion mit dem pMHBV_{1,1}- und dem leeren pcDNA3.1-Vektor (Abb. 38, Spur 1).

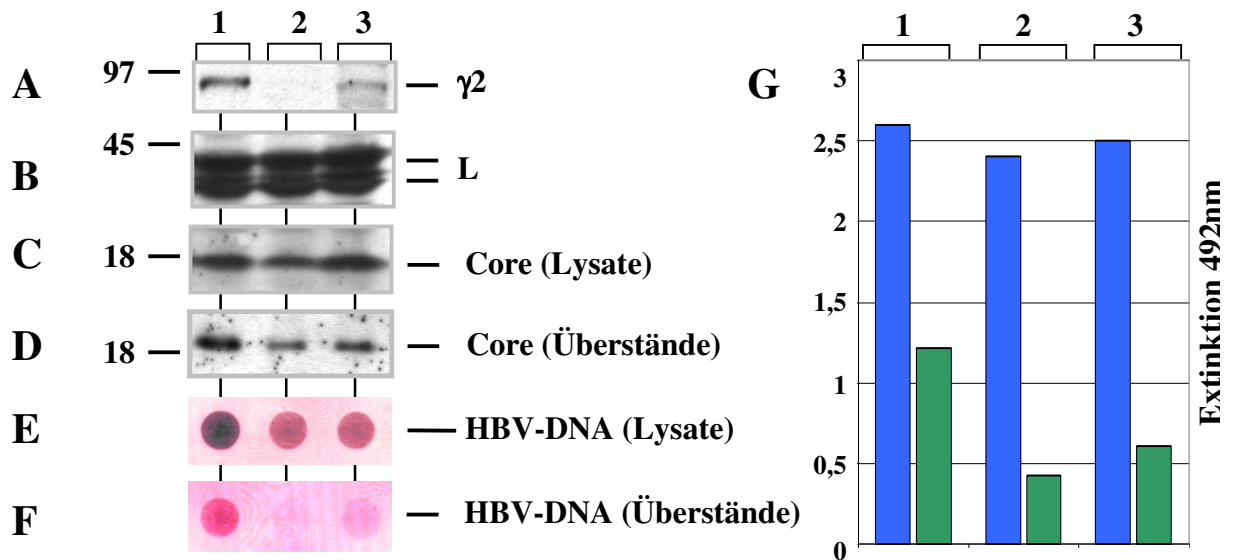


Abb. 38: Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HBV-replizierenden Zellen.

Es wurden HuH7-Zellen wie folgt transfiziert: (1) HBV_{1,1} + pcDNA3.1; (2) HBV_{1,1} + $\gamma 2$ -siRNA #5 (3) HBV_{1,1} + $\gamma 2$ -siRNA #4. Die Lysate wurden im Western-Blot mit folgenden Antikörpern analysiert: (A) $\gamma 2$ -Adaptin-spezifisch ($\alpha\gamma 2$ -Ag (8330)); (B) L-spezifisch (MA18/7); (C) Core-spezifisch (K46). Die Überstände wurden ebenfalls im Western-Blot mit einem Core-spezifischen Antikörper analysiert (K46) (D). Mit dem Southern-Dot-Blot wurde die virale DNA sowohl aus den Lysaten (E), als auch aus den Überständen (F) nachgewiesen. Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert. Mit einem HBsAg-ELISA (G) wurde die Menge an HBV-Hüllprotein sowohl in den Lysaten (blau dargestellt) als auch in den Überständen (grün dargestellt) bei einer Extinktion von 492nm ermittelt.

Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, wurde die Expression des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins durch die Transfektion der $\gamma 2$ -siRNA #5 (Spur 2) im Vergleich zur Positivkontrolle (Spur 1) annähernd zu 100% ausgeschaltet, während die $\gamma 2$ -siRNA #4 die Proteinexpression nur zu 70% herabzusetzen vermochte. Durch das Silencing des $\gamma 2$ -Adaptins mit diesen synthetisch-hergestellten siRNAs kam es diesmal zu keinem Einfluss auf die Synthese, die Stabilität und/oder die Halbwertszeit der viralen Proteine (vgl. Abb. 35), da sich die HBV-Proteine L, S und Core in den Lysaten in vergleichbarer Menge wiederfanden (Abb. 38B, C und G die Lysate). Anders stellt sich der Einfluss des endogenen $\gamma 2$ -Adaptin-Verlustes auf die Ausschleusung des Virus und seiner subviralen Partikel aus der Zelle dar. Durch das spezifische Silencing konnten in den Überständen erheblich weniger HBV-Cores, Viren und subvirale Partikel gemessen werden (Abb. 38D, F und G die Überstände). Dabei schien der Grad des $\gamma 2$ -Adaptin-Verlustes mit der Ausschleusung aus der Zelle zu korrelieren. Je weniger endogenes $\gamma 2$ -Adaptin vorhanden war, desto weniger Viren wurden aus der Zelle ausgeschleust. Durch die sensitive Methode des viralen DNA-Nachweises über Southern-Dot-Blot konnten durch das $\gamma 2$ -Adaptin-Silencing auch geringe Verluste an viraler DNA in den Zellen detektiert

werden (Abb. 38E), was für eine Beteiligung des $\gamma 2$ -Adaptins nicht nur am HBV-Budding-Mechanismus, sondern auch am Zusammenbau des Virus spricht.

Die folgende Abbildung 39 verdeutlicht noch einmal die Reduktion der HBV-Freisetzung durch den Einsatz der synthetisch-hergestellten siRNAs $\gamma 2$ -siRNA #4 und $\gamma 2$ -siRNA #5. Dazu wurde die gemessene Menge an viraler DNA aus der Positivkontrolle (Kotransfektion von HBV_{1,1} und pcDNA3.1) auf 100% gesetzt (Balken 1). Dementsprechend verringerte sich die HBV-Freisetzung durch den Einsatz von $\gamma 2$ -siRNA #5 (Balken 2) um 80%, beziehungsweise durch die $\gamma 2$ -siRNA #4 um 60% (Balken 3).

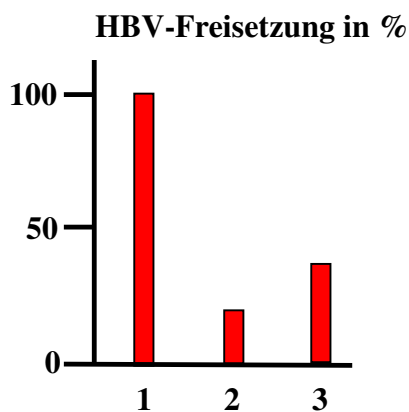


Abb. 39: HBV-Freisetzung nach Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HBV-replizierenden Zellen.

Die Prozentwerte des Balkendiagramms sind nach Southern-Dot-Blot-Analyse aus Abb. 38F bestimmt worden.

Kotransfektionen von HuH7-Zellen: (1) HBV_{1,1} + pcDNA3.1; (2) HBV_{1,1} + $\gamma 2$ -siRNA #5 (3) HBV_{1,1} + $\gamma 2$ -siRNA #4.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es gelungen ist, die endogene Expression des $\gamma 2$ -Adaptin-Gens mit Hilfe der RNAi-Technik erfolgreich auszuschalten. Durch die kostengünstigere „Gene-Silencing“-Methode mit dem pSuper-Vektor konnte das Gen durch zwei Targets in der Kopf-Region des Proteins (219 nt; 851 nt) bis zu 70% in seiner Expression herunterreguliert werden. Jedoch erwies sich das Vektor-basierte Silencing trotz vermeintlicher Sequenzspezifität der Targets als unspezifisch, da sämtliche koexprimierte HBV-Proteine (L, S und Core) ebenfalls einem Silencing unterlagen. Zudem kam es mit den pSuper-Konstrukten zu einer unerwünschten Transkriptionsverstärkung des transient exprimierten $\gamma 2$ -Adaptins in SV40 T-Antigen-tragenden COS7-Zellen. Durch den Einsatz synthetisch-hergestellter siRNAs wurden diese Probleme umgangen. Mit zwei siRNA-Targets gegen den sehr C-terminal gelegenen Scharnier-Bereich (2067 nt; 2068 nt) konnte das $\gamma 2$ -Adaptin-Gen fast zu 100% ausgeschaltet werden. Eine Folge des hoch spezifischen $\gamma 2$ -Adaptin-Silencing war eine Verringerung der HBV-Freisetzung aus der Zelle von bis zu 80%, was darauf schließen lässt, dass das $\gamma 2$ -Adaptin entscheidend am HBV-Budding-Prozess beteiligt zu sein scheint. Der HBsAg-ELISA der Überstände zeigte, dass $\gamma 2$ -Adaptin-defiziente Zellen keiner generellen Sekretionsstörung unterlagen, da noch subvirale Partikel die Zelle verlassen konnten.

10. Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin

Eine Proteinüberexpression ist die vermehrte Herstellung (Proteinbiosynthese) eines Proteins in einer Zelle, die dort zu einer erhöhten Konzentration des Proteins führen kann. Diese Überexpression kann durch die Transfektion eines rekombinanten Plasmids verursacht werden, welches das Gen unter der Kontrolle eines stark replizierenden Promotors trägt. Bezüglich der essentiellen, aber noch nicht abschließend verstandenen Rolle von $\gamma 2$ -Adaptin in den späten Schritten des HBV-Lebenszyklus, kam die Vermutung auf, dass eine ektopische Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin die Virus-Produktion eventuell steigern könnte.

10.1 Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin reduziert den intrazellulären L-Pool

Die Untersuchung der Folgen einer Überexpression des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins wurde mit den Folgen der Überexpression der verschiedenen $\gamma 2$ -Adaptin-Mutanten ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$, $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 1-522}$) verglichen. Zuerst sollte geklärt werden, ob die Überexpression der verschiedenen Konstrukte bereits Auswirkung auf die individuelle Expression des HBV-L-Hüllproteins zeigt.

Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem jeweiligen $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukt (HA- $\gamma 2$, HA- $\gamma 2_{\Delta 1-522}$, HA- $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und HA- $\gamma 2_{\Delta 627-785}$) und dem pNI2.L-Vektor kotransfiziert und nach dreitägiger Expression lysiert. Die Überprüfung der Proteinexpression der HA-markierten $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte wurde im Western-Blot mit dem HA-spezifischen Antikörper gewährleistet, während die Expression des L-Proteins mit einem L-spezifischen Antikörper (MA18/7) durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde die Menge aller zellulären Hüllproteine (L, M und S) und aller subviralen Partikel im Überstand mit einem HBsAg-ELISA erfasst. Als Negativkontrolle diente eine alleinige Transfektion mit dem pNI2.L-Vektor

Wie die Abbildung 40 zeigt, wurden abgesehen von der N-terminalen $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutante ($\gamma 2_{\Delta 1-522}$) alle $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte ähnlich stark exprimiert. Das mit einem roten Pfeil hervorgehobenen Nebenprodukt, welches der HA-Antikörper hier zu erkennen scheint, lässt auf eine vergleichbare Protein-Gesamtmenge in allen Ansätzen schließen. Entgegen der Erwartung, dass eine Überexpression des $\gamma 2$ -Adaptins eventuell die Virus-Produktion steigern könnte, kam es in den Zellen zu einer deutlichen Reduktion des L-Proteins. Durch den Überschuss an $\gamma 2$ -Adaptin Wildtypprotein sowie an C-terminal verkürzten Mutanten ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$) konnte nur noch 20% des koexprimierten HBV-L-Proteins (Abb. 40, Spuren 1, 3 und 4), verglichen mit der pcDNA3.1-Kontrolltransfektion

(Spur 5), nachgewiesen werden. Dagegen zeigte der Einsatz der N-terminal verkürzten Mutante $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ (Spur 2) diesen Effekt nicht. Die HBsAg-ELISA Resultate (Abb. 40 rechtes Schaubild) verdeutlichten zusätzlich, dass sich die Überexpression von $\gamma 2$, $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ nicht nur auf die Expression des L-Proteins beschränkte, sondern sich auch auf alle weiteren Oberflächenproteine (HBV-S- und M-Protein) zu erstrecken scheint.

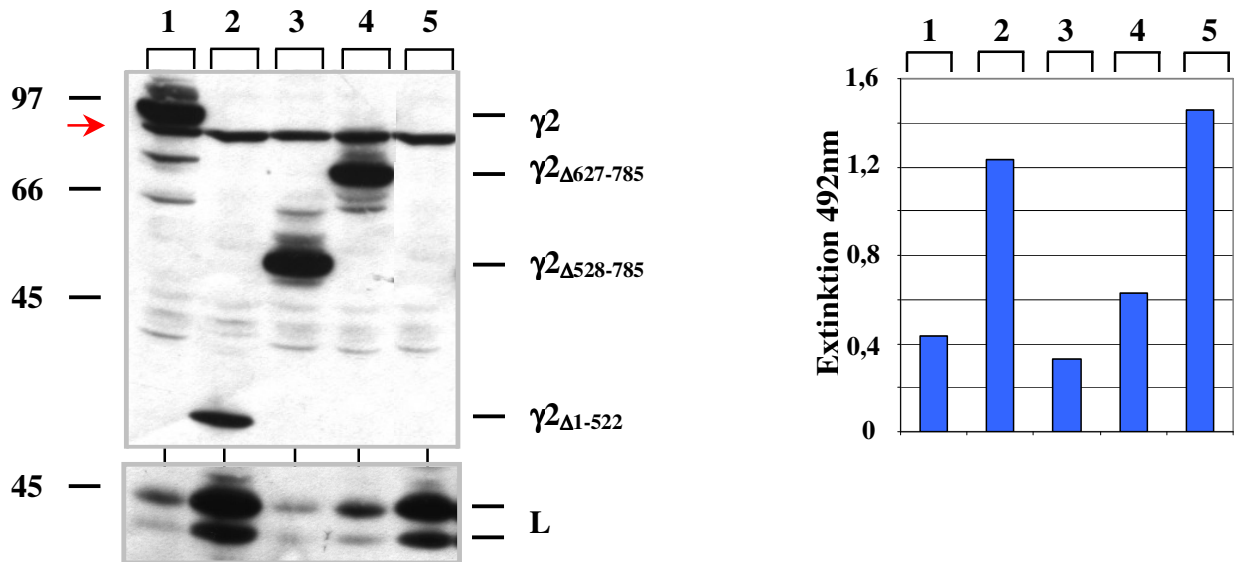


Abb. 40: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin reduziert den intrazellulären L-Pool.

Humane Leberzellen (HuH7) wurden wie folgt transfiziert: (1) L + HA- $\gamma 2$; (2) L + HA- $\gamma 2_{\Delta 1-522}$; (3) L + HA- $\gamma 2_{\Delta 528-785}$; (4) L + HA- $\gamma 2_{\Delta 627-785}$; (5) L + pcDNA3.1. Die Lysate wurde zum einen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot analysiert (linkes Schaubild), und zum anderen mit einem HBsAg-ELISA bei einer Extinktion von 492nm untersucht (rechtes Schaubild). Die Detektion aller HA-markierten $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte erfolgte im Western-Blot mit dem α HA-Ag und das L-Protein wurde mit Hilfe des L-spezifischen MA18/7 dargestellt. Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert. Der rote Pfeil hebt das vom Antikörper erkannte Nebenprodukt hervor, welches sich als Kontrolle der Gesamtproteinmenge in allen Ansätzen eignet.

Dass sich der Effekt der Reduktion an nachweisbarem L-Protein nicht durch die Transfektion der N-terminal verkürzten Mutante $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ zeigte, könnte daran liegen dass dieses Konstrukt im Vergleich zu allen anderen Konstrukten weniger als halb so stark in den Zellen zur Expression kam ($\approx 40\%$). Dies könnte auf eine Dosis-/Konzentrationsabhängigkeit zwischen überexprimiertem $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukt und dem HBV-Hüllprotein zurückzuführen sein, was im Folgenden untersucht werden soll.

10.2 Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Dosis-/Konzentrationsabhängigkeit

Die Beobachtung, dass das weniger stark exprimierte $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ sich in den vorhergehenden Western- und Southern-Dot-Blot-Analysen ähnlich wie die Negativkontrolle mit dem leeren pcDNA3.1-Vektor verhielt (vgl. Abb. 40), lies die Vermutung aufkommen, dass es eine Korrelation zwischen der Menge des exprimierten $\gamma 2$ -Adaptins und dem Einfluss auf die Expression der HBV-Hüllproteine geben könnte.

Dazu wurden erneut HuH7-Zellen mit dem pNI2.L- und dem $\gamma 2$ -Adaptin-Vektor kotransfiziert, wobei die Menge des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptin-Vektors variierte und die fehlenden DNA-Mengen zur Transfektion durch den leeren pcDNA3.1-Vektor ergänzt wurden. Nach dreitägiger Proteinexpression wurden die Zellen lysiert. Die Lysate und die Überstände wurden mit einem HBsAg-ELISA analysiert.

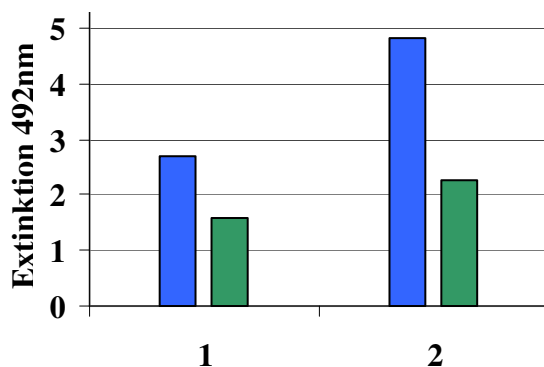


Abb. 41: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Dosis-/Konzentrationsabhängigkeit.

