

Aus dem Institut für Veterinärbiochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# **Charakterisierung der Bedeutung von $\alpha$ -Taxilin für den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Caroline Böhm**

Tierärztin  
aus Frankfurt am Main

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3610

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Einspanier  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Hildt  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

hepatitis B, Hepatitis B virus, virology, hepatocellular carcinoma, morphogenesis,  
Hepadnaviridae, liver cirrhosis, liver diseases, acute infections, chronic infections

Tag der Promotion: 30. Januar 2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-274-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**Meinen lieben Eltern**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Hepatitis-B-Virus (HBV) . . . . .	1
1.1.1	Epidemiologie und Pathogenese . . . . .	1
1.1.2	Prävention, Diagnose und Therapie . . . . .	3
1.1.3	Klassifizierung . . . . .	5
1.1.4	Aufbau des Viruspartikels . . . . .	6
1.1.5	HBV-Genom . . . . .	8
1.1.6	Oberflächenproteine (HBsAg) . . . . .	10
1.1.6.1	SHBsAg . . . . .	10
1.1.6.2	MHBsAg . . . . .	10
1.1.6.3	LHBsAg . . . . .	10
1.1.7	Lebenszyklus von HBV . . . . .	11
1.2	Intrazellulärer Vesikeltransport . . . . .	13
1.2.1	Rab-Proteine . . . . .	13
1.2.2	SNARE-Komplex . . . . .	13
1.2.3	NSF und SNAP . . . . .	15
1.2.4	Sec1/Munc18 (SM)-Proteine . . . . .	15
1.3	ESCRT-System . . . . .	15
1.4	ESCRT und HBV . . . . .	18
1.5	$\alpha$ -Taxilin . . . . .	20
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
3.1	Bakterienstämme und Zelllinien . . . . .	22
3.1.1	Bakterienstämme . . . . .	22
3.1.2	Zelllinien . . . . .	22
3.2	Mäuse . . . . .	23
3.3	Gewebeproben . . . . .	23
3.4	Plasmide . . . . .	23
3.4.1	Kommerziell erhältliche Plasmide . . . . .	23
3.4.2	Hergestellte Plasmide . . . . .	23

3.5	Oligonukleotide . . . . .	24
3.6	Antikörper . . . . .	24
3.7	Größenstandards . . . . .	26
3.8	Enzyme . . . . .	26
3.9	Reagenzien für die Zellkultur . . . . .	26
3.10	Inhibitoren . . . . .	27
3.11	Chemikalien . . . . .	27
3.12	Verwendete Kits . . . . .	28
3.13	Geräte . . . . .	28
3.13.1	Elektrophorese- und Blotsysteme . . . . .	28
3.13.2	Mikroskope . . . . .	28
3.13.3	Software . . . . .	29
3.13.4	PCR Cyclers . . . . .	29
3.13.5	Zentrifugen . . . . .	29
3.13.6	Sonstige . . . . .	29
3.14	Puffer, Lösungen und Medien . . . . .	30
3.15	Verbrauchsmaterialien . . . . .	32
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
4.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	34
4.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .	34
4.1.2	Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen . . . . .	34
4.1.3	Transfektion von Expressionsplasmiden . . . . .	34
4.1.4	Ernte und Lyse von eukaryotischen Zellen . . . . .	35
4.1.4.1	Proteinlysate . . . . .	35
4.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	35
4.2.1	Gewinnung kompetenter <i>E. coli</i> . . . . .	35
4.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit rekombinanter DNA . . . . .	35
4.2.3	Präparation und Konservierung von Plasmiden . . . . .	36
4.2.4	Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA . . . . .	36
4.2.5	Agarosegelelektrophorese und Reinigung der DNA . . . . .	36
4.2.6	RNA-Isolierung . . . . .	37
4.2.7	cDNA-Synthese . . . . .	37
4.2.8	Real-time PCR (RT-PCR) . . . . .	37
4.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	38
4.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay . . . . .	38
4.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	38
4.3.3	Western-Blot-Analyse (WB-Analyse) . . . . .	39
4.4	Immunologische Methoden . . . . .	40

4.4.1	Coimmunpräzipitation (Co-IP) . . . . .	40
4.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IF) . . . . .	40
4.4.3	<i>Enzym-linked-immunosorbent-assay (ELISA)</i> . . . . .	41
4.5	Mikroskopie . . . . .	41
4.5.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) . . . . .	41
4.6	Methoden zur Charakterisierung HBV-transgener Mäuse . . . . .	41
4.6.1	Serumgewinnung von Mäusen . . . . .	41
4.6.2	Messung von ALT und AST . . . . .	42
4.6.3	Gewinnung von Organen . . . . .	42
4.6.4	Präparation von Organlysaten . . . . .	42
4.6.5	Isolierung von RNA aus Lebergewebe . . . . .	42
4.6.6	Paraffinpräparate und Färbeverfahren . . . . .	42
4.6.7	Immunfärbung von Paraffinschnitten . . . . .	43
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
5.1	Erhöhte Mengen $\alpha$ -Taxilin in HBV-exprimierenden Zellkulturen . . . . .	44
5.2	Erhöhte Mengen von $\alpha$ -Taxilin <i>in vivo</i> . . . . .	46
5.2.1	Expression von $\alpha$ -Taxilin in HBV-transgenen Mäusen . . . . .	46
5.2.2	Expression von $\alpha$ -Taxilin in HBV-infizierten Patienten . . . . .	50
5.3	Überexpression von $\alpha$ -Taxilin . . . . .	52
5.4	<i>Knockdown</i> von $\alpha$ -Taxilin . . . . .	53
5.5	Colokalisation von HBV mit $\alpha$ -Taxilin . . . . .	55
5.6	Interaktion zwischen $\alpha$ -Taxilin und LHBs . . . . .	56
5.7	Interaktion zwischen gereinigtem $\alpha$ -Taxilin und der PreS1PreS2-Domäne . . . . .	57
5.8	Einfluss von $\alpha$ -Taxilin auf die Expression von Komponenten des ESCRT-Systems	58
5.9	$\alpha$ -Taxilin colokalisiert mit tsg101 . . . . .	60
5.10	Interaktion zwischen $\alpha$ -Taxilin und tsg101 . . . . .	61
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>





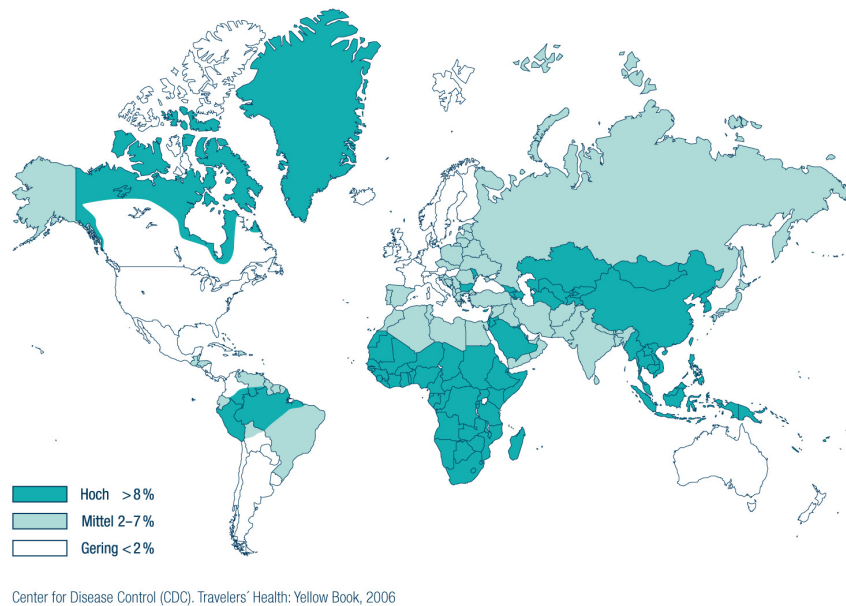
# 1 Einleitung

Hepatitis ist eine entzündliche Erkrankung der Leber, welche durch Medikamente, Strahlung, Kontusion, immunpathologische Vorgänge, Toxine oder Pathogene, wie zum Beispiel Parasiten, Bakterien oder Viren, ausgelöst werden kann. Die häufigsten Ursachen einer Hepatitis sind Virusinfektionen. Die klassischen Hepatitis-verursachenden Viren sind klassifiziert in Hepatitis A, B, C, D, E und G. Auch andere, sogenannte nicht-klassische Viren, wie zum Beispiel Herpes-, Mumps-, Rubella-, Coxsackie- oder Adenoviren, können eine sogenannte Begleithepatitis verursachen.

## 1.1 Das Hepatitis-B-Virus (HBV)

### 1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Eine durch das Hepatitis-B-Virus (HBV) verursachte Hepatitis gehört weltweit zu einer der häufigsten Infektionskrankheiten. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) haben etwa ein Drittel der Weltbevölkerung (2 Milliarden Menschen) eine Hepatitis-B-Infektion durchgemacht und etwa 5 % der Weltbevölkerung (350 Millionen) sind chronisch mit HBV infiziert (Epidemiologisches Bulletin, Robert Koch-Institut, 2011). Seine Verbreitung liegt vor allem im südostasiatischen und tropisch-afrikanischen Raum, wo etwa 5-15 % der Bevölkerung chronische Virusträger sind (Böker und Manns, 1993). Das Hepatitis-B-Virus ist 50 bis 100-mal ansteckender als das humane Immundefizienzvirus (HIV) und stellt die schwerste Form der Virushepatitis dar. Pro Jahr sterben weltweit etwa 600 000 Menschen an den Folgen einer akuten oder chronischen Hepatitis-B-Infektion. (WHO, Fact Sheet No. 204).



**Abb. 1.1: Weltweite HBV-Prävalenz in Prozent**

Das Virus wird hauptsächlich über Blut, Blutprodukte und Sexualverkehr übertragen. Aber auch Speichel, Muttermilch und andere Körperflüssigkeiten stellen je nach Viruskonzentration im Blut eine Infektionsquelle dar. Ziel einer Infektion sind fast ausschließlich Hepatozyten. Bei einem Drittel der Infizierten entwickelt sich nach etwa zwei bis sechs Monaten eine akute Hepatitis. Diese ist gekennzeichnet durch Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Dunkelfärbung des Urins, Gelenkschmerzen, Fieber, Ikterus (Gelbsucht) und erhöhte Leberenzymwerte. In 5-10 % entwickelt sich aus der akuten eine chronische Hepatitis (Vorhandensein von *Hepatitis B surface Antigen* > 6 Monate) (de Franchis *et al.*, 2003). Die meisten chronischen Virusträger zeigen lange Zeit keine Symptome (Hollinger, 1996), sind jedoch einem bis zu 200-fach erhöhtem Risiko ausgesetzt, an Leberzirrhose oder einem primären hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken (Beasley *et al.*, 1981). Damit spielt das HBV eine wichtige Rolle in der Pathogenese des HCC und ist ein Grund dafür, dass dieses Malignom weltweit zu den häufigsten zählt (Beasley, 1988). In 0,5 % der Fälle nimmt die akute Infektion unbehandelt einen fulminanten Verlauf und endet tödlich. Bei zwei Drittel der Betroffenen verläuft die Infektion symptomlos.

In Deutschland, wo Hepatitis B sporadisch-endemisch vorkommt, sind 0,5 % der Bevölkerung HBsAg-Träger und 5 % der Menschen besitzen Antikörper gegen HBV (Robert Koch-Institut). Diese sind Anzeichen einer überwundenen Infektion (Robert Koch-Institut, 2010). Im Jahr 2000 wurden weltweit etwa 250 000 Fälle eines HBV-assoziierten HCCs diagnostiziert (Lupberger und Hildt, 2007). 30 % der Fälle von Leberzirrhose und 53 % der Fälle von HCC gelten als Folgeerkrankung einer HBV-Infektion (Robert Koch-Institut, 2010).