HuH7-Zellen wurden wie folgt transfiziert:

μg an Vektor-DNA in einem Verhältnis von:

HA- $\gamma 2$ + pNI2.L + pcDNA3.1

(1) 2 : 2 : 0

(2) 1 : 2 : 1

Die Lysate und die Überstände wurden mit einem HBsAg-ELISA bei einer Extinktion von 492nm untersucht. Dabei sind im Balkendiagramm die Lysate blau und die Überstände grün dargestellt.

Es stellte sich heraus, dass es durch eine Reduktion der transfizierten Menge an $\gamma 2$ -Adaptin-Vektor-DNA mit einer daraus resultierenden Verringerung des transient exprimierten $\gamma 2$ -Adaptins zu einer Erholung der gemessenen intra- und extrazellulären Mengen an L-, M- und S-Protein kam (Abb. 41). Dies lässt vermuten, dass der HBV-Hüllprotein-reduzierende Effekt vom Expressionsniveau des jeweiligen $\gamma 2$ -Adaptin-Konstruktes abzuhängen scheint.

10.3 Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Leberzell-spezifischen Effekt

Da das Hepatitis-B-Virus einen strengen Zelltropismus zeigt, und nur in der Lage ist, ausdifferenzierte, parenchymale, humane Leberzellen zu infizieren, stellte sich hier die Frage, ob die Überexpression des $\gamma 2$ -Adaptins sich auch in anderen Zelltypen (z.B. humanen Nierenzellen) ähnlich auf die viralen Hüllproteine auswirkt.

Für diesen Versuch wurden erneut L-induzierbare, humane Nierenzellen (EcR-LHA-293) verwendet. Da in diesen Zellen das L-Protein durch eine Induktion mit Ponasteron A stabil

exprimiert wird, konnte auf eine Kotransfektion verzichtet werden. Die EcR-LHA-293-Zellen wurden folglich mit dem jeweiligen $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukt (HA- $\gamma 2$, HA- $\gamma 2_{\Delta 528-785}$, HA- $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ oder HA- $\gamma 2_{\Delta 1-522}$) transfiziert und sechs Stunden nach Transfektion induziert. Als Negativ-Kontrollen dienten induzierte und nicht induzierte EcR-LHA-293-Zellen, die mit dem pcDNA3.1-Vektor transfiziert wurden (Abb. 42, Spuren 5 und 6).

Die Ergebnisse der Untersuchung humaner Nierenzellen im Western-Blot und im ELISA zeigten eindeutig, dass die Überexpression sämtlicher $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte keinen Einfluss auf die HBV-Hüllproteine L, M und S zu haben scheinen. Ein ähnliches Ergebnis konnte in einem vergleichbaren Versuchsansatz in COS7-Zellen (Affen-Nierenzellen) erzielt werden (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

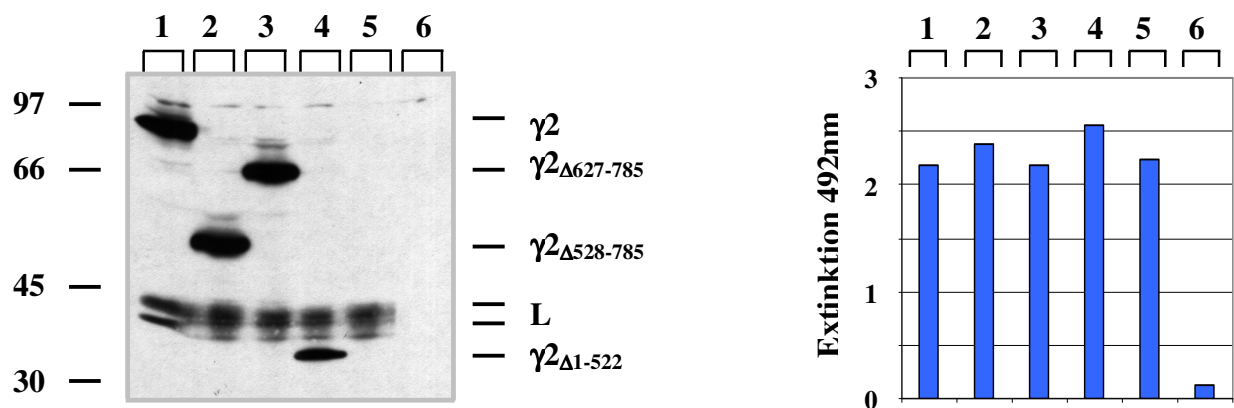


Abb. 42: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Leberzell-spezifischen Effekt.

Humane Nierenzellen (EcR-LHA-293) wurden wie folgt transfiziert und mit Ponasteron A induziert: (1) HA- $\gamma 2$; (2) HA- $\gamma 2_{\Delta 528-785}$; (3) HA- $\gamma 2_{\Delta 627-785}$; (4) HA- $\gamma 2_{\Delta 1-522}$; (5) pcDNA3.1 (6) pcDNA3.1 nicht-induziert. Die Lysate wurde zum einen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot analysiert (linkes Schaubild), und zum anderen mit einem HBsAg-ELISA bei einer Extinktion von 492nm untersucht (rechtes Schaubild). Die Detektion im Western-Blot erfolgte mit HA-spezifischen α HA-Ag Antikörper. Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert.

Dementsprechend zeigt die Überexpression der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte einen Leberzell-abhängigen Einfluss auf die HBV-Hüllproteine. Dies könnte ein weiteres Indiz für die essentielle Funktion des $\gamma 2$ -Adaptins während der HBV-Morphogenese sein.

10.4 Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin beeinflusst die HBV-Freisetzung

Nachdem gezeigt wurde, dass die Überexpression der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte einen Einfluss auf die HBV-Hüllproteine zu haben scheint, sollten diese Konstrukte dahingehend untersucht werden, ob sie auch eine Wirkung auf die Bildung und Freisetzung der Hepatitis-B-Viren haben könnten.

Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem klonierten HBV-Genom (pHBV_{1,1}) und den γ 2-Adaptin-Konstrukten (HA- γ 2, HA- γ 2 _{Δ 528-785}, HA- γ 2 _{Δ 627-785} und HA- γ 2 _{Δ 1-522}) transient kotransfiziert. Eine Kotransfektion mit dem HBV_{1,1}- und dem leeren pcDNA3.1-Vektor diente als Negativkontrolle. Nach dreitägiger Expression erfolgte die Lyse der Zellen und eine gelelektrophoretische Auftrennung sowohl der Lysate als auch der Überstände mit anschließendem Western-Blot-Transfer. Die Detektion der HA-gekoppelten Proteine (HA- γ 2, HA- γ 2 _{Δ 528-785}, HA- γ 2 _{Δ 627-785} und HA- γ 2 _{Δ 1-522}) erfolgte mit dem HA-spezifischen Antikörper (Abb. 43A) und die der viralen Hüllproteine (L, M und S) mit dem α HBs-Ag (#70-HG15) (Abb. 43B). Zur Kontrolle der Gesamtproteinmenge wurde der Western-Blot mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper inkubiert (Abb. 43C). Zudem wurde die Menge des Coreproteins mittels eines Core-spezifischen Antikörpers in den Zelllysaten (Abb. 43D) und in den Überständen (Abb. 43E) untersucht. Die Menge an viraler DNA in den Lysaten und in den Überständen wurde durch eine Southern-Dot-Blot-Analyse bestimmt (Abb. 43F+G).

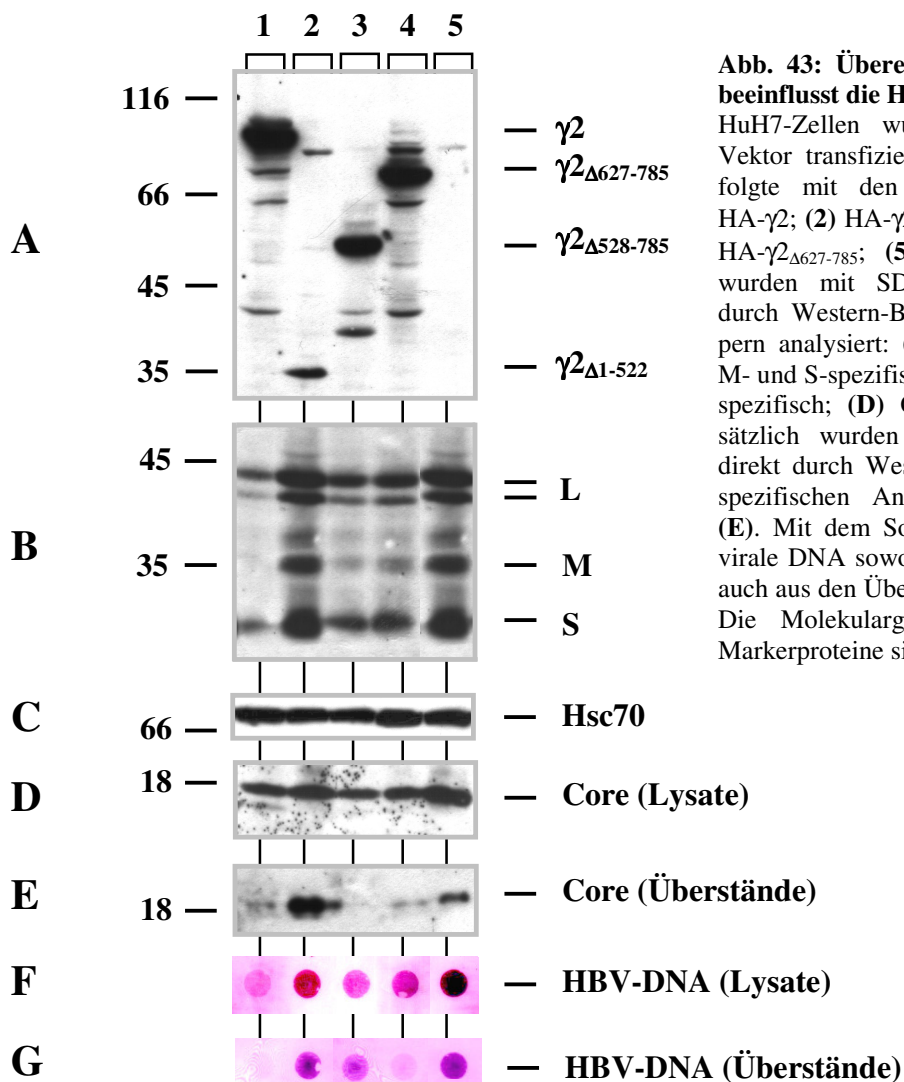


Abb. 43: Überexpression von γ 2-Adaptin beeinflusst die HBV-Freisetzung.

HuH7-Zellen wurden mit dem pHBV_{1,1}-Vektor transfiziert. Eine Kotransfektion erfolgte mit den folgenden Vektoren: (1) HA- γ 2; (2) HA- γ 2 _{Δ 1-522}; (3) HA- γ 2 _{Δ 528-785}; (4) HA- γ 2 _{Δ 627-785}; (5) pcDNA3.1. Die Lysate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot mit folgenden Antikörpern analysiert: (A) HA-spezifisch; (B) L-, M- und S-spezifisch (#70-HG15); (C) Hsc70-spezifisch; (D) Core-spezifisch (K46). Zusätzlich wurden die Überstände ebenfalls direkt durch Western-Blot mit einem Core-spezifischen Antikörper (K46) untersucht (E). Mit dem Southern-Dot-Blot wurde die virale DNA sowohl aus den Lysaten (F), als auch aus den Überständen (G) nachgewiesen. Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert.

Die Untersuchung der Zelllysate im Western-Blot zeigte, dass das $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypprotein und die beiden C-terminal verkürzten Mutanten $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ in etwa gleich stark exprimiert wurden (Abb. 43A, Spuren 1, 3+4). Auch im Kontext HBV-replizierender Zellen scheint die Überexpression dieser drei Konstrukte einen starken Einfluss auf die zellulären HBV-Hüllproteine L, M und S zu haben (Abb. 43B), da sich deren Wiederfindungsrate in der Zelle im Vergleich zur pcDNA3.1-Kontroll-Kotransfektion (Abb. 43B, Spur 5) um wenigstens 30% verringerte. Eine Kontrolle aller Lysate mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper (Abb. 43C) machte deutlich, dass mit vergleichbaren Proteinmengen gearbeitet wurde, und die Reduktion der Menge an zellulärem Hüllprotein nicht durch die Lyse unterschiedlicher Zellzahlen verursacht wurde. Mit dem polyklonalen Antikörper K46 gegen das HBV-Coreprotein konnte in den Lysaten das sekretorische präCoreprotein (17 kDa) und im Überstand überwiegend das 21 kDa große Coreprotein nachgewiesen werden. Interessanterweise verringerte sich durch die Überexpression des $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypproteins und der beiden C-terminal verkürzten Mutanten $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ sowohl die Menge des nachweisbaren zellulären präCoreproteins ($\approx 20\%$), als auch die Menge sezernierter Corepartikel im Überstand ($\approx 100\%$) (Abb. 43D+E). Die Quantifizierung der viralen DNA aus den Lysaten (Abb. 43F) und Überständen (Abb. 43G) durch den Southern-Dot-Blot ergänzten die Ergebnisse. Sowohl in den Zellen, als auch außerhalb konnte eine Reduktion viraler DNA durch die Überexpression des $\gamma 2$ -Adaptin-Proteins und seiner C-terminal verkürzten Mutanten ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$) beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu zeigte die N-terminal verkürzte Mutante $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ weder einen Einfluss auf die zellulären HBV-Proteine L, M, S und Core noch auf die Morphogenese der Viren (Abb. 43, Spur 2). Dies könnte ebenso an der Dosis-/Konzentrationsabhängigen Wirkung des überexprimierten Konstruktes liegen, da dieses, verglichen mit dem $\gamma 2$ -Wildtypprotein, weniger stark exprimiert wurde. Eine weitere Erklärung könnte die Bedeutung der verschiedenen Domänen des $\gamma 2$ -Adaptins für ihre Interaktion mit den viralen Proteinen mit einschließen (vgl. Kapitel 7). Dementsprechend wäre die Überexpression des N-Terminus, also der Kopf-Domäne des $\gamma 2$ -Adaptins, allein ausreichend, um einen Einfluss auf die HBV-Produktion zu nehmen.

Die Abbildung 44 verdeutlicht nochmals den Einfluss der überexprimierten $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte auf die HBV-Freisetzung. Den größten Effekt scheint das $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypprotein selbst zu haben, welches eine Reduktion der Virus-Freisetzung von etwa 90% zeigte.

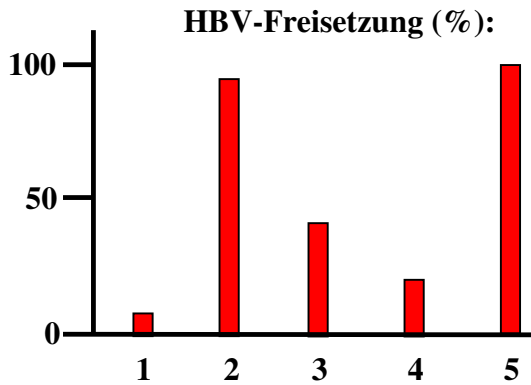


Abb. 44: HBV-Freisetzung nach Überexpression der γ 2-Adaptin-Konstrukte in HBV-replizierenden Zellen. Die Prozentwerte des Balkendiagramms sind nach Southern-Dot-Blot-Analyse aus Abb. 43G bestimmt worden. Kotransfektionen von HuH7-Zellen mit pHBV_{1,1} und: (1) HA- γ 2; (2) HA- γ 2 $_{\Delta 1-522}$; (3) HA- γ 2 $_{\Delta 528-785}$; (4) HA- γ 2 $_{\Delta 627-785}$; (5) pcDNA3.1.

Um die Frage zu beantworten, wie es zu dem Verlust der HBV-Proteine in der Zelle kommen könnte, wären drei verschiedene Erklärungsansätze denkbar. Zum einen könnte das überexprimierte γ 2-Adaptin und auch die C-terminal verkürzten γ 2-Adaptin-Konstrukte dominant-negativ auf das endogene Pendant wirken, und somit dessen native Funktion stören. Insbesondere ist dies dann der Fall, wenn sich das transient exprimierte Protein nach seiner Synthese zur Ausübung der nativen Funktionalität erst als Polymer zusammenbauen muss. Durch die Überexpression von dominant-negativ wirkenden Proteinen (z.B. Deletionsmutanten) kann es zu intrazellulärer Polymerisierung mit dem endogenen Wildtypprotein und somit zu dessen Funktionsverlust kommen. Über den AP-1-Komplex ist bekannt, dass er sich als Heterotetramer zusammenbaut (Nogi *et al.*, 2002). Wenn man davon ausgeht, dass das γ 2-Adaptin ebenfalls in eine ähnliche Struktur eingebaut sein könnte, dann wäre dieses Protein ein potentieller Kandidat, in überexprimierter Form einen dominant-negativen Effekt zu zeigen.

Zum anderen könnte es aber auch sein, dass die detektierten, geringeren viralen Proteinmengen in der Zelle eine Folge der gewählten Versuchsbedingungen sind. Die Lyse der Zellen erfolgte in allen Versuchen mit dem nichtionischen, nicht denaturierenden Detergenz NP-40. Wenn es durch den unphysiologischen Überschuss an γ 2-Adaptin zu einer Umverteilung und/oder Arretierung der HBV-Proteine in NP-40-resistente Kompartimente gekommen sein sollte, würde sich die Detektion dieser Proteine unter den verwendeten Lysebedingungen entziehen.

Als dritte Möglichkeit wäre die Erklärung denkbar, dass ein Überschuss an γ 2-Adaptin zu einem verstärkten intrazellulären Abbau der viralen Proteine führen könnte.