Trotz starker Virusreplikation zeigen viele chronisch HBV-infizierte Menschen keine Symptome, da das Virus selbst nicht zytopathogen ist (de Franchis *et al.*, 1993). Die Zerstörung virusinfizierter Hepatozyten wird vielmehr durch das zelluläre Immunsystem gegen virale Antigene auf der Zellober-

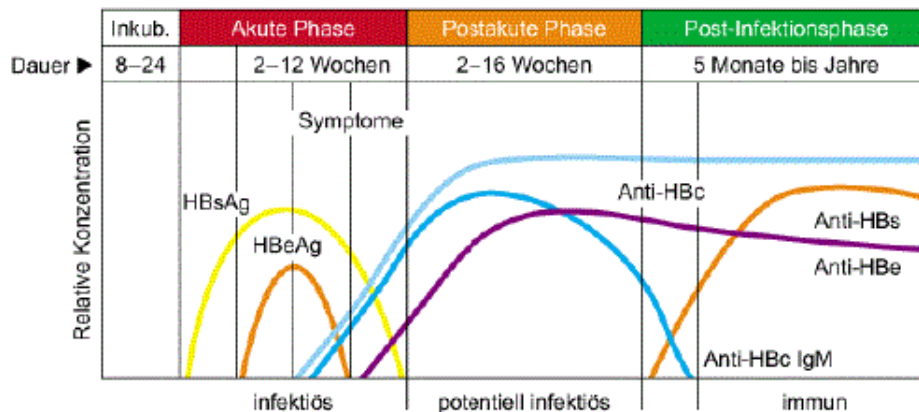
fläche, welches eine Reihe von unspezifischen Effektorsystemen auslöst, hervorgerufen (Chisari und Ferrari, 1995, Guidotti und Chisari, 2006). Jedoch sind die Mechanismen der Immunantwort auf HBV nicht vollständig verstanden. Das adaptive Immunsystem wird für die Virusbeseitigung und die Krankheitspathogenese verantwortlich gemacht (Chisari *et al.*, 2010). Humorale Antikörper tragen zur Beseitigung zirkulierender Viruspartikel bei und beugen einer weiteren Virusverbreitung vor (Chisari *et al.*, 2010). Im Falle einer akuten Infektion kommt es zu einer starken T-Zellantwort und somit zu einer schnellen Viruseliminierung. Hierbei liegen eine starke CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellantwort gegen HBc/HBeAg sowie eine schwächere gegen die Oberflächenproteine vor als auch eine ausgeprägte CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)-Antwort gegen verschiedene Epitope aller viralen Proteine (Ganem und Prince, 2004, Ferrari *et al.*, 1990). Die Induktion einer effizienten HBV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort ist abhängig von einer vorangegangenen, frühen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung und ist verantwortlich für die Reduktion der Viruslast im infizierten Gewebe (Chisari *et al.*, 2010). In virusinfizierten Hepatozyten kann die Virusreplikation von CTL und NK-Zellen zytolytisch oder nicht-zytolytisch inhibiert werden (Chisari *et al.*, 2010, Guidotti und Chisari, 2006). Die T-Zell-vermittelte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) hemmen die virale Genexpression und Replikation (Chisari *et al.*, 2010, Guidotti und Chisari, 2000, Guidotti und Chisari, 1996, Webster *et al.*, 2000, Webster und Bertolotti, 2002). Bei chronisch HBV-infizierten Patienten kommt es zu einer abgeschwächten T-Zellantwort, die nicht in der Lage ist, die Replikation effektiv zu hemmen.

### 1.1.2 Prävention, Diagnose und Therapie

Bereits 1969 erkannte man, dass die großen Mengen zirkulierender Antigene im Blut eines HBV-infizierten Patienten als Basis für die Entwicklung eines Impfstoffes dienen könnten. 1970 testete der Kinderarzt Saul Krugman ein auf 100 °C erhitztes Serum eines HBV-infizierten Patienten an mental beeinträchtigten Kindern und infizierte sie so mit HBV. Erst John Gerin und Robert Purcell gelang es durch die Applikation gereinigten und sicher virus-inaktivierten Plasmas, in Schimpansen eine schützende Immunantwort hervorzurufen. Diese Impfstoffe der 1. Generation wurden in den 80er Jahren durch gentechnisch in Hefezellen hergestellten Impfstoffe der 2. Generation abgelöst (Glebe, 2009). Die seit 1985 verfügbaren rekombinanten HBV-Impfstoffe basieren auf der Grundlage der Bildung virusneutralisierender Antikörper gegen das kleine HBSAg. Ende der 80er Jahre fand man durch Impfversuche mit chemisch synthetisierten PreS-Peptiden an Schimpansen heraus, dass auch diese virusneutralisierend sind und eine schützende Immunantwort gegen HBV hervorrufen (Neurath *et al.*, 1986). Dennoch stellen die Impfstoffe der 2. Generation nach wie vor den wichtigsten Präventionsmechanismus dar. Da die chronische Hepatitis-B-Infektion eine der Hauptursachen in der Entstehung eines HCCs darstellt, ist eine Impfung gegen dieses Virus gleichzeitig auch eine Impfung gegen eine der häufigsten Krebsarten: dem HCC (Lupberger und Hildt, 2007). Dies konnte eindrucksvoll in einem universellen Impfprogramm in Taiwan demonstriert werden. Über 20 Jahre nach Start des Programmes fielen hier die chronischen HBV-Infektionsraten

von 10-17 % auf 0,7-1,7 % sowie die HCC-Inzidenz von 0,52-0,54 auf 0,13-0,2 % pro 100 000 Menschen (Chang, 2009).

Um eine Hepatitis-B-Infektion diagnostizieren zu können, werden serologische, virologische und biochemische Parameter herangezogen (Morgan *et al.*, 2007). Diese Parameter sind relevant für die Bestimmung des Stadiums der Erkrankung, die Therapieoptionen sowie die Erfolgskontrolle (Thimme und Blum, 2006). In Abb. 1.2 sind die serologischen Marker im Verlauf einer HBV-Infektion zu sehen.



Verlauf einer Hepatitis-B-Infektion:  
Dieser serologische Verlauf trifft bei 75–80 % der Patienten mit akuter Hepatitis B auf.

**Abb. 1.2: Serologische Marker im Verlauf einer HBV-Infektion**  
(Quelle: [www.laborbauer.at](http://www.laborbauer.at))

Aufgrund der hohen Spontanheilungsrate kommt bei der akuten Hepatitis-B-Infektion meist nur die symptomatische Therapie zum Einsatz. Bei einer chronischen HBV-Infektion wird antiviral therapiert. Ziele einer Therapie sind die verringerte Morbidität und Mortalität, die dauerhafte Suppression der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze ( $< 2000$  IU/ml), die Serokonversion von HBsAg zu Anti-HBs-Antikörpern sowie die Senkung der Infektiosität des Patienten (Cornberg *et al.*, 2011). Zur medikamentösen Therapie der chronischen Hepatitis B sind zwei Substanzklassen zugelassen: IFN- $\alpha$  und Nukleosid-/Nukleotidanaloga (Zeuzem, 2004). Vor der Auswahl eines Medikamentes sollte das Stadium der Lebererkrankung, die Höhe der HBV-Virämie sowie eine eventuelle Vortherapie berücksichtigt werden. In Tab. 1.1 sind die zugelassenen Medikamente gegen die chronische HBV-Infektion aufgeführt.

Substanz	Zugelassene Dosierung
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	
pegyliertes IFN- $\alpha$ -2a	180 $\mu$ g/Woche für 48 Wochen
IFN- $\alpha$ -2a	2,5-5 Mio. IU/m <sup>2</sup> Körperoberfläche 3x/Woche für 4-6 Monate
IFN- $\alpha$ -2b	5-10 Mio. IU/m <sup>2</sup> Körperoberfläche 3x/Woche jeden zweiten Tag für 4-6 Monate
<b>Nukleosid-Analoga</b>	
Lamivudin	100 mg/Tag
Entecavir	0,5 mg/Tag
Telbivudin	600 mg/Tag
<b>Nukleotid-Analoga</b>	
Adefovir dipivoxil	10 mg/Tag
Tenofovir dipivoxil	245 mg/Tag

**Tab. 1.1: In Deutschland zugelassene Medikamente gegen die chronische HBV-Infektion** (modifiziert nach Cornberg *et al.*, 2011)

Hauptangriffspunkt der gegenwärtigen Therapie ist die HBV-Polymerase. Ihre Aktivität kann durch Nukleosid- und Nukleotidanaloga gehemmt werden. Das Risiko einer Resistenzentwicklung steigt bei Langzeittherapien (Buster und Janssen, 2006), Entecavir und Tenofovir zählen jedoch zu den Medikamenten, welche die Resistenzentwicklung erschweren (Cornberg *et al.*, 2011). Nukleosid- und Nukleotidanaloga werden häufig in Kombination mit pegyliertem Interferon (PEG-IFN) verabreicht, welches die Aktivität der T-Lymphozyten stimulieren und somit die Abwehr des zellulären Immunsystems verbessern soll (Buster und Janssen, 2006).

### 1.1.3 Klassifizierung

Das humane HBV gehört taxonomisch zur Familie der Hepadnaviridae. Diese werden unterteilt in die Gattungen Orthohepadnaviridae und Avihepadnaviridae (Modrow, 2010). In Tab. 1.2 sind die verschiedenen Subtypen der Gattungen aufgelistet. Zwischen Ortho- und Avihepadnaviren bestehen Unterschiede im Verlauf und dem Ausgang der Infektion. Während die Infektion von Säugetieren zu einer akuten und chronischen Hepatitis mit einem bis zu 200-fachen Risiko für die Entstehung eines HCCs führt, führt die Infektion von Vögeln zu einer milden Hepatitis. Das Ausbleiben der HCC-Entwicklung in avihepadnaviralen Wirten wird dem Fehlen eines *X-open reading frame* zugeschrieben (Schuster *et al.*, 2002). Alle Erreger der Familie Hepadnaviridae besitzen eine partiell doppelsträngige DNA und zeichnen sich durch ihre hohe Wirts- und Gewebespezifität aus (Schädler und Hildt, 2009).