Um eine Erklärung für den zellulären Verlust der HBV-Proteine zu finden, wurden die folgenden abschließenden Untersuchungen durchgeführt.

10.5 Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin führt zur Proteolyse von L

Als Proteolyse (von griechisch lysis - Auflösung) bezeichnet man den Abbau von Proteinen. Autoproteolyse bedeutet, dass sich ein Protein selbständig abbaut. Abhängig davon, wo die Proteolyse stattfindet, unterscheidet man zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Proteolyse. Die intrazelluläre Proteolyse kann in der Zelle entweder über das Proteasom oder über das Lysosom ablaufen, während die extrazelluläre Proteolyse sich auf den Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix durch sezernierte oder membranständige Proteasen beschränkt. Die bei der Proteolyse frei werdenden Peptide und Aminosäuren können zur Proteinbiosynthese wiederverwendet oder zur Energiegewinnung genutzt werden.

Um herauszufinden über welchen Weg der intrazellulären Proteolyse die HBV-Hüllproteine durch die Überexpression des $\gamma 2$ -Adaptins abgebaut werden könnten, wurden verschiedene proteasomale (MG132 und ALLN) und lysosomale Inhibitoren (NH_4Cl und Chloroquin = CHL) eingesetzt. Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem bicistronischen Plasmid HA- $\gamma 2$ -LHA_{Bi} transfiziert. Durch das bicistronische Konstrukt konnte auf Kotransfektionen verzichtet werden, was eine identische Transfektionsrate beider transfizierter Konstrukte garantierte. 48 Stunden nach Transfektion wurden die jeweiligen Inhibitoren zugegeben (10 μM CHL, NH_4Cl , MG132 und 25 μM ALLN), welche 24 Stunden auf die Zellen einwirkten. Die Detektion des $\gamma 2$ -Adaptins und des L-Proteins erfolgte im Western-Blot mit dem HA-spezifischen Antikörper (Abb. 45A+B). Parallel wurde die Gesamtproteinmenge mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper kontrolliert (Abb. 45C). Als Negativkontrolle diente jeweils die Transfektion des Plasmids HA- $\gamma 2$ -LHA_{Bi} mit der Behandlung des jeweiligen Lösungsmittels des Inhibitors (DMEM oder DMSO).

Die Hsc70-Kontrolle verdeutlichte, dass die Gesamtproteinmenge fast aller Lysate vergleichbar war. Nur MG132-behandelte Zellen (Abb. 45C MG132+) lagen in der Hsc70-Proteinmenge deutlich zurück. Da in diesen Zellen ebenso die Menge an nachweisbarem $\gamma 2$ -Adaptin reduziert war, lag die Vermutung nahe, dass MG132-behandelte Zellen verstärkt einer Apoptose unterlagen. Zum Absterben der Zellen könnten zwei verschiedene Ursachen geführt haben. Einerseits könnte eine zu hohe MG132-Konzentration oder eine zu lange Inkubation mit diesem proteasomalen Inhibitor ursächlich sein. Zum anderen wäre es aber ebenso denkbar, dass überexprimiertes $\gamma 2$ -Adaptin durch den Einsatz des proteasomalen Inhibitors (MG132) nicht mehr abgebaut werden konnte, und angereichertes $\gamma 2$ -Adaptin zu einer toxischen Konzentration und schließlich zur Apoptose führte. Dies würde bedeuten, dass das $\gamma 2$ -Adaptin die Zelle auf dem proteasomalem Weg verlässt. Durch den Einsatz des zweiten

proteasomalen Inhibitors ALLN (Abb. 45B ALLN+) konnten keine Mengen-Veränderungen der detektierten Proteine $\gamma 2$ -Adaptin und L verzeichnet werden. Wahrscheinlich war die eingesetzte ALLN-Konzentration zu gering.

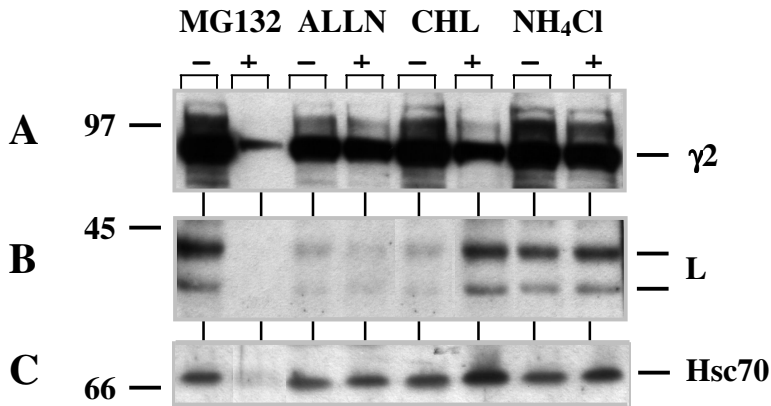


Abb. 45: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin führt zur Proteolyse von L.

HuH7-Zellen wurden mit dem bicistronischen Plasmid HA- $\gamma 2$ -LHA_{Bi} transfiziert. 24 Stunden nach Zugabe des jeweiligen Inhibitors (+) wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden im Western-Blot mit den folgenden Antikörpern analysiert: (A) + (B) HA-spezifisch (C) Hsc70-spezifisch. Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert.

Dem gegenüber steht das vielversprechende Ergebnis des Einsatzes lysosomaler Inhibitoren (CHL und NH₄Cl). Besonders nach 24-stündigen Inkubation mit CHL kam es trotz $\gamma 2$ -Adaptin-Überexpression zu einer Erholung des nachweisbaren zellulären Pools an HBV-L-Hüllprotein (Abb. 45 CHL+).

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob sich dieser Effekt von CHL auch auf das L-Protein im Kontext HBV-replizierender Zellen zeigt.

10.6 Lysosomale Inhibition hat Einfluss auf HBV-Produktion

Aufgrund der erzielten Ergebnisse aus dem Inhibitionstest mit verschiedenen lysosomalen und proteasomalen Inhibitoren konnte man bereits mutmaßen, dass der lysosomale Proteinabbau für die Degradierung von HBV-L verantwortlich sei. Dementsprechend sollte nun erneut getestet werden, ob der lysosomale Inhibitor CHL auch einen Einfluss auf den Abbau des großen Hüllproteins in HBV-replizierenden Zellen hat. Dazu wurden HuH7-Zellen mit dem pMHBV_{1,1}- und dem HA- $\gamma 2$ -Vektor kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde 10 μ M CHL beziehungsweise DMEM als Negativkontrolle den Zellen zugegeben und diese nach weiteren 24 Stunden lysiert und durch Western-Blot analysiert. Als Positivkontrolle diente eine Kotransfektion mit dem pMHBV_{1,1}-Vektor und dem leeren Kontrollvektor pcDNA3.1.

Dieser Ansatz wurde ebenfalls zum einen mit CHL und zum anderen nur mit DMEM behandelt. Die Detektion der Proteinexpression auf dem Western-Blot erfolgte mit verschiedenen Antikörpern. Das $\gamma 2$ -Adaptin wurde durch einen HA-spezifischen (Abb. 46A) und das L-Protein mit einem L-spezifischen Antikörper (Abb. 46B) detektiert. Es folgte eine Kontrolle der Gesamtproteinmenge mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper (Abb. 46C). Zusätzlich wurden sowohl die Lysate als auch die Überstände auf HBsAg-Protein mit einem HBsAg-ELISA überprüft (Abb. 46D).

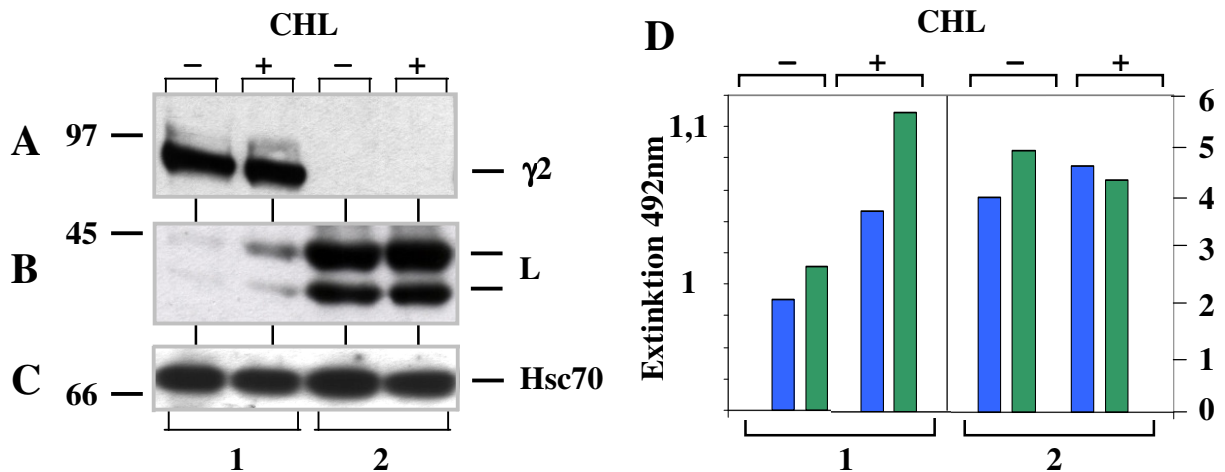


Abb. 46: Lysosomale Inhibition hat Einfluss auf HBV-Produktion.

Es wurden HuH7-Zellen wie folgt transient transfiziert: (1) HBV_{1,1} + HA- $\gamma 2$; (2) HBV_{1,1} + pcDNA3.1. 48 Stunden nach Transfektion wurde der Inhibitor CHL zugegeben, und die Zellen nach weiteren 24 Stunden lysiert. Die Lysate wurde direkt durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot mit verschiedenen Antikörpern analysiert: (A) HA-spezifisch (α HA-Ag); (B) L-spezifisch (MA18/7); (C) Hsc70-spezifisch. Die Molekulargewichte der mitgeführten Markerproteine sind links in kDa notiert. Mit einem HBsAg-ELISA (D) wurde die Menge an HBs-Protein sowohl in den Lysaten (blau dargestellt) als auch in den Überständen (grün dargestellt) bei einer Extinktion von 492nm ermittelt.

Auch hier zeigte die Hsc70-Kontrolle, dass die Gesamtproteinmenge aller Lysate vergleichbar war (Abb. 46C). Durch die Überexpression des $\gamma 2$ -Adaptins kam es, wie bereits unter Kapitel 10.1 beschrieben, zur Reduktion des intrazellulären L-Pools (Abb. 46B, Spur 1). Nach 24-stündiger Behandlung dieser kotransfizierten Zellen mit dem lysosomalen Inhibitor CHL konnte eine Erholung des reduzierten L-Protein-Pools um ca. 20% verzeichnet werden (Abb. 46B, Spur 2). Die Ergebnisse des HBsAg-ELISAs zeigten, dass es durch die Einwirkung von CHL zu einer Regenerierung sowohl der intrazellulären, als auch der extrazellulären HBV-Hüllproteine S, M und L kam (Abb. 46D, Balken 1 +), während CHL weder im Western-Blot noch im HBsAg-ELISA einen Einfluss auf die Positivkontrolle (pMHBV_{1,1} + pcDNA3.1) hatte.

Folglich scheint das HBV-L-Protein alleine und im Kontext der Virusreplikation in der Zelle über den lysosomalen Weg abgebaut zu werden. Durch die Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin

scheint dieser lysosomale Abbau schneller und effizienter zu erfolgen, was auf eine grundlegende Beteiligung von $\gamma 2$ -Adaptin an intrazellulären Transportprozessen schließen ließe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es durch die Überexpression des $\gamma 2$ -Adaptins zu einer dosis/konzentrations-abhängigen, leberzellspezifischen Hemmung der zellulären HBV-L-, M-, S- und Coreproteine kam. Die Tatsache, dass sich dabei das Coreprotein dem L-Protein ähnlich verhält, und auch in der Immunfluoreszenz eine Kolo-kalisation mit $\gamma 2$ -Adaptin zeigte (vgl. 8.1), sprechen für eine Interaktion zwischen dem Coreprotein und $\gamma 2$ -Adaptin. Dabei ist jedoch noch unklar, ob diese Core/ $\gamma 2$ -Interaktion direkt erfolgt, oder indirekt von weiteren zellulären Hilfsfaktoren abhängig ist.

Zudem scheint die Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin nicht nur einen Einfluss auf die individuell exprimierten HBV-Proteine, sondern auch auf das Virus im Ganzen zu haben. Ob sich dabei der Einfluss der N-terminal verkürzten Mutante $\gamma 2_{\Delta 1-522}$ tatsächlich von dem der C-terminal verkürzten Mutanten ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$) unterscheidet, bleibt noch ungeklärt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich die Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin grundsätzlich anders auf die HBV-Morphogenese auszuwirken scheint, als der $\gamma 2$ -Adaptin-Verlust, welcher keinen direkten Effekt auf die zellulären HBV-Proteine zeigte. Im Falle des Silencing von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt die Sekretionskompetenz subviraler Partikel, dass die Morphogenese dieser Partikel sich von der Morphogenese des Hepatitis-B-Virus zu unterscheiden scheinen. Jedoch bleibt diese Arbeit eine endgültige Erklärung schuldig, wodurch die $\gamma 2$ -Überexpressionsbedingte Hemmung der HBV-Proteine hervorgerufen wurde.

Ein erster Hinweis, dass das L-Protein, sowohl individuell exprimiert als auch im Kontext HBV-replizierender Zellen, über das Lysosom abgebaut werden könnte, ergab der Einsatz verschiedener lysosomaler und proteasomaler Inhibitoren. Dieser Abbau könnte durch das intrazelluläre Sortierungs- und Transportprozess-vermittelnde $\gamma 2$ -Adaptin, welches selbst proteasomal abgebaut zu werden scheint, beschleunigt werden. Dies würde voraussetzen, dass vorgeschaltete endosomale Strukturen wie zum Beispiel das MVB (Multivesicular Body) an der Ausschleusung beteiligt sein könnten. Ob das Hepatitis-B-Virus dabei im Ganzen ebenfalls die Zelle über den MVB-Weg die Zelle verlässt, ist ebenfalls noch unklar.

V. Diskussion

Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus kann neben der akuten Form auch zu einer chronischen Hepatitis führen. Mit etwa 350 Millionen chronisch-infizierter Menschen ist die Hepatitis-B weltweit die häufigste Virusinfektion. Bei etwa einem Drittel der Weltbevölkerung sind als Zeichen einer überstandenen HBV-Infektion Antikörper gegen HBV nachweisbar. Die Therapie einer chronischen Hepatitis-B ist nur eingeschränkt möglich. Daher ist die vorbeugende Impfung die wichtigste Maßnahme zur Verhinderung der Infektion und Verminderung der Virusträger als dauerhafte Infektionsquelle. Um so erstaunlicher ist es, dass das Hepatitis-B-Virus mit dem kleinsten bisher bekannten Virus-Genom eine derartige Infektiösität und Persistenz aufweist, dass es bis heute nicht gelungen ist, eine chronische Infektion auszuheilen und damit die fortschreitende Leberzirrhose aufzuhalten. Um so erfolgreich zu persistieren, hat sich das Virus durch eine sehr komplexe Anordnung der einzelnen Gene gut organisiert und setzt seine eigenen, wenigen viralen Proteine multifunktionell ein. Das große HBV-L-Hüllprotein ist zum Beispiel nicht nur an der spezifischen Bindung eines Rezeptormoleküls auf der Oberfläche von Hepatozyten beteiligt (Neurath *et al.*, 1986), sondern es vermittelt auch die Umhüllung der HBV-Nukleokapside (Bruss und Ganem, 1991b; Bruss, 1997). Daher ist das L-Protein für die Infektion und Morphogenese von HBV essentiell. Zusätzlich ist es an der Regulierung der intrazellulären cccDNA-Konzentration beteiligt (Summers, *et al.*, 1990) und wirkt als transkriptioneller Transaktivator (Caselmann *et al.*, 1990; Hildt, *et al.*, 1995; Hildt *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997). Entscheidend für diese Multifunktionalität von L ist seine ungewöhnliche duale Topologie (Bruss *et al.*, 1994; Ostapchuk *et al.*, 1994; Bruss und Vieluf, 1995; Prange und Streeck, 1995). Nicht nur die Multifunktionalität der viralen Proteine sondern auch das enge Zusammenspiel zwischen ihnen und zellulären Wirtsfaktoren ist eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Vermehrungs-Strategie. Abgesehen von den Untersuchungen über die Rolle von Chaperonen (Löffler-Mary *et al.*, 1997; Lambert und Prange, 2003; Hu *et al.*, 2004) ist nur sehr wenig über das umfassende Netzwerk der benötigten Wirtsfaktoren bekannt, welche für die Morphogenese umhüllter DNA-Viren benötigt werden. Zudem stehen bis heute die Charakterisierung des oder der Rezeptoren sowie der Mechanismen der Retention des L-Proteins in der Zelle und die Aufklärung sämtlicher Transportwege aus, die das Virus von seiner Internalisierung bis hin zur Ausschleusung nimmt. Ziel dieser Arbeit war es, das Wechselspiel zwischen HBV und der Wirtszelle zu untersuchen und daran beteiligte zelluläre Komponenten und Mechanismen zu identifizieren und zu charakterisieren. Als Forschungsschwerpunkt wurde dabei die Frage des Sortierungs- und Trans-

portmechanismus der viralen Substrukturen, wie die Hüllproteine von HBV, zum Ort des Viruszusammenbaus, der sogenannten Assembly-Plattform, näher untersucht. Ein möglicher intrazellulärer Membrantransportmechanismus erfolgt mittels Adaptorprotein-Komplexen (AP-Komplexe), welche eine Rezeptor-vermittelte Endozytose von der Plasmamembran steuern (AP-2), Sortierungsprozesse am TGN (*trans*-Golgi-Netzwerk) und/oder an den Endosomen (AP-1, AP-3 und AP-4) vermitteln oder sich am Transport bestimmter Proteine Richtung Lysosom beteiligen (AP-3). Untersuchungen von Retroviren zeigten zum Beispiel, dass diese die Hilfe von Mitgliedern der Adaptorprotein-Familie für die Produktion umhüllter RNA-Viren in Anspruch nehmen. Das Humane Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) bedient sich des AP-3-Komplexes, um den Transport seiner Gag-Proteine zum Ort ihrer Abschnürung zu gewährleisten (Dong *et al.*, 2005), während die Gag-Proteine des EIA-Virus (Equine Infectious Anemia Virus) für den Zusammenbau von Virus-ähnlichen Partikeln den endozytotischen AP-2-Komplex benutzen (Puffer *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005). Lange wurden die drei heterotetrameren Adaptorproteine AP-1, AP-3 und AP-4 am TGN als die alleinigen Hauptakteure für die geordnete Vesikelformation angesehen. Eine Beteiligung von strukturverwandten, monomeren Proteinen an der Selektion von Membranproteinen und der Ausbildung von Vesikelhüllen wurde durch die Entdeckung der GGA-Proteine (Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP ribosylation factor-binding proteins) eingeleitet (Boman *et al.*, 2000; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000). Sukzessiv wurden weitere monomere, Adaptor-ähnliche Proteine entdeckt, wie z.B. Enthoprotin/EpsinR am TGN (Wasiak *et al.*, 2002; Hirst *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2003; Kalthoff *et al.*, 2002), so dass heute davon ausgegangen werden muss, dass neben den heterotetrameren Adaptoren die monomeren Verwandten zumindest an der Sortierung am TGN beteiligt sind, wenn nicht sogar ebenfalls entscheidende Komponenten darstellen.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte ein seither noch wenig charakterisiertes Adaptor-verwandtes Protein, das γ 2-Adaptin, als spezifischer Bindungspartner der präS1-Domäne des großen HBV-L-Hüllproteins, identifiziert werden (Hartmann-Stühler und Prange, 2001), das eine 60%-ige Homologie zu γ 1-Adaptin, einer großen Untereinheit des AP-1-Komplexes, aufweist. Eine Beteiligung des γ 2-Adaptins an der HBV-Morphogenese stünde im Einklang mit bereits bekannten Funktionen von Adaptor-Komplex-Untereinheiten, da sich diese zu verknüpften Strukturen formieren, um verschiedene Frachtproteine für ihren Transport in sogenannte „coated vesicles“ zu verpacken (Boehm and Bonifacino, 2001; Robinson, 2004; Zaremba und Keen, 1983). Jedoch steht das Budding dieser Transportvesikel ins Zytoplasma dem topologisch reversen HBV-Budding ins Lumen intrazellulärer Kompartimente gegenüber. Dies lässt vermuten, dass γ 2-Adaptin nicht unbedingt in seiner typischen Funktion als Vesikel-bildendes

Adaptorprotein wirkt. Diese Vermutung unterstützend wurde bisher kein AP-Komplex gefunden, welcher das $\gamma 2$ -Adaptin beinhaltet. Zudem ist $\gamma 2$ -Adaptin nicht in der Lage, das verwandte $\gamma 1$ -Adaptin in seiner Funktion zu ersetzen, wie eine Studie an homozygoten $\gamma 1$ -Adaptin-Knockout-Mäusen zeigte (Zizioli *et al.*, 1999). Die einzigartige Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin könnte auf seine Ubiquitin-bindende Eigenschaft zurückzuführen sein, welche wir kürzlich charakterisiert haben (Rost *et al.*, 2006).

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass die spezifische $\gamma 2$ /L-Interaktion nur dann stattfindet, wenn die präS1-Domäne des L-Proteins zur zytosolischen Seite der Membran hin orientiert ist (Hartmann-Stühler und Prange 2001). Damit konnte eine Beteiligung dieser Interaktion während der Virusaufnahme und des viralen „Uncoatings“ ausgeschlossen werden, da die präS1-Domäne während dieser frühen Stadien des HBV-Infektionszyklus für einen Kontakt mit $\gamma 2$ -Adaptin nicht zugänglich ist. Der Mechanismus zur Erkennung von Frachtproteinen durch Adaptorproteine findet ebenfalls an der zytosolischen Seite von Membranen statt (Kirchhausen, 1999; Schmid, 1997). Demzufolge könnte die $\gamma 2$ /L-Interaktion eine mögliche Funktion bei der Steuerung des Virus-Zusammenbaus und der Ausschleusung von HBV aus der Zelle besitzen.

Es war unbekannt, ob das durch L angezogene $\gamma 2$ -Adaptin selbst in der Lage ist, weitere zelluläre Proteine, wie z.B. Clathrin und/oder andere Adaptor-Proteine, zum Ort des Zusammenbaus zu rekrutieren, um die Abschnürungsreaktion an der Membran zu unterstützen. Es wurde auch über eine Interaktion des $\gamma 2$ -Adaptins mit den HBV-Kapsidproteinen und Phospholipiden der Membran spekuliert, welche dann ihrerseits den Zusammenbau der viralen Partikel in der Art unterstützen, wie es der nativen Funktion von Adaptorproteinen während der Bildung Clathrin-umhüllter Transportvesikel entspricht. Eine dafür notwendige Membran-Deformierung könnte durch den Zusammenbau von Clathrin-Hüllen ermöglicht werden (Schmid, 1997), die durch die L/ $\gamma 2$ -Komplexe rekrutiert würden. Für eine Beteiligung von Clathrin am HBV-Vesikeltransport spricht das bereits als Bindungspartner identifizierte Hitzeschockprotein Hsc70, welches mit der zytosolischen präS1-Domäne des L-Proteins interagiert (Löffler-Mary *et al.*, 1997). Hsc70 ist nachweislich sowohl als ATPase am Auseinanderbau (DeLuca-Flaherty *et al.*, 1990; Ungewickell, 1985), als auch am Umbau von sich bildenden Clathrin-Hüllen (Honing *et al.*, 1994; Ungewickell, 1999) beteiligt. Alternativ dazu wäre aber auch denkbar, dass das an L gebundene $\gamma 2$ -Adaptin auch eine von Clathrin unabhängige Budding-Reaktion auslösen könnte. Untersuchungen der neuen Proteinfamilie der GGAs, welche eine homologe Region zur Ohr-Domäne der $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -Adaptine besitzen, sonst aber kaum Ähnlichkeiten mit den großen Adaptor-Molekülen aufweisen (Dell'Angelica

et al., 2000; Hirst *et al.*, 2000; Takatsu *et al.*, 2000), zeigten ein Clathrin-unabhängiges Vesikel-Budding vom TGN. Da soweit noch keine Interaktion zwischen $\gamma 2$ -Adaptin und Clathrin nachgewiesen werden konnte, scheint sich die Funktion von Adaptorproteinen, welche den Transport Clathrin-umhüllter Vesikel vermitteln (AP-1 und AP-2), zu unterscheiden. Es galt nun herauszufinden, ob das $\gamma 2$ -Adaptin trotz allem und eventuell alleine, oder mit Hilfe anderer zellulärer Faktoren die HBV-Budding-Reaktion unterstützt.

Es blieb also die funktionelle Rolle der L/ $\gamma 2$ -Interaktion in der HBV-Infektion ungeklärt, und sollte durch diese Arbeit untersucht werden. Die Darstellung in der Immunfluoreszenz bestätigte zunächst, dass es durch Koexpression beider interagierenden Partner L und $\gamma 2$ -Adaptin sowohl in COS7- als auch in HBV-replizierenden HUH7-Zellen zu einer Rekrutierung des $\gamma 2$ -Adaptins durch L an *cis*-Golgi-Strukturen kommt, an denen das HBV-Budding vermutet wird. Durch eine Studie in lebenden Zellen wurde dieses Rekrutierungsgeschehen in Echtzeit sichtbar gemacht („Live Cell Imaging“-Technik). Um das $\gamma 2$ -Adaptin *in vivo* verfolgen zu können, wurde es mit einem CFP-Tag (blau-fluoreszierendes Protein) versehen. Es zeigte sich in der Koimmunpräzipitation und in der Immunfluoreszenz, dass die 266 Aminosäure große CFP-Markierung weder die Interaktion mit dem L-Protein noch das Rekrutierungsverhalten von $\gamma 2$ -Adaptin beeinträchtigte. Es wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass die Markierung von Proteinen mit fluoreszierenden Tags eine gängige Methode ist, um Proteine in lebenden Zellen zu verfolgen (Hoffmann, 2006; Presley, 2005). Eine Beobachtung der Zellen im Abstand von fünf Minuten war ausreichend, um das Rekrutierungsgeschehen von $\gamma 2$ -Adaptin durch L beobachten zu können. Dabei konnten kleine Transportvesikel identifiziert werden, die im Zytosol entlang des Nukleus wanderten, um sich am Zielort, der *cis*-Golgi-Membran, wieder aufzulösen. Durch die Konstruktion und Charakterisierung einer N-terminal verkürzten $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutante ($\gamma 2_{\Delta 1-522}$) konnte gezeigt werden, dass die L/ $\gamma 2$ -Interaktion von der Ohr-Domäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig ist, denn durch weitere C-terminal verkürzte $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutanten ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$, $\gamma 2_{\Delta 627-785}$), denen diese Ohr-Domäne fehlt, konnte weder *in vivo* noch *in vitro* eine Interaktion nachgewiesen werden.

In Anbetracht der Vielseitigkeit ihrer einzelnen Domänen sind große Adaptormoleküle dafür bekannt, mit mehreren Proteinpartnern interagieren zu können, um Adaptor-spezifische Protein-Netzwerke aufzubauen (Boehm and Bonifacino, 2001; Robinson, 2004). Dementsprechend war es nicht verwunderlich, dass im Rahmen dieser Arbeit bereits ein erster Hinweis dafür gefunden wurde, dass das $\gamma 2$ -Adaptin nicht nur in der Lage ist, mit der viralen Hülle, sondern ebenfalls mit dem Nukleokapsid zu interagieren, um beide Strukturen an der HBV-Assembly-Plattform miteinander zu verknüpfen. Durch eine Immunfluoreszenzanalyse in HBV-

replizierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass es neben der Rekrutierung des kotransfizierten $\gamma 2$ -Adaptins durch das L-Protein auch zu einer Kolo-kalisation des viralen Coreproteins mit $\gamma 2$ -Adaptin an *cis*-Golgi-Membranen kommt. In einer weiteren Studie konnte eine direkte $\gamma 2$ /Core-Interaktion durch Koimmunpräzipitation im Kontext HBV-replizierender Zellen bes-tätigt und näher charakterisiert werden (Rost *et al.*, 2006). Dabei zeigte sich zum einen, dass die $\gamma 2$ /Core-Interaktion direkt zu erfolgen scheint und nicht indirekt durch das HBV-L-Protein vermittelt wird. Zum anderen konnte mit Hilfe von $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutanten nachge-wiesen werden, dass im Gegensatz zur $\gamma 2$ /L-Interaktion, die Kopfregion von $\gamma 2$ -Adaptin für die $\gamma 2$ /Core-Interaktion essentiell zu sein scheint. Folglich interagieren sowohl das Corepro-tein, als auch die virale Hülle mit demselben Adaptorprotein, wobei die $\gamma 2$ /Core-Interaktion durch die Kopfregion des $\gamma 2$ -Adaptins initiiert wird, und die $\gamma 2$ -Adaptin-Ohrdomäne die Bin-dung mit L vermittelt.

Um die Frage zu klären, ob $\gamma 2$ -Adaptin ein vitaler Sprossungs- und Freisetzungsfaktor von HBV ist, das die Knospung und somit die Evasion von HBV initiiert und steuert, wurde in dieser Arbeit versucht, das $\gamma 2$ -Adaptin gezielt durch den Einsatz verschiedener siRNAs aus-zuschalten. Diese Technik der gezielten Expressionsregulierung (Tuschl *et al.*, 2001) wird bereits sowohl in der angewandten Medizin (Corydon und Mikkelsen, 2006; Cejka *et al.*, 2006) als auch in der Grundlagenforschung in den verschiedensten Bereichen eingesetzt (Wu und Nandamuri, 2004; Cejka *et al.*, 2006), da sie eine einfache, schnelle und kostengünstige Alternative gegenüber der bisher bekannten Gen-Inaktivierung in der Knockout-Maus bietet (Kuhn *et al.*, 2007).

Durch *in vivo*-Transkription von stabiler siRNA in der Zelle mit dem pSuper-Vektor (Brum-melkamp *et al.*, 2002) wurden vier ausgewählte Targets korrespondierend zu den $\gamma 2$ -Adaptin-Nukleotidpositionen 159 (#1), 219 (#2), 851 (#3) und 1804 (#4) getestet. Es kam bei den pSuper- $\gamma 2$ -Adaptin-Silencing-Konstrukten #2 (219 nt) und #3 (851 nt) zu einer Expressions-senkung des ektopisch-koexprimierten $\gamma 2$ -Adaptins von bis zu 70%. Bei weiterer Untersu-chung zeigte die Vektor-basierte „Gene-Silencing“-Methode jedoch unspezifische Silencing-Effekte. So kam es in HBV-replizierenden Zellen zu einem Verlust an zellulärem HBV-S-, L- und Coreprotein. Dies könnte andeuten, dass die Reduktion der $\gamma 2$ -Adaptin-Expression in der Zelle bereits direkte Folgen auf die Synthese, die Stabilität und/oder die Halbwertszeit dieser viralen Proteine hätte, was sich nicht auf das Wirken von Adaptorproteinen zurückführen lässt, da diese sich an sekretorischen Transportprozessen beteiligen (Takatsu *et al.*, 1998; Le-win *et al.*, 1998).

Der im Folgenden diskutierte Einsatz von synthetisch-hergestellten siRNAs verdeutlicht, dass ein spezifisches Silencing von $\gamma 2$ -Adaptin keinen Einfluss auf die Synthese viraler Proteine zeigt. Hierzu wurden erneut fünf verschiedene Targets korrespondierend zu den $\gamma 2$ -Adaptin-Nukleotidpositionen 158 (#1), 359 (#2), 832 (#3), 2067 (#4) und 2068 (#5) auf Funktionalität überprüft. Durch den Einsatz der synthetisch-hergestellten siRNAs #4 und #5 konnte in der Tat eine spezifische und signifikante Reduktion der transienten $\gamma 2$ -Adaptin-Expression von bis zu 95% erreicht werden. Dabei ist hervorzuheben, dass ein Silencing-Erfolg von $\gamma 2$ -Adaptin durch sehr weit C-terminal gelegenen siRNAs (2067 nt und 2068 nt) erzielt wurde. Dies widerspricht den von Qiagen empfohlenen siRNA-Design-Richtlinien, welche vorschlagen, gezielt im mRNA-Bereich von 50-100 Nukleotide nach dem Startkodon nach passenden Sequenzen für die RNAi zu suchen. Das erfolgreiche Silencing des $\gamma 2$ -Adaptins dieser Arbeit zeigt, dass auch ein Target im mRNA-Bereich weit außerhalb der vorgeschlagenen Nukleotid-Positionen funktionieren kann. Es kann demnach eine Korrelation zwischen der Target-Position auf der mRNA und der Effektivität der siRNA ausgeschlossen werden. Diese Vermutung wird durch eine Studie der Firma Ambion unterstützt (Brown *et al.*, 2002). Mit dem Einsatz der synthetischen siRNAs #4 und #5 konnte hier ein unspezifisches Silencing des S-, L- und Coreproteins ausgeschlossen werden, was darauf hinweist, dass weder die Synthese, die Stabilität noch die Halbwertszeiten der viralen Hüllproteine und Kapsid-Strukturen von der Funktion des $\gamma 2$ -Adaptins abzuhängen scheinen. Dementsprechend blieb auch der Zusammenbau der Nukleokapside in den Zellen von dem spezifischen $\gamma 2$ -Adaptin-Silencing unbeeinträchtigt. Im Gegensatz dazu zeichnete sich durch eine Southern-Dot-Blot-Analyse viraler DNA ein deutlicher Einfluss der $\gamma 2$ -Adaptin-Reduktion auf die Freisetzung von Virionen ins Medium ab. Bei einem endogenen Silencing von $\gamma 2$ -Adaptin von fast 100% (#5) konnte die HBV-Freisetzung um ca. 80% reduziert werden. Dabei scheint die Stärke der Expressionssenkung von $\gamma 2$ -Adaptin mit der Reduktion der HBV-Freisetzung zu korrelieren, denn durch einen 70%-igen $\gamma 2$ -Adaptin-Silencing (#4) kam es nur zu einer Reduktion der HBV-Freisetzung von 60%.