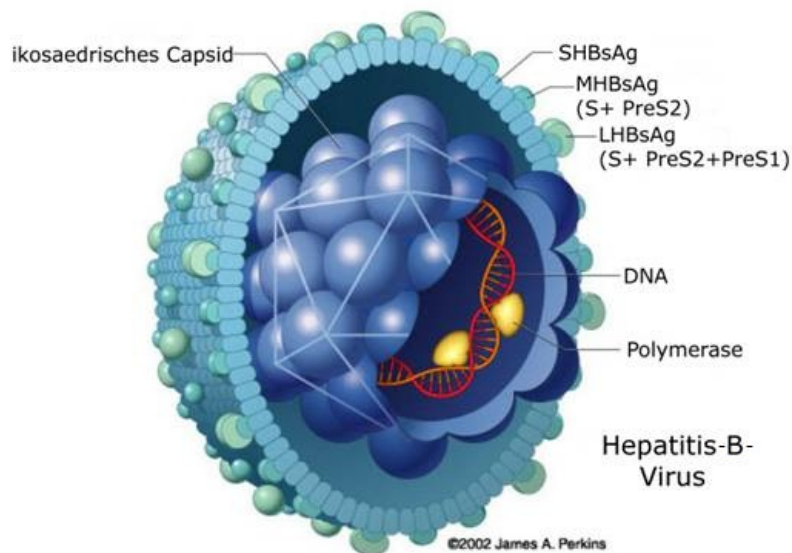
Gattung	Virus	Wirt
Orthohepadnaviridae	Hepatitis-B-Virus (HBV)	Mensch <i>Homo sapiens sapiens</i>
	Woodchuck Hepatitis-B-Virus (WHBV)	Waldmurmeltier <i>Marmota monax</i>
	Ground Squirrel Hepatitis-B-Virus (GSHBV)	Erdhörnchen <i>Spermophilus beecheyi</i>
	Arctic Squirrel Hepatitis-B-Virus (ASHBV)	Arktischer Ziesel <i>Spermophilus parryii kennicotti</i>
	Woolly Monkey Hepatitis-B-Virus (WMHBV)	Wollaffe <i>Lagothrix lagotricha</i>
	Chimpanzee Hepatitis-B-Virus (ChHBV)	Schimpanse <i>Pan troglodytes</i>
	Gibbon Hepatitis-B-Virus (GiHBV)	Weißhandgibbon <i>Hylobates lar</i>
	Orangutan Hepatitis-B-Virus (OHBV)	Orangutan <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>
	Gorilla Hepatitis-B-Virus (GoHBV)	Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>
	Avihepadnaviridae	Duck Hepatitis-B-Virus (DHBV)
Maned Duck Hepatitis-B-Virus (MDHBV)		Sunda-Weißkehlente <i>Anas gibberifrons gracilis</i>
Grey Teal Hepatitis-B-Virus (GTHBV)		Mähnengans <i>Chenonetta jubata</i>
Ross Goose Hepatitis-B-Virus (RGHBV)		Zwergschneegans <i>Anser rossii</i>
Snow Goose Hepatitis-B-Virus (SGHBV)		Schneegans <i>Anser caerulescens</i>
Stork Hepatitis-B-Virus (STHBV)		Weißstorch <i>Ciconia ciconia</i>
Heron Hepatitis-B-Virus (HHBV)		Graureiher <i>Adrea cinerea</i>
Crane Hepatitis-B-Virus (CHBV)		Jungfernkranich <i>Anthropoides virgo</i> Kronenkranich <i>Balearica regulorum</i>

Tab. 1.2: Familie der Hepadnaviridae (modifiziert nach Schaefer, 2007)

### 1.1.4 Aufbau des Viruspartikels

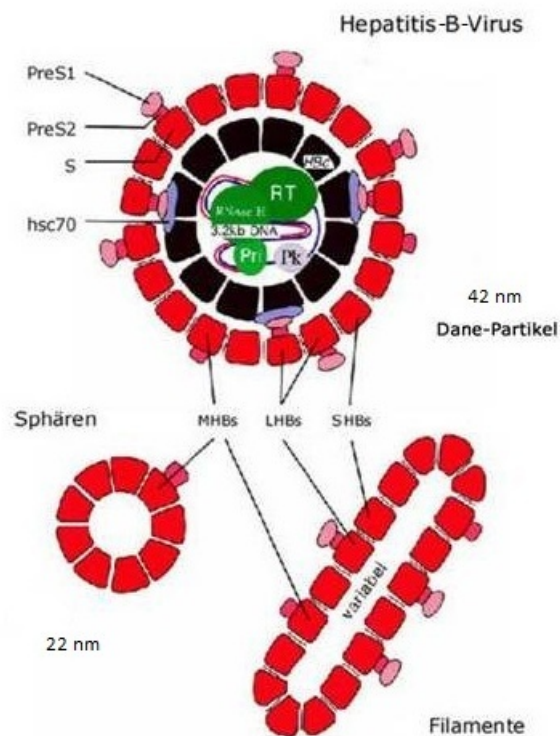
Die 42 nm großen sphärischen, infektiösen Viruspartikel von HBV werden nach ihrem Entdecker „Dane-Partikel“ genannt. Die Virushüllmembran, welche wahrscheinlich aus der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) einer infizierten Wirtszelle entsteht, trägt die drei viralen Oberflächenproteine LHBsAg (*Large Hepatitis B surface Antigen*), MHBsAg (*Medium Hepatitis B surface Antigen*) und SHBsAg (*Small Hepatitis B surface Antigen*) (Seeger und Mason, 2000). Die Virushülle umschließt das 20-25 nm große ikosaedrische Nukleokapsid, bestehend aus Hepatitis-B-

Core-Proteinen (HBcAg). Innerhalb des Nukleokapsids befindet sich das partiell doppelsträngige DNA-Genom, welches kovalent an die virale Polymerase gebunden ist (Kaplan *et al.*, 1973, Gerlich und Robinson, 1980). Neben den infektiösen Dane-Partikeln werden während einer Infektion außerdem subvirale, nicht infektiöse Partikel (SVP) im 1000-10000-fachem Überschuss gebildet (Ganem, 1991). Diese filamentartigen oder sphärischen Partikel haben eine Größe von 22 nm und sind damit kleiner als die infektiösen Partikel (Ganem, 1991). Sie bestehen nur aus der Hüllmembran und besitzen keine DNA (Abb. 1.4). Die Rolle der subviralen Partikel ist noch unklar, jedoch wird spekuliert, dass der Überschuss an SVPs im Vergleich zu Dane-Partikeln das Immunsystem in die Irre führt. Es wird angenommen, dass sie neutralisierende Antikörper binden und abfangen. Im DHBV-Modell wurde zusätzlich gezeigt, dass SVP bei niedriger MOI (*multiplicity of infection*, Anzahl der infektiösen Viren pro Zelle) die Infektion von Wirtszellen verstärken und eine wichtige Rolle im frühen viralen Lebenszyklus spielen (Bruns *et al.*, 1998).



**Abb. 1.3: Schematischer Aufbau des HBV**

Das partiell doppelsträngige DNA-Genom ist kovalent an die virale Polymerase gebunden und von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben. Die Hüllmembran bestehend aus einer Lipiddoppelschicht trägt die viralen Oberflächenproteine LHBsAg, MHBsAg und SHBsAg (modifiziert nach dem Original von James A. Perkins).



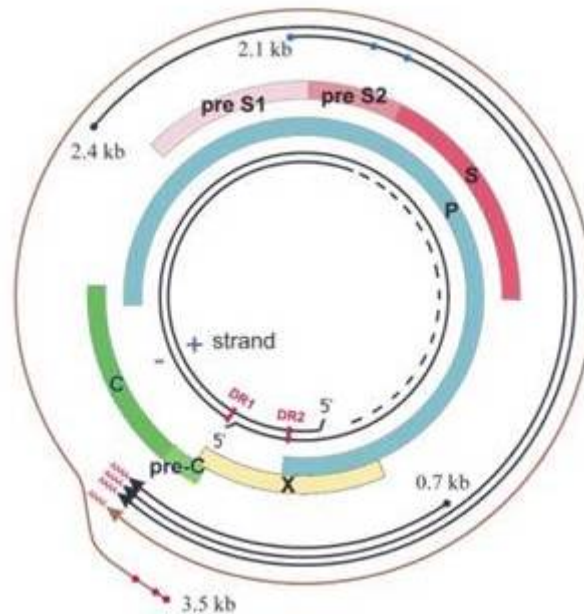
**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Partikel im Blut HBV-infizierter Menschen**

Die 42 nm großen Dane-Partikel tragen die drei viralen Oberflächenproteine LHBsAg, MHBsAg und SHBsAg. Die subviralen Partikel bestehen nur aus der Hüllmembran und besitzen keine DNA. hsc70: *Heat shock cognate 70*; Pk: Proteinkinase; Pri: Primer-Protein; RT: reverse Transkriptase; PreS1, PreS2: PreS1-, PreS2-Domäne; S: S-Domäne (Hüllproteine, Beschreibung siehe 1.1.5) (modifiziert nach Kann, 1998).

### 1.1.5 HBV-Genom

Das Virusgenom ist mit ca. 3200 Basenpaaren eines der kleinsten Genome unter den DNA-Viren. Es ist partiell doppelsträngig und besteht aus einem vollständigen, kodierenden Minusstrang und einem unvollständigen, nicht kodierenden komplementären Plusstrang. Das zirkuläre Genom entsteht durch Hybridisierung des 5'- und des 3'-Endes des Minusstranges, welches auch als kohäsive Überlappungsregion bezeichnet wird (Sattler und Robinson, 1979). Am 3'-Ende des Plusstranges sind die reverse Transkriptase und am 5'-Ende des Minusstranges das virale terminale Protein kovalent gebunden (siehe Abb. 1.5).





**Abb. 1.5: Organisation des HBV-Genoms von innen nach außen**

Das Genom besteht aus einer partiell doppelsträngigen DNA mit einem Plusstrang und einem Minusstrang. Das circa 3200 bp große DNA-Genom (mittige schwarze Linie) besitzt insgesamt 4 überlappende offene Leserahmen: Virale Polymerase (P), HBx Protein (X), Core Protein (C) und PreS1-, PreS2- und S-Domäne für die Oberflächenproteine. Die vier transkribierten mRNAs (3,5 kb oder prägenomische RNA, 2,4 kb, 2,1 kb und 0,7 kb) sind mit ihren Startpunkten im äußersten Kreis der Abbildung angegeben und kodieren für die Virusproteine. Alle enden an der Polyadenylierungssequenz (modifiziert nach Kidd-Ljunggren *et al.*, 2000).

Das Genom enthält vier offene Leserahmen (*open reading frame, ORF*), die sich teilweise überlappen. Der preC/Core-ORF kodiert für das Precore- und das Core-Protein (HBcAg). HBeAg (*Hepatitis B Virus early Antigen*) ist eine N-terminal verlängerte und C-terminal verkürzte Version des HBcAg und stellt eine sekretorische Variante des Core-Proteins dar. HBeAg wird durch proteolytische Prozessierung des Pre-Core-Proteins gebildet und wird zu Beginn der Infektion über den Golgi-Apparat aus der Zelle sekretiert. Es scheint nicht für die Replikation, wohl aber für die Infektiosität von HBV *in vivo* wichtig zu sein (Milich und Liang, 2003). Der größte offene Leserahmen P-ORF kodiert für die virale Polymerase und der X-ORF für das regulatorische X-Protein (HBx). Die verschiedenen Oberflächenproteine werden von einem Leserahmen kodiert, welcher durch drei verschiedene, im Leserahmen eingebettete AUG Startkodons in folgende Domänen geteilt wird: Die PreS1-, PreS2- und S-Domäne (Ganem, 2002). Das große Oberflächenprotein LHBsAg verfügt über die PreS1-Domäne (108 oder 119 Aminosäuren), die PreS2-Domäne (55 Aminosäuren) und die S-Domäne (226 Aminosäuren). Das mittelgroße Oberflächenprotein MHBsAg umfasst die PreS2-Domäne und die S-Domäne; das kleine Oberflächenprotein SHBsAg besteht aus der S-Domäne (Schädler und Hildt, 2009). Die HBV-Polymerase (auch Pol-Protein genannt) besitzt die enzymatischen Aktivitäten einer DNA- und RNA-abhängigen Polymerase sowie einer RNase H und dient der reversen Transkription der prägenomischen RNA (pgRNA) zur Herstellung des DNA-Negativstranges, dem enzymatischen Abbau der RNA-Matrize und der Synthese des DNA-

Positivstranges (Radziwill *et al.*, 1990). Das terminale Protein ist eine kovalent gebundene Polymerase, die als Primer für die Initiation der Replikation dient. Die Rolle des HBx für die Virusreplikation und virusassoziierte Pathogenese ist noch nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (Lupberger und Hildt, 2007). *In vitro* konnten vielseitige Funktionen des X-Proteins gefunden werden wie z. B. die Aktivierung der cRaf1/ERK2-Signalkaskade, eine Steigerung der viralen DNA-Synthese, einen Einfluss auf den Proteinabbau und eine Rolle bei der HBx-induzierten Karzinogenese (Hafner *et al.*, 2003, Rossner, 1992).