Da man sich über die exakte physiologische Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin im unklaren ist, wurde über die Sekretionskompetenz $\gamma 2$ -Adaptin-defizienter Zellen ausgeschlossen, dass es sich bei der Blockierung der HBV-Freisetzung um eine generelle Sekretionsstörung der Zelle durch die Abwesenheit von $\gamma 2$ -Adaptin handeln könnte. Eine individuelle Expression des kleinen Hüllproteins (S) führt zu einem Zusammenbau von leeren subviralen Partikeln (Liu *et al.*, 1982), die an der post-ER/premedial-Golgi-Membranen knospen und die Zelle über den kon-

stitutiven Sekretionsweg verlassen (Huovila *et al.*, 1992). Die Analyse zur Sekretion des S-Proteins mit Hilfe des HBsAg-ELISAs zeigte zum einen, dass $\gamma 2$ -Adaptin keine Rolle beim konstitutiven Weg der Sekretion zu spielen scheint, und zum anderen, dass es nicht am Zusammenbau und an der Freisetzung von subviralen Partikeln beteiligt ist. Dementsprechend scheint der Mechanismus der Produktion von subviralen Partikeln andere zelluläre Faktoren zu benötigen als der der Virus-Produktion (Bruss, 2007). Da der Zusammenbau der Nukleokapside und die Reifung der Hüllproteine durch den Verlust von $\gamma 2$ -Adaptin unbeeinträchtigt blieb, ist dieses Adaptorprotein offensichtlich erst sehr spät am HBV-Zusammenbau beteiligt, was sich auf ein oder mehrere Schritte erstrecken könnte. Zum einen könnte $\gamma 2$ -Adaptin am intrazellulären Transport viraler Komponenten beteiligt sein, zum anderen an deren Verknüpfung und Konzentrierung am Ort des Buddings, um dort die Abschnürungsreaktion zu unterstützen. Auch wäre eine Steuerung der Ausschleusung des Virus aus der Zelle durch $\gamma 2$ -Adaptin denkbar.

Soweit zusammengefasst zeigen die Daten, dass sowohl die L/ $\gamma 2$ - als auch die $\gamma 2$ /Core-Interaktion eine, wenn auch voneinander unabhängige Rolle bei der Koordinierung des Virus-Zusammenbaus und bei der Steuerung der Freisetzung von HBV aus der Leberzelle zu haben scheinen. Demzufolge ist das $\gamma 2$ -Adaptin vermutlich in erster Linie für die Sortierung und Anbindung viraler Substrukturen verantwortlich. Durch die Nutzung dieses Adaptorproteins hat sich das HBV-Virus eine neue Strategie zu eigen gemacht, welche das Zusammentreffen und die Verbindung viraler Untereinheiten während des Zusammenbaus sichert.

Bezüglich der essentiellen, aber noch nicht abschließend verstandenen Rolle von $\gamma 2$ -Adaptin in den späten Schritten des HBV-Lebenszyklus, kam die Vermutung auf, dass eine ektopische Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin die Virus-Produktion eventuell steigern könnte. Entgegen dieser Erwartung konnte jedoch bei einem Überschuss an $\gamma 2$ -Adaptin nur noch 20% des koexprimierten HBV-L-Proteins nachgewiesen werden. Dieser Effekt erwies sich als leberspezifisch, da er in Nierenzellen nicht nachgewiesen werden konnte. Dies könnte auf die Zellspezifität des Hepatitis-B-Virus zurückzuführen sein, welche sich auf humane Hepatozyten beschränkt (Glebe und Urban, 2007). Zudem zeigte sich, dass die Menge des nachweisbaren, koexprimierten L-Proteins von der Konzentration der transfizierten, $\gamma 2$ -Gen tragenden Vektor-DNA abzuhängen scheint. Je mehr $\gamma 2$ -Vektor-DNA transfiziert wurde, desto weniger L-Protein konnte in den Zellen nachgewiesen werden. In HBV-replizierenden Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass es im Gegensatz zum Silencing des $\gamma 2$ -Adaptins bereits in der Zelle zu einer signifikanten Reduktion der Menge an Hüllproteinen (L, M und S) und an intrazellulären Nukleokapsiden (Coreprotein) kam und folglich bis zu 90% weniger Viren frei-

gesetzt wurden. Ein Vergleich der Überexpression verschiedener $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte zeigte, dass die C-terminal verkürzten Mutanten ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$) in ähnlicher Weise wirkten wie das $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypprotein und nur noch 40% ($\gamma 2_{\Delta 528-785}$) beziehungsweise 20% ($\gamma 2_{\Delta 627-785}$) der Viren freigesetzt wurden, während die N-terminal deletierte $\gamma 2$ -Adaptin-Mutante ($\gamma 2_{\Delta 1-522}$) keinen Einfluss auf die Virus-Produktion zeigte.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die bedeutende Rolle des $\gamma 2$ -Adaptins während der HBV-Morphogenese und weisen darauf hin, dass die Reifung der Virus-Partikel sehr empfindlich auf eine Veränderung der natürlichen $\gamma 2$ -Adaptin-Konzentration reagiert. Die wahrscheinlichste Interpretation der Überexpressions-Experimente ist die, dass ein Überschuss an $\gamma 2$ -Adaptin-Wildtypprotein dominant-negativ auf das endogene Pendant wirkt. Folglich könnte das überexprimierte $\gamma 2$ -Adaptin die HBV-Morphogenese behindern, indem es die korrekte Stöchiometrie der Interaktion zwischen $\gamma 2$ -Adaptin, Core und L oder weiteren Proteinen stört, die für diesen Prozess benötigt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits für andere zelluläre Faktoren gemacht werden, welche ebenso in späten Phasen der Retrovirusproduktion eingreifen. Zum Beispiel hängt der Budding-Mechanismus des HIV-1 vom zellulären Tsg101 (Tumor Susceptibility Gene 101) ab, was den Zusammenbau der VLPs (Virus Like Particles) kontrolliert und die vakuoläre Proteinsortierung (Vps) steuert (Garrus *et al.*, 2001). Auch hier greift eine Störung der nativen Tsg101-Konzentration, die entweder durch den Einsatz spezifischer siRNAs (Garrus *et al.*, 2001) oder durch Überexpression einer dominant-negativen Tsg101-Mutante (Demirov *et al.*, 2002; Goila-Gaur *et al.*, 2003) entstanden ist, entscheidend aber in unterschiedlicher Weise in den Budding-Prozess ein und verhindert die Virusfreisetzung in einer späten Phase der HIV-1-Morphogenese. Tsg101 ist eine Komponente des ESCRT-I-Komplexes (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), welche als Proteinkomplex in der Lage ist, den Transport von ubiquitiniertem Fracht zu endosomalen Membranen, wie zum Beispiel dem MVB (Multivesicular Body), zu steuern. Ubiquitin ist ein hoch konserviertes, 76-Aminosäure (8,5 kDa) großes Polypeptid, dem ursprünglich nur eine Rolle im Prozess der Degradierung von löslichen Proteinen durch das Proteasom zugesprochen wurde. Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose bekamen 2004 den Nobelpreis in Chemie für ihre bahnbrechenden Untersuchungen bezüglich der Aufklärung wie Ubiquitin-vermittelte Degradierung von regulatorischen Proteinen verschiedene zelluläre Funktionen kontrollieren kann (Ciechanover, 2005; Nobel-Vortrag). Weitere Untersuchungen ergaben, dass Ubiquitin kovalent an der zytoplasmatischen Seite von Membranproteinen gebunden werden kann (Hicke, 2001; Raiborg *et al.*, 2003), um diese Fracht für den Eintritt in luminale Vesikel des MVBs zu markieren (Reggiori und Pelham,

2001; Urbanowski und Piper, 2001). In Anlehnung an das MVB-Modell der Hefe (Abb. 47) wird die ubiquitinierte Fracht von einer Reihe von löslichen zytoplasmatischen Protein-Komplexen (ESCRT I-III) erkannt, von welchen man annimmt, dass diese für den Transport zu endosomalen Membranen verantwortlich sind. Der ESCRT-vermittelte Transport endet nach der Dissoziation des Komplexes durch eine AAA-ATPase (Vps4) mit einer Einstülpung in das MVB (Babst *et al.*, 1998). Der Einsatz dominant-negativer Vps4- (Sachse *et al.*, 2004) oder ESCRT-I-Mutanten (Raymond *et al.*, 1992; Rieder *et al.*, 1996) kann dabei zu einer Inhibition der Budding-Reaktion führen.

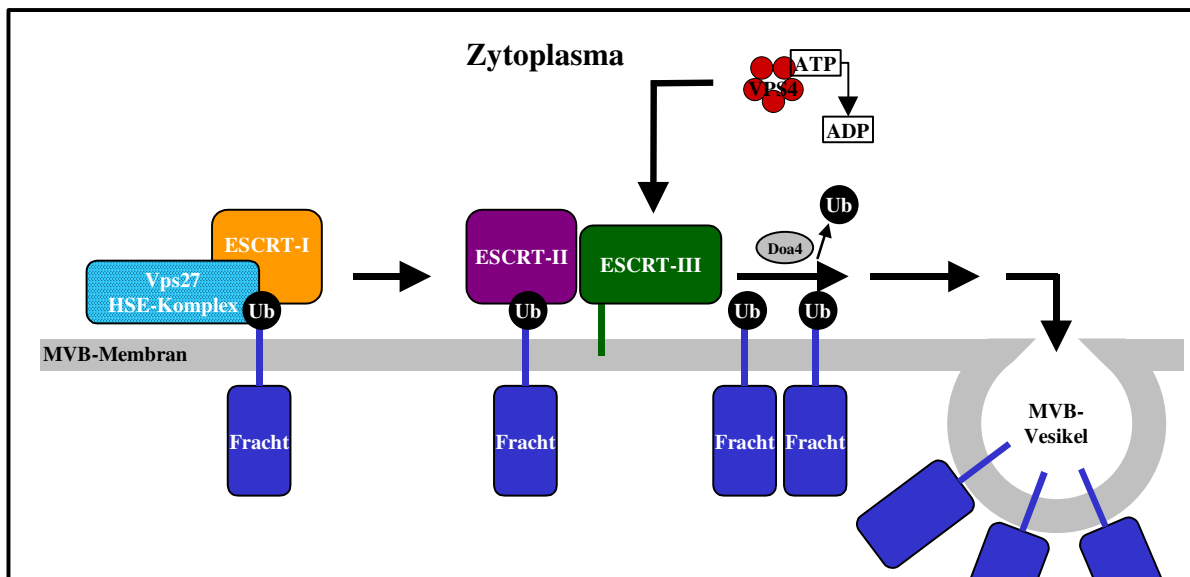


Abb. 47: Transport-Modell ubiquitiniertierter Membran-Proteine ins MVB der Hefe.

Der HSE-Komplex (Vps27) konzentriert ubiquitinierte Proteine an der MVB-Membran und rekrutiert ESCRT-I. Weitere ESCRT-Komplexe (ESCRT-II und III), die am Budding-Prozess der ubiquitinierten Fracht ins MVB beteiligt sind, werden zur MVB-Membran rekrutiert. Vor Abschnürung eines Vesikels ins Lumen des MVBs erfolgt zum einen eine Dissoziation des ESCRT-Komplexes von der Plasma-Membran durch die AAA-ATPase Vps4 und zum anderen eine Deubiquitinierung der Fracht durch eine Ubiquitin Thiolesterase Doa4 (Luhtala und Odorizzi, 2004). Abbildung modifiziert nach Garrus *et al.*, 2001.

Das Budding solcher Vesikel in das MVB zeigt große Ähnlichkeiten mit dem Budding von HIV-1 (Dong *et al.*, 2005; Garrus *et al.*, 2001) und anderen Viren (Puffer *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Bieniasz, 2006; Morita und Sundquist, 2004; Pelchen-Matthews *et al.*, 2004; Slagsvold *et al.*, 2006). Ein Modell der Ubiquitin-abhängigen Sprossung von HIV-1 an der Plasma-Membran ist in Abbildung 48 dargestellt.

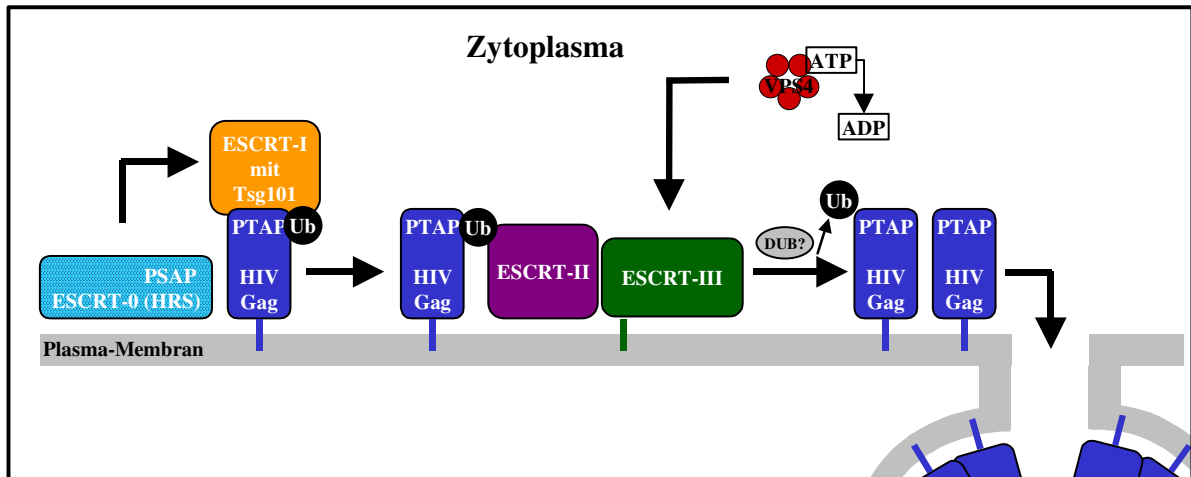


Abb. 48: Modell der Ubiquitin-abhängigen Sprossung von HIV-1 an der Plasma-Membran.

Der HRS-Komplex (ESCRT-0) konzentriert über sein PSAP-Motiv ubiquitinierte Proteine an der Plasma-Membran und rekrutiert ESCRT-I durch die PTAP-abhängige Interaktion mit Tsg101 (Katzmann *et al.*, 2003). Weitere ESCRT-Komplexe (ESCRT-II und III), die am Budding-Prozess von HIV-1 beteiligt sind werden zur Plasma-Membran rekrutiert. Vor Abschnürung des HIV-1 erfolgt zum einen eine Dissoziation des ESCRT-Komplexes von der Plasma-Membran durch die AAA-ATPase Vps4 und zum anderen eine Deubiquitinierung der Fracht durch das entsprechende Enzym (DUB). Abbildung modifiziert nach Garrus *et al.*, 2001.

Bei der HIV-1-Morphogenese führt der Tsg101-Verlust zu extrem vergrößerten spätendosomal, sogenannten Klasse-E-Kompartimenten, welche multiple Defekte der endosomalen Sortierungs-Maschinerie zeigen (Doyotte *et al.*, 2005). Die Morphologie solcher Klasse-E-Kompartimente, die ebenfalls in der Hefe durch Deletionsmutanten von ESCRT-I entstehen (Raymond *et al.*, 1992; Rieder *et al.*, 1996), lässt vermuten, dass ESCRT-Komplexe eine wichtige Rolle im endozytotischen Weg und bei der Einstülpung spielen. Auch der Nachweis, dass während der HIV-1-Morphogenese das Tsg101 an ein sogenanntes PTAP-L-Domänen-Motiv (Late Domain) des HIV-1 Gag-Proteins bindet (Garrus *et al.*, 2001; Martin-Serrano *et al.*, 2001; VerPlank *et al.*, 2001) und dass der Verlust von Tsg101 den Budding-Prozess von HIV-1 unterbindet (Garrus *et al.*, 2001), deutet darauf hin, dass Tsg101 unmittelbar an der Einstülpung beteiligt ist.

Ein erster Hinweis dieser Arbeit für die Beteiligung von endosomalen Kompartimenten und/oder des MVBs während der HBV-Morphogenese erbrachte der Einsatz von verschiedenen lysosomalen (NH₄Cl und CHL) und proteasomalen (MG132 und ALLN) Inhibitoren. Im Proteasom werden endogene, zytoplasmatische und auch entartete Proteine hochspezifisch erkannt und degradiert. Der Einsatz verschiedener Inhibitoren zeigte, dass das γ 2-Adaptin die Zelle vermutlich über den proteasomalen Weg verlässt, da es durch eine proteasomale Inhibition zu einer Anreicherung des γ 2-Adaptins in der Zelle kam, die in einer zytotoxischen Konzentration endete und zur Apoptose der Zelle führte. Im Lysosom dagegen werden in der Regel exogene Proteine durch lysosomale Proteasen unspezifisch abgebaut. Da der MVB-Weg

für die Sortierung von Frachtproteinen, die entweder für die lysosomale Degradation oder exosomale Sekretion in Richtung intraluminaler Vesikel bestimmt sind, verantwortlich ist, sind entsprechende Inhibitoren in der Lage, eine derartige Sortierung oder einen Abbau zu unterbinden. Es ist oft unklar, ob Proteine, die im Lysosom (L) enden, entweder über den „langen“ Transportweg zum Lysosom (TGN-EE-LE-L) oder direkt vom TGN über das späte Endosom zum Lysosom (TGN-LE-L) transportiert werden. Jedoch ist allen im Lysosom befindlichen Proteinen gemeinsam, dass sie einen vorgeschalteten Transportweg über endosomale Kompartimente beschriftet haben. Meine Versuche zeigten, dass das L-Protein sowohl bei individueller Expression, als auch im Kontext HBV-replizierender Zellen bei einer Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin entweder verstärkt über das Lysosom abgebaut wird oder in vorgeschalteten endosomalen Kompartimenten (zum Beispiel im MVB) festgehalten wird. Im Falle einer Arretierung, beziehungsweise einer Umverteilung des L- und Coreproteins von Golgi-Membranen hin zu spätendosomalen Klasse-E-Kompartimenten, hätte sich die Detektion beider Proteine (L und Core) in diesen nicht-löslichen Kompartimenten durch die in dieser Arbeit verwendeten Lysebedingungen entzogen.