### 1.1.6 Oberflächenproteine (HBsAg)

Die Oberflächenproteine (HBsAg) werden in der Leber infizierter Personen gebildet und werden aufgrund struktureller Unterschiede ihres Oberflächenantigens in vier verschiedene Serotypen unterteilt: adw, ayw, adr, ayr (Magnius und Norder, 1995). Ihre Topologie und der relativ komplexe Aufbau der Oberflächenproteine unterscheidet sich stark von den Hüllproteinen anderer Viren (Bruss *et al.*, 1994). HBsAg werden von der 2,4 kb und 2,1 kb mRNA in das 42 kDa große HBsAg (LHBsAg), 31 kDa mittlere (MHBsAg) und das 24 kDa kleine HBsAg (SHBsAg) translatiert und unterscheiden sich in der N-terminalen Region (Seeger und Mason, 2000).

#### 1.1.6.1 SHBsAg

Das SHBsAg besitzt ein Molekulargewicht von 24 kDa und stellt mit 90 % der Oberflächenproteine das am häufigsten auftretende Oberflächenprotein im Blut HBV-infizierter Menschen dar. Synthetisiert wird das 226 Aminosäuren (AS) umfassende Protein durch einen internen Translationsstart innerhalb des 2,1 kb langen subgenomischen Transkriptes (Standing *et al.*, 1984). Das kleine HBsAg ist wichtig für die Bildung virusneutralisierender Antikörper und stellt neben anderen Oberflächenproteinen die Grundlage für Impfstoffe dar (siehe 1.1.2).

#### 1.1.6.2 MHBsAg

Das MHBsAg entsteht durch die Translation eines alternativen 5'-gelegenen Startkodons an die C-terminale Sequenz des MHBsAg und besteht aus 280 AS. Die 55 zusätzlichen AS der PreS2-Domäne liegen im ER-Lumen (Eble *et al.*, 1990), sonst entspricht die Membrantopologie der des SHBsAg. Die Rolle des MHBsAg ist wenig erforscht und scheint nach aktuellem Stand nicht essentiell für die Infektion, die Replikation, die Morphogenese oder die Sekretion zu sein (Lepère-Douard *et al.*, 2009).

#### 1.1.6.3 LHBsAg

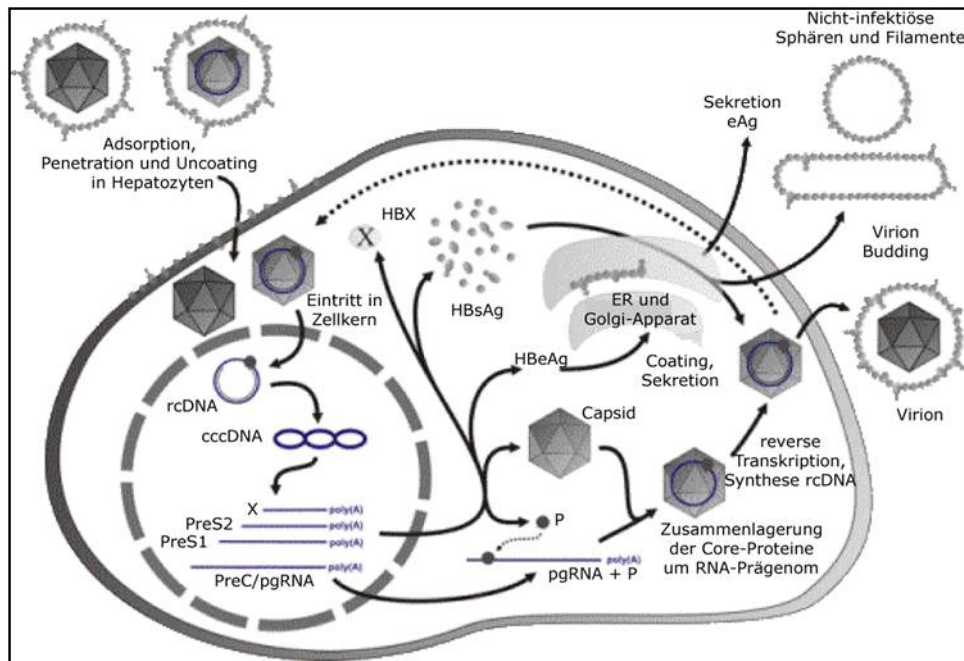
Das LHBsAg besteht aus den Regionen PreS1, PreS2 und dem S-Protein. Es kann als unglykosylierte Form mit einem Molekulargewicht von 39 kDa oder glykosyliert mit 42 kDa vorliegen.

Dabei wird die Glykosylierungsstelle des SHBsAg im S-Protein genutzt (Heermann *et al.*, 1984). Die Topologie des LHBsAg unterscheidet sich von den anderen beiden Hüllproteinen. Während der Morphogenese des Virus wird bei der Hälfte der LHBsAgs die zytosolische, N-terminale PreS1-Domäne posttranslational über die ER-Membran transloziert, sodass das LHBs-Protein eine duale Membrantopologie aufweist (Prange und Streeck, 1995, Ostapchuk *et al.*, 1994, Bruss *et al.*, 1994). So kann der im ER-Lumen befindliche Teil der PreS1-Region den wichtigen Kontakt mit dem innenliegenden Kapsid vermitteln (Bruss *et al.*, 1994, Poisson *et al.*, Le Seyec *et al.*), während die nach außen gerichtete Orientierung die Bindung an ein bisher noch unbekanntes Rezeptormolekül, dem Startpunkt der HBV-Infektion, vermittelt (Paran *et al.*, 2001, Gripon *et al.*, 2005, Klingmüller und Schaller, 1993).

### 1.1.7 Lebenszyklus von HBV

Der Lebenszyklus von HBV ist – soweit bekannt – in Abb. 1.6 dargestellt. Das Fehlen eines *in vivo* Infektionssystems macht die Aufklärung der ersten Schritte des Replikationszyklusses schwierig. Bisher konnte kein zellulärer Rezeptor oder Rezeptorkomplex, der die endozytotische Aufnahme des Virus vermittelt, identifiziert werden. In Anlehnung an das DHBV-Infektionssystem (Köck *et al.*, 1996) wird jedoch auch für das humane HBV eine endozytotische Aufnahme angenommen. Hierbei verschmilzt die Virusmembran mit der endosomalen Membran, das Nukleokapsid wird in das Zytoplasma freigesetzt und über einen noch unbekanntem intrazellulären Transportmechanismus zum Zellkern transportiert. Die zelleigene Proteinkinase C phosphoryliert C-terminale Serin-Reste der Core-Proteine (Kann und Gerlich, 1994) und führt somit zu einer Konformationsänderung dieser, wodurch die Kernlokalisationssequenz der C-terminalen Domäne an der Oberfläche des Kapsids exponiert wird. Importin- $\alpha$  bindet an die Kernlokalisationssequenz und in Assoziation mit Importin- $\beta$  kommt es zur Bindung an die Kernporen (Seeger und Mason, 2000), wo der Zerfall des Nukleokapsids und die Freisetzung des viralen Genoms in den Zellkern stattfindet (Rabe *et al.*, 2003). Der unvollständige Plusstrang der partiell doppelsträngigen DNA wird durch die DNA-Polymerase der Wirtszelle vervollständigt (rcDNA). Somit liegt anschließend ein zirkulär, kovalent geschlossener *supercoiled* DNA-Doppelstrang (cccDNA) im Zellkern vor, der als Matrize für die anschließende Transkription der viralen mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II dient. Jede mRNA wird von ihrem eigenen Promotor transkribiert und endet an einem gemeinsamen Polyadenylierungsort (siehe Abb. 1.5). Die transkribierten RNAs werden in das Zytoplasma transportiert und mit Hilfe des zellulären Translationsapparates in die Struktur- und Nichtstrukturproteine übersetzt. Das HBeAg wird früh in der Infektion sezerniert. Die Oberflächenproteine LHBsAg, MHBsAg und SHBsAg werden am ER synthetisiert und verankert. Kapsid- und Pol-Protein werden durch die 3,5 kb lange mRNA translatiert, welche unter anderem auch als pgRNA dient. Die Zusammenlagerung der Kapsid-Proteine um den Komplex aus pgRNA und Polymerase erfolgt im Zytoplasma. Die reverse Transkription zum partiell doppelsträngigen DNA-Molekül findet im entstandenen Nukleokapsid statt. Die Kapside mit dem reifen DNA-Genom werden nun entweder in den Zellkern transportiert

oder nach der Umhüllung über den sekretorischen Weg aus der Zelle ausgeschleust. Es wird vermutet, dass in frühen Infektionsstadien mit niedriger intrazellulärer HBsAg-Konzentration der Großteil der reifen Kapside in den Nucleus transportiert wird, um die Menge an cccDNA zu erhöhen (Newbold *et al.*, 1995), während die reifen Kapside in späteren Stadien der Infektion in Prä-Golgi-Kompartimenten umhüllt und über den Golgi-Apparat sezerniert werden (Bruss, 2004). Neben den infektiösen Viren werden auch nicht infektiöse, sphärische und filamentöse Partikel sezerniert. Durch den Befall benachbarter Hepatozyten startet ein neuer Infektionszyklus.



**Abb. 1.6: Lebenszyklus des HBV**

Der Lebenszyklus des HBV beginnt mit der Adsorption, der Penetration und dem *Uncoating* in Leberzellen. Im Zytoplasma erfolgt der Transport des Nucleokapsids zum Zellkern. Das virale Genom als entspanntes partiell doppelsträngiges DNA-Molekül (rcDNA) wird in die zirkulär geschlossene, supercoiled DNA-Form (cccDNA) überführt und gelangt in den Zellkern. Hier findet die Transkription der viralen Gene statt. Die mRNA-Spezies werden aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert. Dort beginnt die Translation der mRNAs: die Synthese des HBsAg (PreS2 und PreS1) und HBeAg findet am ER statt und schließt mit dem Transport über den Golgi-Apparat ab. Die Synthese des HBcAg, der Polymerase und des X-Proteins findet an freien Ribosomen im Zytoplasma statt. Die 3,3 kb lange mRNA dient als Prägenom (pgRNA). Die Initiation der Synthese des DNA-Stranges durch die virale Polymerase und das Verpacken des unvollständigen Genoms in Kapside findet im Zytoplasma statt. Abschließend werden die infektiösen Partikel, die zuvor am ER mit der HBsAg-haltigen Membran umgeben worden sind, freigesetzt. Der Rücktransport infektiöser Partikel zum Zellkern findet in der frühen Phase der Infektion statt, um eine ausreichende Anzahl an cccDNA-Molekülen im Zellkern zu gewährleisten. Neben infektiösen Viren werden auch nicht-infektiöse Partikel oder Sphären freigesetzt. (Quelle: [www.clinicaloptions.com](http://www.clinicaloptions.com))

## 1.2 Intrazellulärer Vesikeltransport

Die eukaryotische Zelle ist durch Membranen in unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt. Zwischen den einzelnen Kompartimenten sowie der Plasmamembran findet ein ständiger Austausch statt. Transportvesikel sorgen für den Transport von Proteinen und Lipiden zwischen den Kompartimenten. Fusioniert die Membran eines sekretorischen Vesikels mit der Plasmamembran und gibt seinen Inhalt in den extrazellulären Raum, so spricht man von Exozytose. Wird ein Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt und nimmt extrazelluläre Substanzen auf, so spricht man von Endozytose. Das wichtigste Transportsystem in eukaryotischen Zellen ist der intrazelluläre Vesikeltransport. Dieser ist ein sehr komplexer und genau kontrollierter Prozess und verläuft grundlegend in vier Schritten. (1) Die Ausstülpung ("*budding*") und Freisetzung des Vesikels von der Donormembran, (2) der Transport zur Ziellmembran, (3) das Andocken ("*tethering*") des Vesikels am Bestimmungsort und (4) die anschließende Fusion des Vesikels mit der Ziellmembran (Rothman, 1994). In den folgenden Kapiteln soll auf die beteiligten Proteine und deren Funktionen näher eingegangen werden.