Neuere Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten, dass endosomale Organellen (spätes Endosom und das MVB) in der Tat am HBV-Zusammenbau und -Budding beteiligt sind, da sowohl L/ $\gamma 2$ - als auch Core/ $\gamma 2$ -Komplexe an endosomalen Strukturen koloalisieren (Rost *et al.*, 2006). Die räumliche Nähe dieser beiden Komplexe zusammen mit der essentiellen Rolle von $\gamma 2$ -Adaptin in dieser späten Phase der Virusreplikation lässt vermuten, dass das $\gamma 2$ -Adaptin eine HBV-Assembly-Plattform an endosomalen Membranen aufbaut. Nicht nur durch die Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin, sondern auch durch den Einsatz von ESCRT-III- und Vps4-Mutanten, welche einen Defekt in der vakuolären Sortierung zeigen, wird das Core- und das L-Protein in Klasse-E-Kompartimente angereichert und eingeschlossen (Lambert *et al.*, *J Virol*, epub ahead of print). Demzufolge ist es denkbar, dass ein $\gamma 2$ -Adaptin-Überschuss die HBV-Produktion indirekt durch die Induktion dysfunktioneller endosomaler Kompartimente blockiert. Demgegenüber steht der durch siRNA-induzierte $\gamma 2$ -Adaptin-Verlust, der keinen Einfluss auf endosomale Strukturen zeigte (Rost *et al.*, 2006). Folglich scheinen verschiedene Mechanismen für die Effekte der $\gamma 2$ -Adaptin-Überexpression und des $\gamma 2$ -Adaptin-Verlustes auf die HBV-Produktion verantwortlich zu sein. Es wird vermutet, dass ein Überschuss an $\gamma 2$ -Adaptin (die C-terminal verkürzten $\gamma 2$ -Adaptin-Deletionsmutanten $\gamma 2_{\Delta 528-785}$ und $\gamma 2_{\Delta 627-785}$ eingeschlossen) als dominant-negativer Inhibitor in den MVB-Weg eingreift, jedoch in physiologischer Konzentration innerhalb dieses Transportweges arbeiten könnte. Diese Hypothese bedarf aber noch weiterer Untersuchungen. Ein zusätzlicher Hinweis, der diese Hypothese

unterstützt, ist die Entdeckung einer innerhalb der Adaptorprotein-Untereinheiten einzigartigen Ubiquitin-Bindungsaktivität des $\gamma 2$ -Adaptins (Rost *et al.*, 2006), ein Charakteristikum, welches bei ESCRT-Komponenten häufig anzutreffen ist (Slagsvold *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu benötigt das HBV-Assembly subviraler Partikel, welches durch das S-Protein an post-ER/pre-Golgi-Membranen gesteuert wird (Liu *et al.*, 1982; Huovila *et al.*, 1992), weder die Funktion des ESCRT-III, des Vps4 noch die Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin (Lambert *et al.*, *J Virol*, epub ahead of print). Demzufolge scheinen sich auch die Mechanismen der Produktion von subviralen und viralen HBV-Partikel bezüglich der Anforderungen an Zellfunktionen und Transportwegen deutlich voneinander zu unterscheiden. Entfernt vom Ort des subviralen Buddings könnte $\gamma 2$ -Adaptin ein hauptsächlicher Faktor in Bezug auf die Steuerung des HBV-Zusammenbaus sein, da es funktionell mit den viralen Schlüsselproteinen Core und L interagiert, aber das S-Protein nicht erkennt. Eine leitende Rolle des $\gamma 2$ -Adaptins während der HBV-Morphogenese würde mit den bekannten Funktionen von Adaptor-Protein-Komplex-Untereinheiten im Einklang stehen, die ihre spezifischen Frachtproteine zu Membran-Kompartimenten sortieren (Boehm und Bonifacino, 2001). Wie bereits diskutiert, konnten intensive Forschungen der letzten Jahre vermehrt zeigen, dass umhüllte RNA-Viren, wie zum Beispiel Retro-, Rhabdo- und Flavoviren, ebenfalls den MVB-Weg nutzen, um aus ihrer Wirtszelle zu knospen (Bieniasz, 2006; Morita und Sundquist, 2004; Pelchen-Matthews *et al.*, 2004; Slagsvold *et al.*, 2006). Die Gag- und Matrixproteine dieser Viren benutzen MVB-Sortierungsfaktoren, wie zum Beispiel Tsg101 oder Nedd4 (mögliche Untereinheiten des ESCRT-I-Komplexes), die über ihre PTAP- oder PPXY-Domäne (L-Domänen) mit Ubiquitin interagieren. Das Budding von PPXY-Motiv tragenden RNA-Viren benötigt in erster Linie die Funktion der Ubiquitin-Ligase Nedd4 (Martin-Serrano *et al.*, 2005; Segura-Morales *et al.*, 2005). Neueste Untersuchungen zeigten, dass die HBV-Morphogenese ebenfalls von der Interaktion mit Nedd4 abzuhängen scheint (Rost *et al.*, 2006). Demnach interagiert das HBV-Coreprotein über ein L-domänen-ähnliches Motiv (PPAY) mit Nedd4.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie Ergebnisse der hierauf aufgebauten und weitergeführten Untersuchungen zeigten, dass die HBV-Reifung und -Freisetzung von späten Phasen des MVB-Wegs abzuhängen scheinen und identifizieren $\gamma 2$ -Adaptin als einen mutmaßlichen Kofaktor der MVB-vermittelten Virus-Knospong. Dementsprechend zeigt die HBV-Biogenese signifikante Ähnlichkeiten mit dem Budding-Prozess umhüllter RNA-Viren (Dong *et al.*, 2005; Puffer *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Bieniasz, 2006; Morita und Sundquist, 2004; Pelchen-Matthews *et al.*, 2004; Slagsvold *et al.*, 2006). Dies zeigt, dass verschiedene Virus-Familien durch die Nutzung verschiedener Faktoren der endosomalen Sortierungs-

Maschinerie die Zelle auf analogen Wegen verlassen können. Trotz ihrer verschiedenen Angriffspunkte am MVB scheinen alle L-Domänen umhüllter RNA-Viren unter der Kontrolle von ESCRT-III und Vps4 zu stehen, welche in der finalen Vesikel-Bildung ihre Funktion finden (Langelier *et al.*, 2006).

Modell des HBV-Buddings an der Assembly-Plattform

Aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse zur HBV-Morphogenese lässt sich ein Modell zum Sortierungs- und Transportmechanismus viraler Substrukturen zur sogenannten Assembly-Plattform formulieren (Abb. 49), welches ein enges Wechselspiel zwischen HBV und der Wirtszelle voraussetzt. Es gibt erste Hinweise, dass das HBV-Budding über den sekretorischen oder anterograden (vorwärtsgerichteten) Transportweg verläuft. Dabei können Proteine vom ER über den Golgi-Komplex (inklusive *trans*-Golgi-Netzwerk) und über das frühe Endosom oder direkt über das späte Endosom oder dem MVB-Komplex, bis hin zum Lysosom transportiert werden. In Anlehnung an Immunfluoreszenz-Untersuchungen und biochemischen Studien (Hartmann-Stühler, und Prange, 2001; Lambert und Prange, 2001) werden die transmembranen HBV-Hüllproteine aus dem ER transportiert und über den sekretorischen Weg zumindest zu den *medial*-Golgi-Strukturen transportiert, was die Modifikation ihrer N-Glykane anzeigt (Patzner *et al.*, 1984). Während L an Golgi-ähnlichen Strukturen akkumuliert und mit seiner zytoplasmatisch orientierten präS-Domäne das γ 2-Adaptin über dessen Ohr-Domäne rekrutiert, reifen gleichzeitig die Nukleokapside im Zytoplasma und rekrutieren Nedd4 über ihr L-Domänen-ähnliches PPAY-Motiv (Rost *et al.*, 2006). Das Coreprotein bindet seinerseits an die Kopfreion von γ 2-Adaptin und scheint über einen noch unbekannten Ubiquitin-Link mit dem L/ γ 2-Komplex verknüpft zu werden (Rost *et al.*, 2006). Dieser HBV-Assembly-Komplex könnte entweder durch das γ 2-Adaptin selbst oder durch den Ubiquitin-Link an das MVB geleitet werden. Ein vergleichbarer Transport ist bei GGA-Ubiquitin-Rezeptoren zu finden, die ubiquitinierte Membranproteine vom TGN zum MVB transportieren (Puertollano und Bonifacino, 2004; Scott *et al.*, 2004). Alternativ könnte aber auch Nedd4 die Verbindung des Assembly-Komplexes mit dem MBV initiieren, wie es bereits kürzlich durch die Interaktion von Nedd4 und Tsg101 bei der HIV-1-Morphogenese gezeigt wurde (Medina *et al.*, 2005). In diesem Modell würden Virionen in das MVB sprossen und die Zelle über den exosomalen Weg verlassen, wie es bereits für HIV-1 in infizierten Makrophagen beschrieben wurde (Pelchen-Matthews *et al.*, 2003). Eine AAA-ATPase (Vps4) scheint den ESCRT-Komplex vor dem finalen Budding zu dissoziieren.

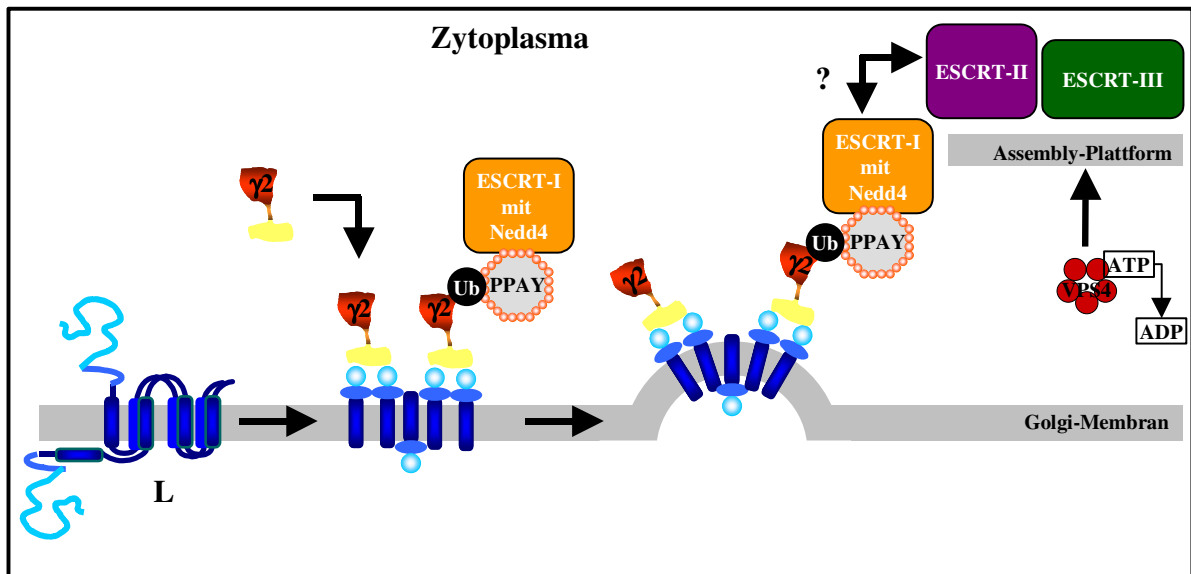


Abb. 49: Modell der Ubiquitin-abhängigen Sprossung von HBV an der Assembly-Plattform.

Das HBV-L-Protein (L) konzentriert sich an der Golgi-Membran und rekrutiert $\gamma 2$ -Adaptin mit seiner zytosolischen präS1-Domäne. Nukleokapside im Zytoplasma rekrutieren Nedd4 (Komponente des ESCRT-I) über ihr PPAY-Motif. Das Coreprotein bindet seinerseits an $\gamma 2$ -Adaptin und scheint über einen Ubiquitin-Link mit dem L/ $\gamma 2$ -Komplex verknüpft zu werden. Dieser HBV-Assembly-Komplex könnte an das MVB (ESCRT-II und III) geleitet werden. Die Dissoziation des ESCRT-Komplexes von der Buddings-Reaktion scheint durch die AAA-ATPase Vps4 zu erfolgen.

Jedoch könnte es ebenso möglich sein, dass der MVB-Komplex selbst durch $\gamma 2$ -Adaptin und/oder Nedd4 zur Assembly-Plattform rekrutiert wird, um dort die Abschnürungs-Reaktion viraler Partikel ins Lumen von Kompartimenten zu steuern, die für einen anschließenden vesikulären Transport aus der Zelle sorgen. Der genaue Mechanismus der HBV-Freisetzung bleibt folglich noch zu klären und bedarf weiterer Forschung.

VI. Zusammenfassung

Mit etwa 350 Millionen chronisch-infizierten Menschen gehört die Hepatitis-B neben der Tuberkulose und AIDS zu den häufigsten Infektionskrankheiten der Welt. Der einzig sichere Schutz vor dem bis zur Leberzirrhose persistierenden Virus bietet eine vorbeugende Impfung. Eine angemessene Therapie chronisch-erkrankter Patienten ist durch die Unkenntnis über viele Bereiche des HBV-Lebenszyklus nur eingeschränkt möglich. Gegenstand dieser Arbeit war vor allem etwas Licht in das Wechselspiel zwischen HBV und der Wirtszelle zu bringen und zelluläre Komponenten und Mechanismen zu identifizieren, die am Sortierungs- und Transportmechanismus viraler Substrukturen zur sogenannten Assembly-Plattform beteiligt sind, um dort die Freisetzung des Virus zu initiieren. Mit der vorliegenden Arbeit habe ich Methoden der Zellbiologie, Mikrobiologie, Molekularbiologie und Virologie vereint, um neue Einblicke in den HBV-Lebenszyklus zu gewinnen.

Für die Ausschleusung von HBV wird seither der konstitutive Weg der Sekretion angenommen. In Anlehnung an den Mechanismus umhüllter RNA-Viren kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das MVB (Multivesicular Body) im Prozess der HBV-Freisetzung beteiligt sein könnte. Die Freisetzung des Hepatitis-B-Virus aus einer infizierten Zelle ist ein streng organisierter Prozess, der sowohl das HBV-Coreprotein als auch die HBV-Hüllproteine zu benötigen scheint.

Ausgangspunkt der Arbeit war eine spezifische Interaktion des großen HBV-Hüllproteins (L) mit einem neuen Mitglied der Adaptor-Protein-Komplex-Familie (AP-Komplex), dem $\gamma 2$ -Adaptin (Hartmann-Stühler und Prange, 2001), das mutmaßlich an endosomalen Sortierungs- und Transportprozessen beteiligt ist. In Analogie zur Funktionsweise von Adaptin-Molekülen wurde vom $\gamma 2$ -Adaptin eine Rolle in der Initiation und Steuerung der Sprossung und Freisetzung von HBV vermutet.

Die im Rahmen dieser Arbeit erweiterte Charakterisierung der $\gamma 2$ /L-Interaktion zeigte zum einen, dass die Ohrdomäne des Adaptins für die Interaktion essentiell ist und zum anderen, dass die Rekrutierung des Adaptins durch das L-Protein zu *cis*-Golgi-Strukturen innerhalb kleiner Transportvesikel entlang des Nukleus (perinukleär) erfolgt. Erste Ergebnisse dieser Arbeit deuteten bereits an, dass das virale Coreprotein mit demselben Adaptorprotein zu interagieren vermag. Für die $\gamma 2$ /Core-Interaktion erwies sich in Folgearbeiten die Kopfregion des $\gamma 2$ -Adaptins als die entscheidende Bindungsdomäne (Rost *et al.*, 2006). Sowohl eine funktionelle Inaktivierung des $\gamma 2$ -Adaptins durch RNA-Interferenz als auch eine $\gamma 2$ -Adaptin-Überexpression störten die Virusmontage in späten Phasen der Morphogenese. Während ein

γ 2-Adaptin-Überschuss die HBV-Produktion indirekt durch die Induktion dysfunktioneller endosomaler Kompartimente blockierte, verhinderte der siRNA-induzierte γ 2-Adaptin-Verlust die späte Ausschleusung des Virus aus der Zelle. Das Silencing von γ 2-Adaptin zeigte dabei weder einen Einfluss auf endosomale Strukturen noch auf die Freisetzung subviraler Partikel (Viren ohne Genom). Demzufolge scheinen sich die Mechanismen der Produktion von subviralen und viralen HBV-Partikeln bezüglich ihrer Anforderungen an Zellfunktionen und Transportwegen deutlich voneinander zu unterscheiden. Es konnten erste Hinweise darauf gefunden werden, dass die Virusmontage an endosomalen Kompartimenten (zum Beispiel dem MVB) erfolgen könnte, was durch bereits weitergeführte Untersuchungen bestätigt werden konnte (Lambert *et al.*, *J Virol*, epub ahead of print). Darüber hinaus ist inzwischen bekannt, dass das Hepatitis-B-Virus für den Zusammenbau und die Freisetzung nicht nur das Adaptor-verwandte γ 2-Adaptin, sondern auch die endosomale Ubiquitin Ligase Nedd4, wahrscheinlich in Zusammenhang mit Ubiquitin selbst (Rost *et al.*, 2006), benötigt. Eine Untersuchung dieser weiterführenden Aspekte war jedoch nicht mehr Inhalt dieser Arbeit.

Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass die Sortierung und der Transport der Substrukturen des Hepatitis-B-Virus durch den MVB-Komplex zu erfolgen scheint. Dabei könnte das γ 2-Adaptin mit Hilfe einer Reihe von Kofaktoren (wie zum Beispiel Nedd4, Ubiquitin, etc.) eine entscheidende Rolle an der Sortierung und Anbindung des viralen L- und Coreproteins an die Assembly-Plattform spielen. Doch der genaue Mechanismus, welcher große Ähnlichkeit mit dem umhüllter RNA-Viren (wie zum Beispiel HIV-1) aufweist, bleibt noch ungeklärt. Ob weitere zelluläre Kofaktoren an der HBV-Sprossung und Freisetzung beteiligt sind, bleibt ebenfalls unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

VII. Literaturverzeichnis

- Albin C and Robinson WS (1980). Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol* **34**(1), 297-302.
- Anderson RGW, Brown MS and Goldstein JL (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* **10**(3), 351-364.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1994). "Current Protocols In Molecular Biology." (V. B. Chanda, Ed.). 4 vols. John Wiley & Sons.
- Babst M, Wendland B, Estepa EJ and Emr SD (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* **7**(11), 2982-2993.
- Bartenschlager R and Schaller H (1988). The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *Embo J* **7**(13), 4185-4192.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC and Chien CS (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**(8256), 1129-1133.
- Berting A., Hahnen J, Kroger M and Gerlich WH (1995). Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* **38**(1-2), 8-15.
- Bieniasz PD (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**(1), 55-63. Review.
- Bishop N, Horman A and Woodman P (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal proteinubiquitin conjugates. *J Cell Biol* **157**: 91-101.
- Boehm M and Bonifacino JS (2001). Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**, 2907-2920.
- Boman AL, Zhang C, Zhu X and Kahn RA (2000). A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol Biol Cell* **11**(4), 1241-1255.
- Bonifacino JS and Glick BS (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**(2), 153-166.
- Breiner KM and Schaller H (2000). Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection. *J Virol* **74**(5), 2203-2209.
- Brown D, Jarvis R, Pallotta V, Byrom M and Ford L (2002). RNA interference in mammalian cell culture: design, execution, and analysis of the siRNA effect. *Ambion TechNotes* **9**(1): 3-5.
- Brummelkamp TR, Bernards R and Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**(5567), 550-553.
- Bunetto MR, Oliveri F, Rocca G, Criscuolo D, Chiaberge E, Capalbo M, David E, Verme G and Bonino F (1989). Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology* **10**(2), 198-202.
- Bruss V (1997). A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol* **71**(12), 9350-9357.
- Bruss V (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* **13**(1), 65-73. Review.
- Bruss V and Ganem D (1991a). Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol* **65**(7), 3813-3820.

- Bruss V and Ganem D (1991b). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(3), 1059-1063.
- Bruss V, Lu X, Thomssen R and Gerlich WH (1994). Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *Embo J* **13**(10), 2273-2279.
- Bruss V and Vieluf K (1995). Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* **69**(11), 6652-6657.
- Casemann WH, Meyer M, Kekule AS, Lauer U, Hofschneider PH and Koshy R (1990). A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(8), 2970-2974.
- Cejka D, Losert D and Wacheck V (2006). Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond)* **110**(1), 47-58. Review.
- Chang SF, Netter HJ, Bruns M, Schneider R, Frolich K and Will H (1999). A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* **262**(1), 39-54.
- Chavrier P and Goud B (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**(4), 466-475. Review.
- Chen C, Vincent O, Jin J, Weisz OA and Montelaro RC (2005). Functions of early (AP-2) and late (AIP1/ALIX) endocytic proteins in equine infectious anemia virus budding. *J Biol Chem* **280**, 40474-40480.
- Ciechanover A (2005). Intrazellulärer Proteinabbau: von einer ungenauen Vorstellung vom Lysosom und Ubiquitin-Proteasom-System bis hin zu menschlichen Krankheiten und zum Wirkstoff-Targeting (Nobel-Vortrag). *Wiley-VCH Verlag Gmb & Co. KGaA*, Weinheim.
- Corydon TJ and Mikkelsen JG (2006). RNA interference-towards individualized genetic medicine. *Ugeskr Laeger* **168**(50), 4401-4404. Review.
- Cosson P and Letourneur F (1997). Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol* **9**(4), 484-487.
- Courtois G, Baumhueter S and Crabtree GR (1988). Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(21), 7937-7941.
- Cowles CR, Odorizzi G, Payne GS and Emr SD (1997). The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**(1), 109-118.
- Dane DS., Cameron CH and Briggs M (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**(7649), 695-698.
- Dell'Angelica EC, Puertollano R, Mullins C, Aguilar RC, Vargas JD, Hartnell LM and Bonifacio JS (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* **149**(1), 81-94.
- DeLuca-Flaherty C, McKay DB, Parham P and Hill BL (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* **62**(5), 875-887.
- Demirov DG, Ono A, Orenstein JM and Freed EO (2002). Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(2), 955-960.
- Dong X, Li H, Derdowski A, Ding L, Burnett A, Chen X, Peters TR, Dermody TS, Woodruff E, Wang JJ and Spearman P (2005). AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**, 663-674.
- Doyotte A, Russell MR, Hopkins CR and Woodman PG (2005). Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci* **118**(Pt 14), 3003-3017.

- Dykxhoorn DM, Novina CD and Sharp PA (2003). Killing the Messenger: Short RNAs that Silence Gene Expression. *Nature Revs Mol Cell Biol* **4**, 457-467.
- Eble BE, Lingappa VR and Ganem D (1986). Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* **6**(5), 1454-1463.
- Eble BE, Lingappa VR and Ganem D (1990). The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by down-stream signal sequences. *J Virol* **64**(3), 1414-1419.
- Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR and Ganem D (1987). Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol* **7**(10), 3591-3601.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**(6836), 494-498.
- Fernholz D, Galle PR, Stemler M, Brunetto M, Bonino F and Will H (1993). Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* **194**(1), 137-148.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669), 806-811.
- Franco A, Paroli M, Testa U, Benvenuto R, Peschle C, Balsano F and Barnaba V (1992). Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J Exp Med* **175**, 1195-1205.
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P and Charnay P (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* **281**(5733), 646-650.
- Ganem D and Prince AM (2004). Mechanism of disease: Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med* **350**, 1118-1129.
- Garcia PD, Ou JH, Rutter WJ and Walter P (1988). Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* **106**(4), 1093-1104.
- Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszkowski DG and Sundquist WI (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**(1), 55-65.
- Gerelsaikhon T, Tavis JE and Bruss V (1996). Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol* **70**, 4269-4274.
- Gerlich WH and Robinson WS (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**(3), 801-809.
- Glebe D, Urban S (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* **13**(1), 22-38. Review.
- Goila-Gaur R, Demirov DG, Orenstein JM, Ono A and Freed EO (2003). Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J Virol* **77**(11), 6507-6519.
- Grethe S, Heckel JO, Rietschel W and Hufert FT (2000). Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol* **74**(11), 5377-5381.
- Gruenberg J (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10), 721-730. Review.
- Hannon GJ (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.

- Hannon GJ (2003). RNAi: a guide to gene silencing, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.
- Hartmann-Stühler C and Prange R (2001). Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* **75**(11), 5343-5351.
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H and Gerlich WH (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* **52**(2), 396-402.
- Hicke L (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:195.
- Hicke L, Zanolari B, Pypaert M, Rohrer J and Riezman H (1997). Transport through the yeast endocytic pathway occurs through morphologically distinct compartments and requires an active secretory pathway and Sec18p/N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Mol Biol Cell* **8**(1), 13-31.
- Hildt E, Saher G, Bruss V and Hofschneider PH (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* **225**(1), 235-239.
- Hildt E, Urban S and Hofschneider PH, (1995). Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene* **11**(10), 2055-2066.
- Hirschman SZ and Garfinkel E (1980). Infection of human cells in culture with hepatitis B virus. *Trans Assoc Am Physicians* **93**, 60-71.
- Hirst J, Lui WW, Bright NA, Totty N, Seaman MN and Robinson MS (2000). A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **149**(1), 67-80.
- Hirst J, Motley A, Harasaki K, Peak, Chew SY and Robinson MS (2003). EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell* **14**(2), 625-641.
- Hirst J and Robinson MS (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* **1404**(1-2), 173-193.
- Hobman TC, Zhao B, Chan H and Farquhar MG (1998). Immunolocalization and characterization of a subdomain of the endoplasmic reticulum that concentrates proteins involved in COPII vesicle biogenesis. *Mol Biol Cell* **9**(6), 1265-1278.
- Hoffman RM (2006). Real-time subcellular imaging in live animals: new visible targets for cancer drug discovery. *IDrugs* **9**(9), 632-635. Review.
- Hu J and Seeger C (1996). Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(3), 1060-1064.
- Hu J, Toft DO and Seeger C (1997). Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *Embo J* **16**(1), 59-68.
- Hu J, Flores D, Toft D, Wang X and Nguyen D (2004). Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function. *J Virol* **78**(23), 13122-13131.
- Huovila AP, Eder AM and Fuller SD (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol* **118**(6), 1305-1320.
- Israel N, Chenciner N, Houlmann C and Streeck RE (1989). An expression vector for high-level protein synthesis in Vero cells. *Gene* **81**(2), 369-372.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R and Schaller H (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *Embo J* **9**(10), 3389-3396.
- Kalthoff C, Groos S, Kohl R, Mahrhold S and Ungewickell EJ (2002). Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi. *Mol Biol Cell* **13**(11), 4060-4073.
- Kann M, Bischof A and Gerlich WH (1997). In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* **71**(2), 1310-1316.

- Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH. and Robinson WS (1973). DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* **12**, 995.
- Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M and Emr SD (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* **162**: 413-423.
- Kau JH and Ting LP (1998). Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* **72**(5), 3796-3803.
- Kim HS, Ryu CJ. and Hong HJ (1997). Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol* **78**(Pt 5), 1083-1086.
- Kim CY and Tilles JG (1973). Purification and biophysical characterization of hepatitis B antigen. *J Clin Invest* **52**(5), 1176-1186.
- Kirchhausen T (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 705-732.
- Kirchhausen T (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727.
- Kirchhausen T, Pines J, Toldo L and Lafont F (1997). Membranes and sorting. Membrane permeability. *Curr Opin Cell Biol* **9**(4), 473.
- Klumperman J (2000). Transport between ER and Golgi. *Curr Opin Cell Biol* **12**(4), 445-9. Review.
- Kock J and Schlicht HJ (1993). Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol* **67**(8), 4867-4874.
- Kuhn R, Streif S and Wurst W (2007). RNA interference in mice. *Handb Exp Pharmacol* **178**, 149-176. Review.
- Lambert C and Prange R (2001). Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem* **276**(25), 22265-22272.
- Lambert C and Prange R (2003). Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(9), 5199-5204.
- Lambert C and Prange R (2004). Development and characterization of a 293 cell line with regulatable expression of the hepatitis B virus large envelope protein. *J Virol Methods* **121**(2), 181-190.
- Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB 3rd and Rico-Hesse R (1998). Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(10), 5757-5761.
- Langelier C, von Schwedler UK, Fisher RD, De Domenico I, White PL, Hill CP, Kaplan J, Ward D and Sundquist WI (2006). Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J Virol* **80**(19), 9465-9480.
- Lee DH and Goldberg AL (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology* (Vol. **8**).
- Lewin DA, Sheff D, Ooi CE, Whitney JA, Yamamoto E, Chicione LM, Webster P, Bonifacino JS and Mellman I (1998). Cloning, expression and localization of a novel gamma-adaptin-like. *FEBS Lett* **435**(2-3), 263-268.
- Li LD, Gu X., Newbold JE (1998). Comparison of the DNA sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck Hepatitis B Virus. *The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses San Diego (USA)*.
- Liu CC, Yansura D and Levinson A (1982). Direct expression of hepatitis B surface antigen in monkey cells from an SV40 vector. *DNA* **1**:213-221.
- Lo WY and Ting LP (1994). Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome. *J Virol* **68**(3), 1758-1764.

- Löffler-Mary H, Dumortier J, Klentsch-Zimmer C and 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.
- Löffler-Mary H, Werr M and Prange R (1997). Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* **235**(1), 144-152.
- Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ and Siddiqui A (1990). Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(13), 5069-5073.
- Luhtala N and Odorizzi G (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol* **166**(5), 717-729.
- Machida A, Ohnuma H, Tsuda F, Yoshikawa A, Hoshi Y, Tanaka T, Kishimoto S, Akahane Y, Miyakawa Y and Mayumi M (1991). Phosphorylation in the carboxyl-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody. *J Virol* **65**(11), 6024-6030.
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH and Robinson WS (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**(5), 2941-2945.
- Martin-Serrano J, Eastman SW, Chung W and Bieniasz PD (2005). HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* **168**(1), 89-101.
- Martin-Serrano J, Zang T and Bieniasz PD (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**: 1313-1319.
- Mason WS, Seal G and Summers J (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* **36**(3), 829-836.
- Maxfield FR and McGraw TE (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(2), 121-132. Review.
- McManus MT and Sharp PA (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**, 737-747.
- Medina G, Zhang Y, Tang Y, Gottwein E, Vana ML, Bouamr F, Leis J and Carter CA (2005). The functionally exchangeable L domains in RSV and HIV-1 Gag direct particle release through pathways linked by Tsg101. *Traffic* **6**(10), 880-894.
- Mehdi H, Yang X and Peebles ME (1996). An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently. *Virology* **217**(1), 58-66.
- Meister G and Tuschl T (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**(7006), 343-349.
- Meyer C, Zizioli D, Lausmann S, Eskelinen EL, Hamann J, Saftig P, von Figura K and Schu P (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* **19**(10), 2193-2203.
- Millich DR, Hughes JL, McLachlan A, Langley KE, Thornton GB and Jones JE (1990). Importance of subtype in the immune response to the pre-S(2) region of the hepatitis B surface antigen. I. T cell fine specificity. *J Immunol* **144**(9), 3535-43.
- Mills IG, Praefcke GJ, Vallis Y, Peter BJ, Olesen LE, Gallop JL, Butler PJ, Evans PR and McMahon HT (2003). EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol* **160**(2), 213-222.
- Morita E and Sundquist WI (2004). Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:395-425. Review.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A and Chandu D (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci Mar* **31**(1), 137-155.

- Nassal M and Schaller H (1996). Hepatitis B virus replication--an update. *J Viral Hepat* **3**(5), 217-226.
- Neurath AR, Kent SB, Strick N and Parker K (1986). Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* **46**(3), 429-436.
- Neurath AR, Kent SB, Strick N, Taylor P and Steavens CE (1985). Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. *Nature* **315**(6015), 154-156.
- Nichols BJ and Lippincott-Schwartz J (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**(10), 406-412. Review.
- Nogi T, Shiba Y, Kawasaki M, Shiba T, Matsugaki N, Igarashi N, Suzuki M, Kato R, Takatsu H, Nakayama K and Wakatsuki S (2002). Structural basis for the accessory protein recruitment by the gamma-adaptin ear domain. *Nat Struct Biol* **9**(7), 527-531.
- Norder H, Ebert JW, Fields HA, Mushahwar IK and Magnius LO (1996). Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* **218**(1), 214-223.
- Ostapchuk P, Hearing P and Ganem D (1994). A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *Embo J* **13**(5), 1048-1057.
- Ou JH, Laub O and Rutter WJ (1986). Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(6), 1578-1582.
- Palade G (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**(4200), 347-358.
- Patzer EJ, Nakamura GR and Yaffe A (1984). Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J Virol* **51**(2), 346-353.
- Payne RJH, Nowak MA and Blumberg BS (1996). The dynamics of hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6542-6546.
- Pearse BMF (1975). Coated vesicles from big rain: Purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* **97**, 93-98.
- Pearse BMF (1976). Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 1255-1259.
- Pelchen-Matthews A, Kramer B and Marsh M (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**(3), 443-455.
- Pelchen-Matthews A, Raposo G and Marsh M (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* **12**(7), 310-316. Review.
- Peterson DL (1981). Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen. *J Biol Chem* **256**, 6975-6983.
- Pishvae B and Payne GS (1998). Clathrin coats--threads laid bare. *Cell* **95**(4), 443-446.
- Poisson F, Severac A, Hourieux C, Goudeau A and Roingeard P (1997). Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* **228**(1), 115-120.
- Prange R, Clemen A and Streeck RE (1991). Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol* **65**(7), 3919-3923.
- Prange R, Nagel R and Streeck RE (1992). Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol* **66**(10), 5832-5841.
- Prange R and Streeck RE (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *Embo J* **14**(2), 247-256.
- Prescianotto-Baschong C and Riezman H (2002). Ordering of compartments in the yeast endocytic pathway. *Traffic* **3**(1), 37-49.
- Presley JF (2005). Imaging the secretory pathway: the past and future impact of live cell optical techniques. *Biochim Biophys Acta* **10**, 1744(3), 259-272. Review.

- Puertollano R and Bonifacino JS (2004). Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat. Cell Biol* **6**(3), 244-251.
- Puffer BA, Watkins SC and Montelaro RC (1998). Equine infectious anemia virus Gag polyprotein late domain specifically recruits cellular AP-2 adapter protein complexes during virion assembly. *J Virol* **72**, 10218-10221.
- Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, Sirma H, Hohenberg H, Chang SF, Frolich K, Krone O, Kaleta EF and Will H (2001). Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* **289**(1), 114-128.
- Radziwill G, Tucker W and Schaller H (1990). Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* **64**(2), 613-620.
- Raiborg C, Rusten TE and Stenmark H (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **15**:446.
- Raymond CK, Howald-Stevenson I, Vater CA and Stevens TH (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**:1389-1402.
- Reggiori F and Pelham HR (2001). Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J* **20**:5176.
- Rehling P, Darsow T, Katzmann DJ and Emr SD (1999). Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function. *Nat Cell Biol* **1**(6), 346-353.
- Rieder SE, Banta LM, Kohrer K, McCaffery JM. and Emr SD (1996). Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell* **7**: 985-999.
- Rigg RJ and Schaller H (1992). Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH. *J Virol* **66**(5), 2829-2836.
- Rober RA, Sauter H, Weber K and Osborn M (1990). Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *J Cell Sci* **95**(Pt 4), 587-598.
- Robinson MS (1987). Coated vesicles and protein sorting. *J Cell Sci* **87**(Pt 2), 203-204. Review.
- Robinson MS (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**, 167-174.
- Robinson WS, Clayton DA and Greenman RL (1974). DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* **14**(2), 384-391.
- Robinson WS (1977). The genome of hepatitis B virus. *Annu Rev Microbiol* **31**, 357-377.
- Roingeard P and Sureau C (1998). Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2-transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis. *Hepatology* **28**(4), 1128-1133.
- Rost M, Mann S, Lambert C, Doring T, Thome N and Prange R (2006). Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J Biol Chem* **281**(39), 29297-29308.
- Sachse M, Strous GJ and Klumperman J (2004). ATPase-deficient hVPS4 impairs formation of internal endosomal vesicles and stabilizes bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles. *J Cell Sci* **117**: 1699-1708.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). "Molecular Cloning, A Laboratory Manual." Second Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**(12), 5463-5467.
- Santantonio T, Jung MC, Schneider R, Fernholz D, Milella M, Monno L, Pastore G, Pape GR and Will H (1992). Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* **188**(2), 948-952.

- Schaller H and Fischer M (1991). Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **168**, 21-39.
- Schmid SL (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**, 511-548.
- Scott PM, Bilodeau PS, Zhdankina O, Winistorfer SC, Hauglund MJ, Allaman MM, Kearney WR, Robertson AD, Boman AL and Piper RC (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **6**(3), 252-259.
- Seeger C, Ganem D and Varmus HE (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* **232**(4749), 477-484.
- Segura-Morales C, Pescia C, Chatellard-Causse C, Sadoul R, Bertrand E and Basyuk E (2005). Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol Chem* **280**(29), 27004-27012.
- Shaul Y, Rutter WJ and Laub O (1985). A human hepatitis B viral enhancer element. *Embo J* **4**(2), 427-430.
- Shih P, Evans K, Schifferli K, Ciccarone V, Lichaa F, Masoud M, Lan J and Hawley-Nelson P (1997). High Transfection Efficiency of Cloned Cell Lines. *FOCUS* **19**, 52
- Singer B and Riezman H (1990). Detection of an intermediate compartment involved in transport of alpha-factor from the plasma membrane to the vacuole in yeast. *J Cell Biol* **110**(6), 1911-1922.
- Slagsvold T, Aasland R, Hirano S, Bache KG, Raiborg C, Trambaiolo D, Wakatsuki S and Stenmark H (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem* **280**(20), 19600-19606.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P and Rothman JE (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**(6418), 318-324.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Biotechnology* 1992; **24**, 122-139.
- Sprengel R, Kaleta EF and Will H (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* **62**(10), 3832-3839.
- Stamnes MA and Rothman JE (1993). The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* **73**(5), 999-1005.
- Stibbe W and Gerlich WH (1982). Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. *Virology* **123**(2), 436-442.
- Stirk HJ, Thornton JM and Howard CR (1992). A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* **33**(3), 148-158.
- Summers J and Mason WS (1982). Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* **29**(2), 403-415.
- Summers J, Smith PM and Horwich AL (1990). Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* **64**(6), 2819-2824.
- Summers J, Smolec JM and Snyder R (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**(9), 4533-4537.
- Takatsu H, Sakurai M, Shin HW, Murakami K and Nakayama K (1998). Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. *J Biol Chem* **273**(38), 24693-24700.
- Takatsu H, Yoshino K and Nakayama K (2000). Adaptor gamma ear homology domain conserved in gamma-adaptin and GGA proteins that interact with gamma-synergine. *Biochem Biophys Res Commun* **271**(3), 719-725.

- Testut P, Renard CA, Terradillos O, Vitvitski-Trepo L, Tekaia F, Degott C, Blake J, Boyer B and Buendia MA (1996). A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* **70**(7), 4210-4219.
- Tiollais P, Charnay P, Vyas GN (1981). Biology of hepatitis B virus. *Science* **213**(4506), 406-11.
- Tiollais P, Pourcel C and Dejean A (1985). The hepatitis B virus. *Nature* **317**(6037), 489-495.
- Toh H, Hayashida H and Miyata T (1983). Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature* **305**(5937), 827-829.
- Treichel U, Meyer zum Buschenfelde KH, Dienes HP and Gerken G (1997). Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* **142**(3), 493-498.
- Tur-Kaspa R, Burk RD, Shaul Y and Shafritz DA (1986). Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(6), 1627-1631.
- Tuschl T, Elbashir SM and Lendeckel W (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200.
- Tuttleman JS, Pourcel C and Summers J (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* **47**(3), 451-460.
- Ueda K, Tsurimoto T and Matsubara K (1991). Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol* **65**(7), 3521-3529.
- Ungewickell E (1999). Clathrin: a good view of a shapely leg. *Curr Biol* **9**(1), R32-35.
- Ungewickell E and Branton D (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature* **289**(5796), 420-422.
- Urbanowski JL and Piper RC (2001). Ubiquitin Sorts Proteins into the Intraluminal Degradative Compartment of the Late-Endosome/Vacuole. *Traffic* **2**:622.
- Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Gray P and Rutter WJ (1980). Animal virus genetics. *Acad Press Inc New York* **57**.
- Vaudin M, Wolstenholme AJ, Tsiquaye KN, Zuckerman AJ and Harrison TJ (1988). The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* **69**(Pt6), 1383-1389.
- VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B, Kikonyogo A, Leis J and Carter CA (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7724-7729.
- Vigers GP, Crowther RA and Pearse BM (1986). Three-dimensional structure of clathrin cages in ice. *EMBO J* **5**(3), 529-534.
- Wang MQ, Kim W, Gao G, Torrey TA, Morse HC, 3rd, De Camilli P and Goff SP (2003). Endophilins interact with Moloney murine leukemia virus Gag and modulate virion production. *J Biol* **3**(1), 4.
- Warren KS, Heeney JL, Swan RA, Heriyanto and Verschoor EJ (1999). A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* **73**(9), 7860-7865.
- Wasiak S, Legendre-Guillemain V, Puertollano R, Blondeau F, Girard M, de Heuvel E, Boismenu D, Bell AW, Bonifacino JS and McPherson PS (2002). Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol* **158**(5), 855-862.
- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, Cattaneo R and Schaller H (1987). Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* **61**(3), 904-911.
- Wu J and Nandamuri KM (2004). Inhibition of hepatitis viral replication by siRNA. *Expert Opin Biol Ther* **4**(10), 1649-1659. Review.

-
- Yee JK (1989). A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* **246**(4930), 658-661.
- Yeh CT, Liaw YF and Ou JH (1990). The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J Virol* **64**(12), 6141-6147.
- Yuh CH and Ting LP (1990). The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J Virol* **64**(9), 4281-4287.
- Zaremba S and Keen JH (1983). Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol* **97**, 1339-1347.
- Zizioli D, Meyer C, Guhde G, Saftig P, von Figura K and Schu P (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J Biol Chem* **274**(9), 5385-5390.
- Zoulim F, Saputelli J and Seeger C (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* **68**(3), 2026-2030.

VIII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc.	Accession
Ag	Antigen
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALLN	N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal
AP-Komplex	Adaptorprotein-Komplex
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
ccc	kovalent geschlossen zirkulär (covalently closed circular)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CFP	Blau (Cyano)-fluoreszierendes Protein
CHAPS	Taurinderivat der Cholsäure
CIP	Calf Intenstine Phosphatase
CMV	Cytomegalovirus
CTG-BOX	Verpackungssignal
CTP	Cytosintriphosphat
COP I+II	Coat Protein I+II
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-Protein	HBV-Coreprotein
DIG	Digoxigenin
HBV _{DM}	HBV-Doppelmutante (M- und S-defiziente Mutante)
HBV _{L-}	HBV-L-defiziente Mutante
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
DR	Sequenzwiederholung (Direct Repeat)
dsRNA	doppelsträngige RNA
ε	Verpackungssignal
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	frühes (Early) Endosom
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EIAV	Equine Infectious Anemia Virus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENH	Enhancer-Element
ENV	HBV-Hülle (Envelope)
e-präS	externe präS-Orientierung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GGA	Golgi-localized, γ -ear-containing, ADP ribosylation factor-binding
gp	einfach glykosyliertes Protein
ggp	zweifach glykosyliertes Protein
GRE	Glucocorticoid Responsive Element
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächenantigen (Hepatitis-B-surface-Antigen)
HBeAg	sekretorisches Core-Genprodukt (Hepatitis-B e-Antigen)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hMTIIa	humaner Metallothionin IIa Promotor
HNF	nukleärer Hepatozytenfaktor (Hepatocyte Nuclear Factor)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRPO	Meerettich (Horseradish) Peroxidase
Hsc	Hitzeschock-Protein (constitutive)
Hsp	Hitzeschock-Protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
i-präS	interne präS-Orientierung
kB	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KoIP	Koimmunpräzipitation
L	Lysosom
L-Domäne	Late Domain
LE	spätes (Late) Endosom
LMW	Low Molecular Weight
L-Protein	großes (Large) HBV-Hüllprotein
MCS	Multiple Cloning Site
Met	Aminosäure Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M-Protein	mittleres (Medium) HBV-Hüllprotein
MW	Molecular Weight
MEM	Minimal Essential Medium
MG132	N-CBZ-Leu-Leu-Leucinal
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MVB	Multivesicular Body
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaOH	Natriumhydroxid
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
Nedd4	Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4
NEM	N-Ethylmaleimid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet-40
NRE	Negative Regulating Element

nt	Nukleotid
OPD	Ortho-Phenyldiamindihydrochlorid
ORF	offener Leserahmen (Open Reading Frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
p	Plasmid
pgRNA	prägenomische RNA
PKC	Proteinkinase C
poly-A	Polyadenylierungssignal
POX	Peroxidase
P-Protein	HBV-Polymerase
präC	Vorstufe des HBV-Coreproteins
PRO	Promotor-Element
PTGS	Post-Transcriptional Gene Silencing
rcDNA	offen-ringförmige DNA (relaxed circular DNA)
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RISC*	aktivierter RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNaseH	Ribonuklease H
RNP	Ribonukleoproteinkomplex (=RISC)
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	short hairin RNA
siRNA	small interfering RNA
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
SP	Abstandshalter (Spacer)-Region
S-Protein	kleines (Small) HBV-Hüllprotein
SSC	Sodium Chloride/Sodium Citrate Puffer
SV40	Affen (Simian)-Virus 40
TBS	Tris-HCl-gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TE	Tris-EDTA
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TP	terminales Protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Trometamol)
t-RNA	transfer RNA
TSG101	Tumor Susceptibility Gene 101
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit
Ub	Ubiquitin
UTP	Uridintriphosphat
VLP	Virus Like Particle
VPS	vakuoläre Proteinsortierung
WB	Western-Blot
WHV	Waldmurmeltier Hepatitis-Virus (Woodchuck Hepatitis-Virus)
X-Protein	HBV-Transkriptionsaktivator
YFP	Gelb (Yellow)-fluoreszierendes Protein

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau des Dane-Partikels des Hepatitis-B-Virus.....	3
Abb. 2:	Die Genomorganisation des Hepatitis-B-Virus.....	4
Abb. 3:	Struktureller Aufbau der HBV-Hüllproteine.....	6
Abb. 4:	Die transmembrane Topologie der HBV-Hüllproteine in der ER-Membran.....	8
Abb. 5:	Schematische Darstellung des Infektions- und Replikationszyklus von HBV.....	10
Abb. 6:	Schematische Darstellung intrazellulärer Transportprozesse der Eucyte.....	13
Abb. 7:	Schematische Darstellung des Vesikeltransportes der Eucyte.	15
Abb. 8:	Schematische Darstellung des heterotetrameren AP-1-Komplexes.....	16
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Beteiligung von AP-Komplexen an intrazellulären Transportprozessen.	17
Abb. 10:	Primärstruktur-Vergleich zwischen humanem $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -Adaptin.....	18
Abb. 11:	Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus.....	21
Abb. 12:	pSuper-vermittelte RNAi - Schematische Darstellung der Prozessierung der siRNAs.....	23
Abb. 13:	Arbeitshypothese der Funktion von $\gamma 2$ -Adaptin bei der HBV-Freisetzung.....	25
Abb. 14:	Schematische Darstellung der Dot-Blot-Apparatur.....	54
Abb. 15:	Nachweis von endogenem $\gamma 2$ -Adaptin in eukaryontischen Zelllinien.....	58
Abb. 16:	Unterscheidung zwischen $\gamma 2$ - und $\gamma 1$ -Adaptin.....	59
Abb. 17:	Sequenzierung des Vektors pcDNA3-HA- $\gamma 2$	59
Abb. 18:	Etablierung eines HBV-Nachweises mit Southern-Dot-Blot.....	61
Abb. 19:	Kontrollen der Vektor-basierten RNAi.....	64
Abb. 20:	Kontrollen der siRNA-basierenden RNAi.....	65
Abb. 21:	Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins.....	66
Abb. 22:	Intrazelluläre Koloalokalisation von L und $\gamma 2$ -Adaptin.....	67
Abb. 23:	Schematische Darstellung der GFP-markierten Proteine.....	68
Abb. 24:	Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Autofluoreszenz.....	69
Abb. 25:	Charakterisierung der GFP-Konstrukte durch Koimmunpräzipitation.....	71
Abb. 26:	Rekrutierung von CFP- $\gamma 2$ in EcR-LHA-293-Zellen.....	72
Abb. 27:	„Live Cell Imaging“ der Rekrutierung von CFP- $\gamma 2$ in EcR-LHA-293-Zellen.....	73
Abb. 28:	Schematische Darstellung der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte.....	75
Abb. 29:	$\gamma 2$ /L-Interaktion von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig.....	76

Abb. 30: Rekrutierung des $\gamma 2$ -Adaptins von der Ohrdomäne des $\gamma 2$ -Adaptins abhängig.....	78
Abb. 31: Mögliche Interaktion des $\gamma 2$ -Adaptins mit dem HBV-Coreprotein.....	80
Abb. 32: Schematische Darstellung der siRNA-Positionen im $\gamma 2$ -Adaptin-Gen (Vektor-basiert).....	81
Abb. 33: Silencing des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in HuH7-Zellen.....	82
Abb. 34: Transkriptionsverstärkung des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in COS7-Zellen.....	83
Abb. 35: Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit pSuper in HBV-replizierenden Zellen.....	85
Abb. 36: Schematische Darstellung der siRNA-Positionen im $\gamma 2$ -Adaptin-Gen (synthetische siRNAs).....	86
Abb. 37: Silencing des transfizierten $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HuH7-Zellen.....	87
Abb. 38: Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HBV-replizierenden Zellen.....	88
Abb. 39: HBV-Freisetzung nach Silencing des endogenen $\gamma 2$ -Adaptins mit synthetisch-hergestellten siRNAs in HBV-replizierenden Zellen.....	89
Abb. 40: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin reduziert den intrazellulären L-Pool.....	91
Abb. 41: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Dosis-/Konzentrationsabhängigkeit.....	92
Abb. 42: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin zeigt Leberzell-spezifischen Effekt.....	93
Abb. 43: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin beeinflusst die HBV-Freisetzung.....	94
Abb. 44: HBV-Freisetzung nach Überexpression der $\gamma 2$ -Adaptin-Konstrukte in HBV-replizierenden Zellen.....	95
Abb. 45: Überexpression von $\gamma 2$ -Adaptin führt zur Proteolyse von L.....	98
Abb. 46: Lysosomale Inhibition hat Einfluss auf HBV-Produktion.....	99
Abb. 47: Transport-Modell ubiquitinierten Membran-Proteine ins MVB der Hefe.....	109
Abb. 48: Modell der Ubiquitin-abhängigen Sprossung von HIV-1 an der Plasma-Membran.....	110
Abb. 49: Modell der Ubiquitin-abhängigen Sprossung von HBV an der Assembly-Plattform.....	114

3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht derzeit bekannter Orthohepadnaviren.....	1
Tab. 2:	Übersicht derzeit bekannter Avihepadnaviren.....	2
Tab. 3:	Zelllinien der Prokaryonten.....	26
Tab. 4:	Zelllinien der Eukaryonten.....	26
Tab. 5:	Plasmide der HBV-Genoms.....	28
Tab. 6:	Fluoreszierende Plasmide.....	29
Tab. 7:	Plasmide der HBV-Hüllproteine.....	30
Tab. 8:	Plasmide der Adaptine.....	31
Tab. 9:	Plasmide der pSuper-Konstrukte.....	32
Tab. 10:	Bicistronische Plasmide.....	33
Tab. 11:	DNA-Primer zur Klonierung der pSuper- γ 2-Adaptin-Silencing-Konstrukte.....	34
Tab. 12:	RNA-Primer zur RNAi mit γ 2-Adaptin-siRNAs.....	35
Tab. 13:	Primäre Antikörper.....	36
Tab. 14:	Sekundäre Antikörper.....	37
Tab. 15:	Protein-Gewichtsmarker.....	38
Tab. 16:	Zentrifugen.....	38
Tab. 17:	Antibiotika-Zugabe zur Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	40
Tab. 18:	Mengenangaben zur Transfektion von COS7- und HuH7-Zellen mit Lipofectamin Plus TM	42
Tab. 19:	Mengenangaben zur Transfektion von 293- und HepG2-Zellen mit Lipofectamin TM 2000.....	42
Tab. 20:	Zelllyse transfizierter Zellen für Western-Blot, Koimmunpräzipitation und Immunpräzipitation.....	43
Tab. 21:	Empfehlungen zur Target-Auswahl für RNAi.....	48
Tab. 22:	Immobilisierung der Antikörper für Southern-Blot-Analysen.....	52