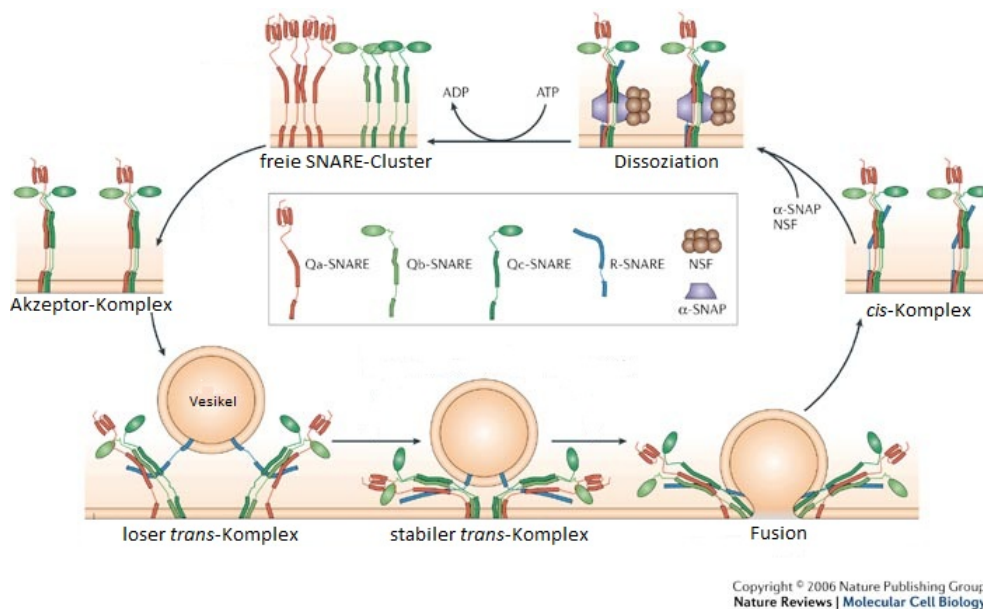
### 1.2.1 Rab-Proteine

Rab-Proteine (*Ras-related in brain*) gehören zur Gruppe der kleinen GTPasen aus der Ras-Familie und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation intrazellulärer Transportprozesse (Zerial und McBride, 2001). Beim Menschen sind über 60 Vertreter bekannt (Pereira-Leal und Seabra, 2001). Man unterscheidet die membranassoziierte aktive Form (Rab-GTP) und die lösliche inaktive Form (Rab-GDP) (Stenmark und Olkkonen, 2001). Rab-Proteine sind am sogenannten "*tethering*" beteiligt und sorgen für die Erkennung der Ziellmembran. In ihrer inaktiven Form liegen Rab-Proteine im Zytosol vor und stehen in Wechselwirkung mit REP (*Rab escort protein*) und GDI (*GDP dissociation inhibitor*). In ihrer aktiven Form sind sie an der Vesikelmembran lokalisiert und binden über einen Lipidanker an die Membran der Zielorganelle. Sobald der Kontakt zur Ziellmembran hergestellt ist, interagieren sie mit weiteren Proteinen, sogenannten Rab-Effektoren, welche den weiteren Andock-Prozess auf unterschiedliche Weise erleichtern. Sie üben diverse Funktionen in der Sortierung, dem Transport, der Verankerung und der Fusion von Vesikeln aus (Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997, Sönnichsen *et al.*, 2000, Grosshans *et al.*, 2006, Novick *et al.*, 2006). Rab-Proteine erleichtern das Zusammenfinden passender SNAREs an zwei unterschiedlichen Membranen (Martinez und Goud, 1998).

### 1.2.2 SNARE-Komplex

SNARE-Proteine (*soluble NSF attachment protein receptor*) sind für den Fusionsprozess des Vesikels mit der Ziellmembran verantwortlich. Sie werden ihrer Lokalisation entsprechend in Ziellmembran verankerte t-SNAREs (*target synaptosome-associated protein receptor*) und Vesikel

verankerte v-SNAREs (*vesicle synaptosome-associated protein receptor*) unterteilt (Söllner *et al.*, 1993). Alle SNARE-Proteine besitzen eine konservierte 60-70 Aminosäuren lange Domäne, das SNARE-Motiv, welches in mehreren Wiederholungen vorliegen kann (Bock *et al.*, 2001). Jede intrazelluläre Membran ist mit einem bestimmten Set an SNARE-Proteinen ausgestattet, die die Membranfusion ermöglichen. Durch die Bindung von v-SNARE und t-SNARE wird die Fusion eingeleitet (Rothman, 1994). Hierbei werden sehr stabile SNARE-Komplexe gebildet, welche aus jeweils vier parallel, in sogenannten "Coiled-Coils" angeordneten  $\alpha$ -Helices bestehen (Söllner *et al.*, 1993). Der zentrale Teil des Komplexes besteht aus 16 Ebenen hydrophober Aminosäuren, welche senkrecht zur Verdrillungsachse liegen. Durch polare Seitenketten stabilisiert befindet sich in der Mitte des Komplexes der sogenannte "0-layer". Der "0-layer" ist hochkonserviert und besteht meistens aus drei Glutaminen (Q) und einem Arginin (R). Abhängig von ihrer Position im Kernkomplex werden Q- und R-SNAREs unterschieden (Fasshauer *et al.*, 1998). Q-SNAREs lassen sich weiter unterteilen in  $Q_a$ ,  $Q_b$  und  $Q_c$ . Nur ein SNARE-Komplex, der jeweils genau ein Protein aus jeder der vier Untergruppen enthält, kann eine Fusion katalysieren (Jahn und Scheller, 2006). Der Aufbau des sehr stabilen SNARE-Komplexes setzt genug Aktivierungsenergie frei, um den Fusionsprozess durchzuführen (Fasshauer *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass die durch die Proteinfaltung frei werdende Energie während der Fusion auf die Membranen übertragen und für dessen Deformation verwendet wird (Fasshauer, 2003). Solange die Proteine noch in den gegenüberliegenden Membranen verankert sind, spricht man vom *trans*-SNARE-Komplex. Dieser relaxiert zum *cis*-Komplex, wenn die Phospholipidschichten der Membranen verschmelzen.



**Abb. 1.7: Konformationszyklus der SNARE-Proteine**

Die Q-SNAREs lagern sich auf der Membran zu einem Akzeptor-Komplex zusammen. Durch die Bindung des R-SNARE entsteht der *trans*-SNARE Komplex, welcher durch die Fusion der beiden Membranen zum *cis*-Komplex relaxiert. Dieser wird durch *alpha soluble NSF attachment protein* ( $\alpha$ -SNAP) und *N-Ethylmaleinimid-sensitive factor* (NSF) unter Aufwendung von Energie wieder gespalten. In der Membran liegen die Q-SNAREs nicht monomer, sondern in Clustern organisiert vor (modifiziert nach Jahn und Scheller, 2006).

### 1.2.3 NSF und SNAP

NSF (*N-Ethylmaleinimid-sensitive factor*) und SNAP (*soluble NSF attachment protein*) sind an der Spaltung von SNARE-Komplexen beteiligt. Der ubiquitär vorhandene zytoplasmatische NSF fungiert als eine ATPase (Wilson *et al.*, 1989, Tagaya *et al.*, 1993) und stellt die dafür notwendige Energie bereit, benötigt jedoch SNAP als weiteren Kofaktor. Beide Proteine binden an den SNARE-Komplex und führen zu dessen Dissoziation (Mayer, 2002). Somit wird der *cis*-Komplex zur Wiederverwertung unter ATP-Hydrolyse getrennt (Zhao *et al.*, 2007) und die Proteine werden durch Endozytose wieder in die verschiedenen Membranen zurücksortiert.

### 1.2.4 Sec1/Munc18 (SM)-Proteine

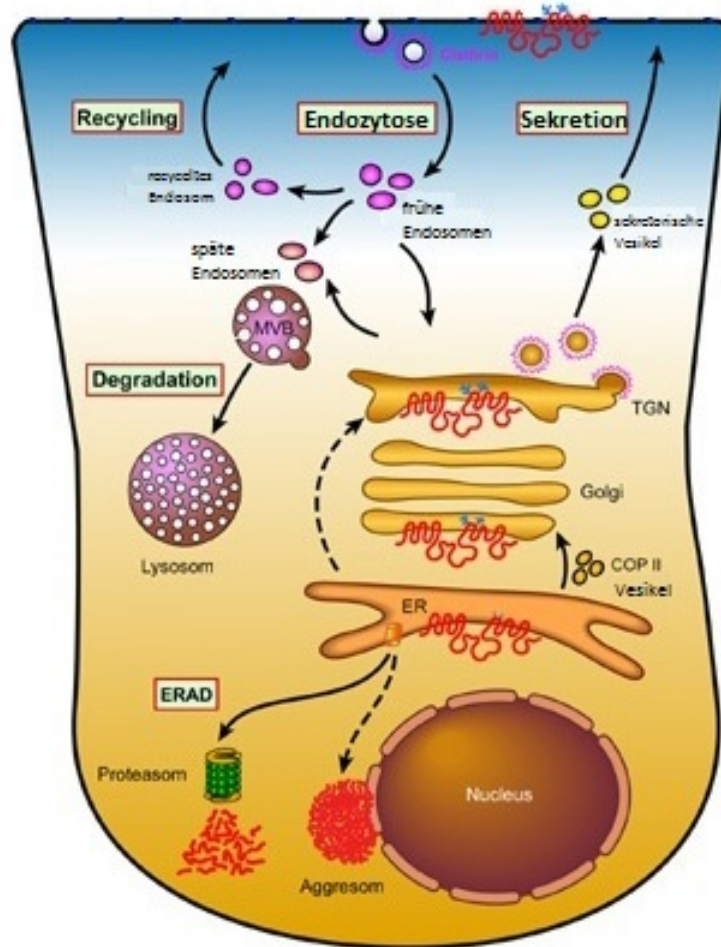
Es wird davon ausgegangen, dass die löslichen SM-Proteine vor und nach der Vesikellandockung mit den SNAREs interagieren. Sie gehören zu einer Familie konservierter, zytosolischer Proteine (Jahn und Scheller, 2006, Weimer und Richmond, 2005) und bestehen aus einer konservierten, 600 Aminosäuren langen Sequenz mit bogenförmiger Gestalt. In diesem Bogen können SM-Proteine ein Bündel aus vier  $\alpha$ -Helices binden, weshalb vermutet wird, dass sie die Fusion zeitlich und räumlich koordinieren, indem sie die SNAREs in fusogene Topologien arrangieren (Südhof und Rothman, 2009).

## 1.3 ESCRT-System

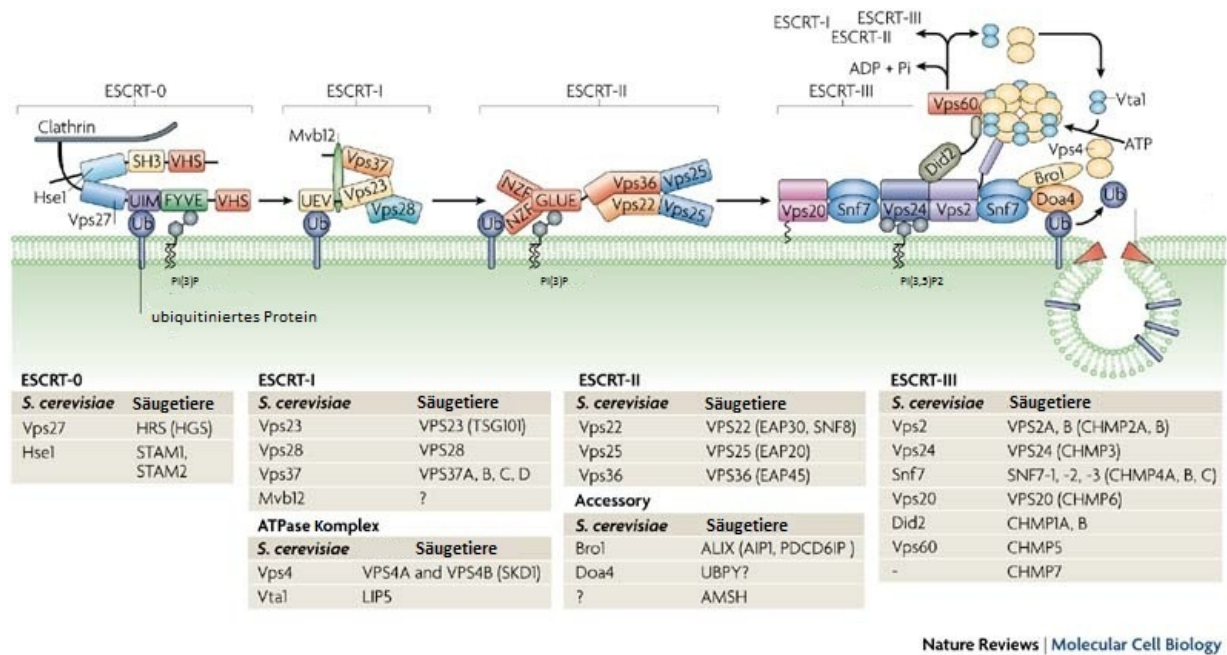
Bei jeder Form der Endozytose entstehen sogenannte Endosomen. Dies sind Vesikel, die in frühe (*early endosomes*) und späte (*late endosomes*) Endosomen unterteilt werden. Die frühen Endosomen sind in der Zellperipherie zu finden, die späten eher im Bereich des Zellkerns (siehe Abb.1.8). Proteine, die über Endosomen in das Lumen der Lysosomen gelangen sollen, sind durch eine Ubiquitinierung dafür markiert (Hicke und Dunn, 2003). Das ESCRT-System (*endosomal sorting complex required for transport*) erkennt die Ubiquitinierung und sortiert diese Proteine in die intraluminalen Vesikel (ILVs) (Hurley und Hanson, 2010, Huotari und Helenius, 2011). Hierfür müssen ein oder mehrere Ubiquitin-*Tags* an die zytosolischen Domänen von Membranproteinen binden. An diese *Tags* kann der ESCRT binden und sortiert die Proteine über eine Reihe von Komplexen (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III) in bestimmte Bereiche der endosomalen Membran, um sie in ILVs einzuschleusen. Späte Endosomen mit einer Vielzahl intraluminaler Vesikel werden auch multivesikuläre Körper (MVBs) genannt (Hurley und Hanson, 2010). Neben Ubiquitin stellt Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) eine weitere Andockmöglichkeit für das ESCRT-System dar (Christoforidis *et al.*, 1999, Behnia und Munro, 2005, Zerial und McBride, 2001). Hierbei wird Phosphatidylinositol durch eine Lipidkinase phosphoryliert (Huotari und Helenius, 2011). Nach Andocken des ESCRT-Komplexes an PI(3)P wird durch eine weitere Phosphatgruppe ein Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PI(3,5)P<sub>2</sub>).

Die initiale Erkennung der ubiquitinierten Membranproteine findet durch Vps27-Hse1 (ESCRT-0) über ein *ubiquitin-interacting motif* (UIM) statt. Vps27 besitzt außerdem eine FYVE-Domäne, welche an PI(3)P bindet und Vps23 (in Metazoen als *tumor susceptibility gene 101* (tsg101) bekannt) (ESCRT-I) über die Bindung an die *ubiquitin E2 variant domain* (UEV) am N-Terminus des Proteins rekrutiert. Das C-terminale Ende von Vps28 (ESCRT-I) stellt die Verbindung zum  $\gamma$ -förmigen ESCRT-II her. ESCRT-II interagiert mit ubiquitinierten Proteinen über die N-terminale *zinc fingers of Vps36* (ZNF1 und 2) und rekrutiert ESCRT-III. ESCRT-III formt nun eine multimere Aggregation an der Membran, leitet so die Invagination der endosomalen Membran ein und führt schließlich zur Abspaltung der Membran und Bildung der MVBs (Hurley und Hanson, 2010). Die notwendige Energie für diese Vorgänge liefert die AAA+ ATPase VPS4 (*vacuolar protein sorting protein*) durch die Hydrolyse von ATP. ESCRT-III ist außerdem an der Entfernung des Ubiquitins durch die Deubiquitylase Doa4 und der Dissoziation der ESCRT-Komplexe von der Membran durch die ATPase-Aktivität von Vps4 beteiligt. Statt mit Lysosomen zu fusionieren, können MVBs unter bestimmten Umständen auch mit der Plasmamembran fusionieren. Dadurch werden die luminalen Vesikel (jetzt Exosomen genannt) in das extrazelluläre Medium abgegeben.





**Abb. 1.8: Der Weg der Endosom-Reifung**  
 (Quelle: [www.med.unc.edu/cellbio/faculty-research/gentzsch](http://www.med.unc.edu/cellbio/faculty-research/gentzsch))



**Abb. 1.9: Das ESCRT-System**

Die initiale Erkennung der ubiquitinierten Membranproteine findet durch Vps27-Hse1 (ESCRT 0) statt. Dadurch werden ESCRT-I und -II aus dem Zytoplasma zum Endosom rekrutiert. Beide ESCRT-Komplexe binden an monoubiquitinierte Membranproteine. ESCRT-I aktiviert ESCRT-II, welches daraufhin die Formation von ESCRT-III bedingt. ESCRT-III formt nun eine multimerische Aggregation an der Membran, leitet so die Invagination der endosomalen Membran ein und führt schließlich zur Abspaltung der Membran und Bildung der MVBs. Die ATPase-Aktivität von Vps4 führt zur Dissoziation der ESCRT-Komponenten, welche anschließend für eine neue Sortierung von Proteinen zur Verfügung stehen. Studien in *Saccharomyces cerevisiae* (Hefen) führten zur Aufklärung über die Funktion der ESCRT-Komponenten. Die Bezeichnung der Komponenten in Säugetieren weicht teilweise ab (modifiziert nach Williams und Urbé, 2007).

Abgesehen von seiner Funktion der Bildung von MVBs ist das ESCRT-System außerdem bei weiteren wichtigen Vorgängen, wie der Zellteilung (Spitzer *et al.*, 2006, Carlton und Martin-Serrano, 2007, Morita *et al.*, 2007), der Autophagie (Filimonenko *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2007) und dem Ausschleusen von behüllten Viren (*virus budding*) (Morita und Sundquist, 2004, Fujii *et al.*, 2007) involviert.

## 1.4 ESCRT und HBV

Die HBV-Morphogenese weist erhebliche Ähnlichkeiten zur Morphogenese behüllter RNA-Viren auf, was darauf schließen lässt, dass verschiedene Virus-Klassen die Zelle durch ähnliche Mechanismen unter Beteiligung der ESCRT-Maschinerie verlassen (Lambert *et al.*, 2007). Für HBV konnte  $\gamma$ 2-Adaptin als ein wichtiger Co-Faktor im MVB-abhängigen "HBV-Zusammenbau" identifiziert werden (Lambert *et al.*, 2007). HBV stülpt sich von Membranen infizierter Zellen aus. Hier sind zwei endozytotische Proteine involviert: der Ubiquitin-interagierende Adapter  $\gamma$ 2-Adaptin sowie die

Ubiquitin-Ligase Nedd4.  $\gamma$ 2-Adaptin besitzt ein Clathrin-Bindungsmotiv, welches eine Interaktion mit Clathrin ermöglicht. Außerdem konnte eine Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin mit LHBs-Ag über ein Ubiquitin-Interaktions-Motiv (UIM) nachgewiesen werden, welches die Bindung an ubiquitinierte Proteine vermittelt (Rost *et al.*, 2008). Somit gilt  $\gamma$ 2-Adaptin als ein monomeres Adapterprotein und fungiert als Ubiquitin-Rezeptor (Rost *et al.*, 2008). Die Ubiquitinierung von Nedd4 erfolgt an dessen C2-Domäne. Abhängig von einer intakten UIM wird  $\gamma$ 2-Adaptin durch Nedd4 rekrutiert und selbst ubiquitiniert. Dieser Prozess wird auch als *coupled monoubiquitination* bezeichnet (Rost *et al.*, 2008, Katz *et al.*, 2002, Polo *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2004).

Ubiquitin-bindende Adapterproteine spielen eine Rolle bei der Vesikelentstehung an verschiedenen zellulären Membranen. Hier sind sie für die Sortierung der ubiquitinierten Proteine verantwortlich und rekrutieren zelluläre Komponenten, die der Vesikelabschnürung und -freilassung dienen. Hierfür müssen die Adapterproteine membranassoziiert sein, da nur so die Ubiquitin-Modifikation erfolgreich ablaufen kann (Rost *et al.*, 2008).

Durch die Depletion von  $\gamma$ 2-Adaptin konnten defekte, stark vergrößerte MVBs induziert werden, woraus geschlossen wurde, dass  $\gamma$ 2-Adaptin einen funktionellen Einfluss auf die Vesikelentstehung an den MVBs nimmt. Somit könnte es als Ubiquitin-Rezeptor an die Cargo-Proteine binden und den Kontakt zur ESCRT-Maschinerie herstellen (Rost *et al.*, 2008).

Die Umhüllung von HBV-Partikeln findet direkt an den MVBs statt (Lambert *et al.*, 2007). Mittels CD63, als Marker für späte Endosomen, konnte eine Colokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit dem LHBs-Ag und dem Core-Protein nachgewiesen werden (Rost *et al.*, 2006). In weiteren Immunfluoreszenzuntersuchungen wies man eine Colokalisation von  $\gamma$ 2-Adaptin mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 nach (Rost *et al.*, 2008). Durch die Interaktion von  $\gamma$ 2-Adaptin und Nedd4 könnte so das Nukleokapsid zum Ort der Virusmorphogenese gelangen und anschließend umhüllt und abgeschnürt werden (Rost *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Prozessen verläuft die Sezernierung der SVPs ESCRT-unabhängig (Lambert *et al.*, 2007). Die Morphogenese dieser SVPs ist weitestgehend unklar und Gegenstand aktueller Studien. Gebildet werden SVPs durch den eigenvermittelten Einbau des SHBs-Ag in verzweigte Filamente im Lumen des ER (Patient *et al.*, 2007). Diese Filamente werden anschließend gefaltet, in kristallähnliche Strukturen verpackt und von aus dem ER-stammenden Vesikeln zum *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) transportiert (Patient *et al.*, 2007). Das ERGIC, ein Kompartiment in eukaryotischen Zellen, vermittelt den Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat und ermöglicht dabei das Sortieren der Cargo-Proteine (Appenzeller-Herzog und Hauri, 2006). Im ERGIC werden die SVP-Filamente wieder entpackt und liegen entspannt vor. Aufgrund ihrer Größe und ihrer Form geht man davon aus, dass sie von sekretorischen Prozessen weitestgehend verschont bleiben. Das Auftreten von sphärischen Partikeln zeigt jedoch, dass SVPs doch gelegentlich sezerniert werden können (Patient *et al.*, 2007).

## 1.5 $\alpha$ -Taxilin

Wie bereits beschrieben findet der Proteintransport in eukaryotischen Zellen mit Hilfe von Transportvesikeln statt, die mit den entsprechenden Zielorganellen verschmelzen, um ihren Proteinhalt auszuschütten. Neueste Studien ergaben, dass das Membrantransportsystem bei der Zellteilung und besonders bei der Karzinogenese sowie der Tumorprogression verschiedener Tumore eine entscheidende Rolle spielt. Außerdem ist der Membrantransport an essentiellen Zellfunktionen wie Endo- und Exozytose, der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase sowie am Zellwachstum und an der Zellteilung beteiligt (Strömberg *et al.*, 2009). SNARE-Komplexe sowie dessen Bestandteil, das sogenannte Syntaxin, welches zur Familie der t-SNAREs gehört (Rathore *et al.*, 2010, Südhof und Rothman, 2009, Carr und Rizo, 2010, Angers und Merz, 2011), stellen die zentralen Regulatorproteine des Membrantransports dar. Das Protein  $\alpha$ -Taxilin wurde als wichtiger Bindungspartner von Syntaxin identifiziert, dessen Funktion *in vivo* allerdings noch unbekannt ist. Es ist wahrscheinlich, dass  $\alpha$ -Taxilin durch die Bindung an Syntaxin an dem post-Golgi-membrantransport beteiligt ist. Detailliertere Untersuchungen zeigten, dass Syntaxin-1a, -3 und -4  $\alpha$ -Taxilin spezifisch und dosisabhängig bindet (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a, Nogami *et al.*, 2004). Die Bindung zwischen  $\alpha$ -Taxilin und Syntaxin konnte jedoch durch SM-Proteine inhibiert werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass  $\alpha$ -Taxilin nur Syntaxin bindet, welches nicht Teil des SNARE-Komplexes ist. Es wird spekuliert, dass  $\alpha$ -Taxilin analog zu SM-Proteinen fungieren könnte (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die Proteinsequenz von  $\alpha$ -Taxilin eine Vielzahl an prolinreichen Motiven (sogenannten PXXP-Motiven) aufweist. Abgesehen von seiner Funktion, als potentielle Bindungsstelle für SH<sub>3</sub>-Domänen zu fungieren, spielen PXXP-Motive eine Rolle beim Transport sogenannter "*multivesikulärer bodies*" (MVBs). Ein MVB-abhängiger Transport wurde bereits beim HIV nachgewiesen. Das HIV-Protein gag interagiert über seine PXXP-Motive mit dem *tumor susceptibility gene 101* (tsg101) als Komponente des ESCRT-Systems und steuert so den MVB-abhängigen Transport (Garrus *et al.*, 2001, VerPlank *et al.*, 2001).

$\alpha$ -Taxilin ist außerdem in die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Exozytose in neuroendokrinen Zellen involviert (Nogami *et al.*, 2003). Des Weiteren ist die Menge an  $\alpha$ -Taxilin in tumorösem Gewebe höher als in nicht tumorösem, gesunden Gewebe ( $p < 0,05$ ). Außerdem korreliert die Expression von  $\alpha$ -Taxilin mit der Zellproliferation und dem malignen Potential des Tumors (Ohtomo *et al.*, 2010). In Nierenzellkarzinomen wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von  $\alpha$ -Taxilin in primären Tumoren sowie in Metastasen festgestellt (Mashidori *et al.*, 2011). Auch in hepatozellulären Karzinomen (HCCs), welche eine mögliche Folge der chronischen Hepatitis-B-Erkrankung sind, konnten höhere Mengen von  $\alpha$ -Taxilin in wenig differenzierten und invasiven HCCs ermittelt werden (Ohtomo *et al.*, 2010). Zusammenfassend konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von  $\alpha$ -Taxilin, dem Anstieg der Zellteilungsaktivität und einem geringer differenzierten histologischen Grad von HCC beobachtet werden. Die Menge von  $\alpha$ -Taxilin könnte somit als ein Marker für die Malignität eines Tumors/HCCs fungieren.

## 2 Zielsetzung

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Menge an  $\alpha$ -Taxilin in hepatozellulären Karzinomen, welches Folge einer chronischen HBV-Infektion sein kann, höher ist als in nicht-tumorösem Gewebe (Ohtomo *et al.*, 2010). Die genaue Funktion von  $\alpha$ -Taxilin im HBV-Lebenszyklus ist bisher jedoch nicht erforscht. Auch das Protein  $\alpha$ -Taxilin ist bisher sehr wenig charakterisiert. Es wurde als Syntaxin-4 bindendes Protein beschrieben (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a). Syntaxin-4 wiederum gehört zur Familie der t-SNAREs (Rathore *et al.*, 2010, Südhof und Rothman, 2009, Carr und Rizo, 2010, Angers und Merz, 2011). Allerdings bindet  $\alpha$ -Taxilin nur dann an Syntaxin-4, wenn dieses nicht Teil des SNARE-Komplexes ist. Aufgrund dieser Beobachtung vermutet man, dass  $\alpha$ -Taxilin als ein sogenanntes SM-Protein fungieren könnte und somit die für den Vesikeltransport essentielle Komplexbildung zwischen v-SNARE und t-SNARE modulieren könnte (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a). Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst der Effekt von HBV auf die Expression von  $\alpha$ -Taxilin *in vitro* und *in vivo* detailliert untersucht werden. Desweiteren soll durch Überexpressions- bzw. *knockdown*-Experimente der Einfluss von  $\alpha$ -Taxilin auf die HBV-Replikation genauer untersucht werden.

Wie andere Viren auch, ist HBV bei der Replikation auf die Wirtszelle angewiesen. Zelluläre Prozesse und Signalwege werden dabei so verändert, dass die Produktion infektiöser Viren gesichert ist. Die genauen Mechanismen der Interaktion zellulärer Signalwege mit dem Virus sind noch nicht vollständig verstanden und sollen in der vorliegenden Arbeit näher analysiert werden.

# 3 Material

## 3.1 Bakterienstämme und Zelllinien

### 3.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i> K12-Stamm, optimiert für molekulares Subklonieren und Plasmidexpression. Rekombinase A und Endonuklease A defizient.	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung und Herkunft
HuH7.5	Von HuH7 Zellen abstammende humane Hepatoblastom-Zelllinie (Blight <i>et al.</i> , 2002)
HepG2	Humane Hepatoblastom-Zelllinie (Knowles <i>et al.</i> , 1980)
HepG2.2.15	Humane Hepatoblastom-Zelllinie, welche das 2,15-fache HBV-Genom (Serotyp ayw, Genotyp D) im Chromosom beinhaltet. Dieses sorgt für eine vollständige Virusreplikation und entstammt der Hep-G2 Zelllinie (Sells <i>et al.</i> , 1987).
HepAD38	Humane Hepatoblastom-Zelllinie, welche ein 1.2-faches HBV-Genom (Serotyp ayw, Genotyp D) beinhaltet. Entstammt der HepG2-Zelllinie (Ladner <i>et al.</i> , 1997).
Primäre Tupaia-Hepatozyten	Isoliert aus Gewebeproben nach Hepatektomie
Primäre humane Hepatozyten	Isoliert aus Gewebeproben nach partieller Hepatektomie

Primäre Tupaia-Hepatozyten wurden freundlicherweise von Sabine MacNelly zur Verfügung gestellt (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg).

Primäre humane Hepatozyten sowie RNA HBV-positiver und-negativer Patienten wurden freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. Thomas Weiss zur Verfügung gestellt (Universitätsklinikum Regensburg).

## 3.2 Mäuse

Inzucht HBV-transgene Mäuse (C57BL/6-HBV1.3) wurde vom Zentrum für molekulare Biologie der Universität Heidelberg bezogen (Guidotti *et al.*, 1995, Guidotti *et al.*, 1996a).

## 3.3 Gewebeproben

Humane Leberschnitte von drei chronisch infizierten bzw. zwei HBV-negativen Patienten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Karin Klingel vom Institut für molekulare Pathologie der Eberhard Karls Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

## 3.4 Plasmide

### 3.4.1 Kommerziell erhältliche Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Hersteller
pUC18	Kontrollvektor	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.4.2 Hergestellte Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pJo19	1,2-faches HBV Genom, Serotyp ayw, Genotyp D	Dr. Joachim Lupberger
tsg101-FLAG	tsg101 Expressionskonstrukt	AG Prof. Dr. Barbara Schnierle
pDest26a- $\alpha$ TxIn	Kodiert $\alpha$ -Taxilin	ImaGenes, Berlin
pEGFP-Stx4	Syntaxin-4 Expressionskonstrukt	Daniela Ploen

### 3.5 Oligonukleotide

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')
Light Cycler		
#185	HBV_S_fwd	aac atg gag aac atc aca tca g
#186	HBV_S_rev	tat acc caa aga caa aag aaa att gg
#42	GAPDH_fwd	gac ccc ttc att gac ctc aac
#43	GAPDH_rev	tgg act gtg gtc atg agt cc
#280	alpha-Taxilin_HS_fwd	atg aag aac caa gac aaa aag a
#281	alpha-Taxilin_HS_rev	ctg gct gct gcc ggg ac
#312	Syntaxin-4_HS_fwd	gga ccc acg agc tga gac
#313	Syntaxin-4_HS_rev	gcg tgg cca gga tgg tg
#361	tsg101_HS_fwd	tat ttg gag atg aac ctc ca
#362	tsg101_HS_rev	atg gag aga ttc cac ctg gc
#359	VPS4_HS_fwd	gtt cgg acc ccc tgg cac ag
#360	VPS4_HS_rev	ggt tct tga cca gct ttt ca
#390	Syntaxin-4_MM_fwd	ctc agg tgc tgc ccg gtt
#391	Syntaxin-4_MM_rev	agc tgc gcc cgg acc tct
#392	alpha-Taxilin_MM_rev	ggg ccc cag gct gag c

Alle hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden von Biomers.net in Ulm hergestellt.

### 3.6 Antikörper

Die Primärantikörper und Sekundärantikörper für Western-Blots (WB) wurden in 10% Milchpulver oder 0,05% Tween in PBS, für die Immunfluoreszenz (IF) in 10% BSA oder 0,05% Tween in PBS verdünnt.

Antikörper	Spezies/Klonalität	Verdünnung (WB/IF)	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>			
Anti- $\beta$ -actin	Maus, monoklonal	1:10.000/ -	Sigma-Aldrich, Seelze
Anti- $\alpha$ -Taxilin (H-66)	Kaninchen, monoklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA
Anti- $\alpha$ -Taxilin (M-74)	Kaninchen, monoklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA



Antikörper	Spezies/Klonalität	Verdünnung (WB/IF)	Hersteller
<b>Anti-<math>\alpha</math>-Taxilin (A-6)</b>	Maus, monoklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA
<b>Anti-<math>\alpha</math>-Taxilin (N-17)</b>	Ziege, polyklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA
<b>Anti-tsg101 (C-2)</b>	Maus, polyklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA
<b>Anti-tsg101 (Y16J)</b>	Maus, monoklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA
<b>Anti-tsg101 (H-270)</b>	Kaninchen, polyklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA
<b>Anti-HBsAg (ab17183)</b>	Ziege, polyklonal	- /1:100	Abcam, Cambridge, GB
<b>Anti-Syntaxin-4 (ab57841)</b>	Maus, monoklonal	1:300/ -	Abcam, Cambridge, GB
<b>Anti-LHBsAg (MA 18/7)</b>	Maus, monoklonal	1:600/1:150	Göttingen Universität (Heermann et al., 1984)
<b>Anti-HBcAg (mab3120)</b>	Maus, monoklonal	- / 1:60	Institut of Immunology, Japan
<b>Anti-Lamin A (H-102)</b>	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -	Santa Cruz Biotech, USA
<b>PreS2</b>	Kaninchen, polyklonal	- /1:60	Beate Malkowski, Berlin
<b>Anti-TNF RI (C-20)</b>	Kaninchen, polyklonal	1:300/1:80	Santa Cruz Biotech, USA
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
<b>Anti-Maus IgG-HRP</b>	Schaf, polyklonal	1:2000/ -	GE Healthcare, Freiburg
<b>Anti-Kaninchen IgG-HRP</b>	Esel, polyklonal	1:2000/ -	GE Healthcare, Freiburg
<b>Anti-Ziege IgG-HRP</b>	Esel, polyklonal	1:5000/ -	Santa Cruz Biotech, USA
<b>Anti-Maus IgG-Alexa488</b>	Esel, polyklonal	-/1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Anti-Kaninchen IgG-Alexa488</b>	Esel, polyklonal	-/1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Anti-Ziege IgG-Alexa488</b>	Esel, polyklonal	-/1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Anti-Maus IgG-Cy3</b>	Esel, polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
<b>Anti-Kaninchen IgG-Cy3</b>	Esel, polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
<b>Anti-Maus IgG-Cy5</b>	Esel, polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
<b>Anti-Kaninchen IgG-Cy5</b>	Esel, polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
<b>Anti-Ziege IgG-Cy5</b>	Esel, polyklonal	-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
<b>Clean blot IP detection reagent (HRP)</b>		1:40/ -	Thermo Scientific, Belgien
<b>FITC-Phalloidin (0,1 mg/ml in DMSO)</b>		-/1:400	

## Material

---

Antikörper	Spezies/Klonalität	Verdünnung (WB/IF)	Hersteller
TRITC-Phalloidin (0,1 mg/ml in DMSO)		-/1:100	
DAPI (0.1 mg/ml stock in PBS)		-/1:400	

## 3.7 Größenstandards

---

### Protein Standards

---

PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder      Fermentas, St.-Leon-Rot

---

### DNA Standards

---

Gene Ruler<sup>TM</sup> 1kb DNA ladder      Fermentas, St.-Leon-Rot

---

## 3.8 Enzyme

---

### Enzyme

### Hersteller

DNase      PeqLab, Erlangen  
M-MuLV Reverse Transkriptase      Fermentas, St. Leon-Rot

---

## 3.9 Reagenzien für die Zellkultur

---

DMEM Medium (4,5 g/l Glucose, w/o L-Glutamin)	Lonza, Basel, Schweiz
DPBS ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )	PAA, Linz, Österreich
FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> )	PAA, Linz, Österreich
Hydrokortison (100 mg in PBS)	Sigma-Aldrich, Seelze
Insulin, bovin (50 mg in dd H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Glutamine	PAA, Linz, Österreich Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA, Linz, Österreich Biochrom, Berlin

Trypsin/EDTA

PAA, Linz, Österreich

### 3.10 Inhibitoren

Inhibitor	Wirkung auf	Hersteller
<b>Protease Inhibitoren</b>		
Aprotinin	Serin Proteasen (1 $\mu$ M)	Sigma-Aldrich, Seelze
Leupeptin	Serin- und Cystein-Proteasen (4 $\mu$ M)	Sigma-Aldrich, Seelze
Peptastin	saure Proteasen (1 $\mu$ M)	Sigma-Aldrich, Seelze
PMSF	Serin Proteasen (1 mM)	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Phosphatase Inhibitoren</b>		
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Phosphatasen	Sigma-Aldrich, Seelze

### 3.11 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden von CarlRoth, Karlsruhe oder von Sigma-Aldrich, Seelze, bezogen. Ausnahmen sind nachstehend aufgelistet:

GenAgarose LE	Genaxxon, Biberach/Riss
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	PAA, Linz, Austria
Butanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	J.T. Baker
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Genaxxon, Biberach/Riss
10x DNase-Puffer (mit $MgCl_2$ )	PeqLab, Erlangen
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Appllichem, Darmstadt
Formaldehyd 37%	J.T. Baker
peqGOLD TriFast	PeqLab, Erlangen
Polyethylenimin (PEI)	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein A/G Plus-Agarose (sc-2003)	Santa Cruz Biotech, USA
Random Hexamer Primer 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l	Fermentas, St. Leon-Rot
Revert Aid <sup>TM</sup> H Minus M-MuLV RT	Fermentas, St. Leon-Rot
5x Reaktionspuffer für M-MuLV RT	Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen

Tween-20	Genaxxon, Biberach/Riss
Xylol	Merck, Darmstadt

---

## 3.12 Verwendete Kits

---

Kit	Hersteller
<b>DNA-Aufreinigung</b>	
<i>High Pure Viral Nucleic Acid Purification Kit</i>	Roche GmbH, Mannheim
<b>ELISA</b>	
<i>Enzygnost HBsAg 6.0</i>	Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., USA
<i>Enzygnost HBeAg monoclonal</i>	Dade Behring, Marburg
<b>Gelextraktion</b>	
<i>peQGold Gel Extraction Kit</i>	PeqLab, Erlangen
<b>Plasmidpräparation</b>	
<i>Qiagen Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Hilden

---

## 3.13 Geräte

### 3.13.1 Elektrophorese- und Blotsysteme

---

Horizontales Elektrophorese System	GE Healthcare, Freiburg
Hoefer Elektrophorese Power Supply-EP301	GE Healthcare, Freiburg
Mighty small Multiple Gel Caster SE200 Series	GE Healthcare, Freiburg
Mighty small II Laufkammer	GE Healthcare, Freiburg
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
TE77 ECL-Semi-Dry Transfer Unit	AmershamBiosciences

---

### 3.13.2 Mikroskope

---

Axiophot Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss, Jena
Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510	Zeiss, Jena

---

Leica, Leitz DM RBE

Leica, Wetzlar

---

### 3.13.3 Software

---

AxioVision

Zeiss, Jena

Light Cycler<sup>R</sup> Software Version 3.5

Roche GmbH, Mannheim

LightCycler<sup>R</sup> 480 SW 1.5

Roche GmbH, Mannheim

LSM Image Browser

Zeiss, Jena

Photoshop CS2

Adobe, San Jose, USA

---

### 3.13.4 PCR Cycler

---

LightCycler<sup>R</sup> 1.5 Instrument

Roche, Mannheim

LightCycler<sup>R</sup> 480 System

Roche, Mannheim

---

### 3.13.5 Zentrifugen

---

Hereaus Fresco17 Zentrifuge

Thermo Scientific, Karlsruhe

Multifuge 1 S-R

Hereaus, Osterode

---

### 3.13.6 Sonstige

---

Analysewaage M-Power

Sartorius, Göttingen

Automatischer Filmentwickler Agfa Curix 60

Agfa, Köln

Dako Pen

Dako, Dänemark

DU<sup>R</sup>730 Life Science UV/VIS Spectrophotometer

Beckman Coulter

Hypercassette<sup>TM</sup>

Amersham Biosciences

INTAS-imaging system (Gel Dokumentation)

Intas, Göttingen

Neubauer Zählkammer

Carl Roth, Karlsruhe

pH-Meter Seven Easy

Mettler Toledo GmbH, Gießen

Präzisionswaage M-Power

Sartorius, Göttingen

Schüttelinkubator Inova 44

New Brunswick Scientific, Nürtingen

Sonopuls HD 2200

Bandelin GmbH, Berlin

Sterilwerkbank BBD 6220

Heraeus, Osterode

SterilGard<sup>R</sup> III Advance

The Baker Company, ME, USA

Stuart Roller Mixer SRT9

Bibby Scientific, UK

Tecan Infinite M1000	Tecan Group Ltd., Schweiz
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultrospec 1100 pro	Amersham Biosciences
Wasseraufbereiter Milli-Q A10	Millipore, Schwalbach
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach

---

### 3.14 Puffer, Lösungen und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Puffer und Lösungen mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einer MilliQ-Anlage der Firma Millipore hergestellt.

---

#### Puffer

---

<b>Anodenpuffer I</b>	20 % Ethanol (v/v) 300 mM Tris
<b>Anodenpuffer II</b>	20 % Ethanol (v/v) 25 mM Tris
<b>Kathodenpuffer</b>	20 % Ethanol (v/v) 40 mM 6-Aminohexansäure
<b>Co-IP-Lysepuffer</b>	0,1 % n-Octylglucopyranosid in PBS 1 mM PMSF 1 mM Na-Orthovanadat Phosphatase-Inhibitoren (1:1000)
<b>LB-Medium</b>	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 12 g Agar Agar
<b>Eindeckelmedium (Mowiol)</b>	10 % Mowiol (w/v) 25 % Glycerin (w/v) 2,5 % DABCO 100 mM Tris/HCl pH 8.5
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

---

	0,24 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4 ad 1 l $\text{H}_2\text{O}$
<b>RIPA Puffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,2 150 mM NaCl 0,1 % SDS (w/v) 1 % Na-Desoxycholat (w/v) 1 % Triton X-100
<b>SDS-Laufpuffer (10x)</b>	0,25 M Tris 2 M Glycine 1 % SDS (w/v) pH 8,3
<b>SDS-Ladepuffer</b>	4 % SDS (w/v) 125 mM Tris-HCl pH 6.8 10 % Glycerin (v/v) 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v)
<b>Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 8,8
<b>Sammelgelpuffer</b>	0,5 M Tris 0,4 % SDS (w/v) pH 6,7
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	2 M Tris 250 mM Natriumacetat 50 mM EDTA pH 8
<b>TBST (10x)</b>	200 mM Tris-HCl pH 7.4 1,5 M NaCl 0,5 % Tween
<b>TFB1-Puffer</b>	100 mM Rubidiumchlorid 50 mM Manganchlorid

	30 mM Kaliumacetat
	10 mM Calciumchlorid
	15 % Glycerin
	pH 5,8
<b>TFB2-Puffer</b>	10 mM MOPS
	10 mM Rubidiumchlorid
	75 mM Calciumchlorid
	15 % Glycerin
	pH 5,8

---

### Lösungen

---

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml
Chloramphenicol-Stammlösung	36 mg/ml
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 g Ethidiumbromid ad 100ml ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin-Stammlösung	30 mg/ml

---

### Medien

---

Medium für HuH7.5/HepG2.2.15/ HepG2	500 ml DMEM
	10 % FCS
	5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
	2 mM L-Glutamin
Medium für HepAD38	500 ml DMEM
	10 % FCS
	5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
	2 mM L-Glutamin
	25 µg Hydrokortison
	5 µg Insulin

---

## 3.15 Verbrauchsmaterialien

---

Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalobjektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm (ECL)	Amersham, England
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore, Schwalbach



Immobilon Western HRP Substrat	Millipore, Schwalbach
LightCycler Kapillaren (Polycarbonat)	Genaxxon, Biberach/Riss
Phase Lock Gel Heavy, 2 ml	5Prime, Österreich
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat	Thermo Scientific
Whatman Filterpapier	Fischer, Hannover
Zellkulturflaschen (T75/T175)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 12- und 24-Lochplatten)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschaber	TPP, Schweiz

---

# 4 Methoden

## 4.1 Zellbiologische Methoden

### 4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde der *E. coli* Stamm K12 DH5 $\alpha$  verwendet. Die Kultivierung erfolgte aerob in Flüssigmedium. Die Kulturen wurden in LB-Medium bei 37 °C für 16 h im Inkubationsschüttler inkubiert. Im Fall einer Resistenzselektion wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (100  $\mu$ g/ml Ampicillin). Kulturen für Plasmid-Maxipräparationen wurden aus Glycerolstocks in LB-Medium angeimpft und über Nacht wie beschrieben inkubiert. Zur dauerhaften Lagerung wurden 500  $\mu$ l einer Übernachtskultur mit 500  $\mu$ l 87 % Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

### 4.1.2 Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen

Die Zelllinien HepG2, HuH7.5 und HepG2.2.15 wurden in Komplettmedium (DMEM 4,5 g/l Glukose mit 10 % FCS, 0,1 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 91 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Im Falle von HepAD38 Zellen wurde dem Medium zusätzlich 5  $\mu$ g/ml Insulin und 25  $\mu$ g/ml Hydrokortison hinzugefügt. Für die Selektion lentiviral transduzierter *knockdown* Zellen wurde dem Medium 5  $\mu$ g/ml Puromycin zugesetzt. Bei etwa 70 % Konfluenz wurden die adhärenent wachsenden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA für 2-5 min. bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 7 ml FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen wurden resuspendiert und in neuem Medium verdünnt, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten.

### 4.1.3 Transfektion von Expressionsplasmiden

Die Zellen wurden mit Hilfe von linearem Polyethylenimin (PEI) (1 mg/ml) entsprechend des Protokolls von Ehrhardt und Kollegen (Ehrhardt, 2006) transfiziert. Hierfür wurde 1  $\mu$ g Plasmid-DNA mit 6  $\mu$ l PEI versehen, in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und für 10 s gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu 2 ml Medium der Zellen hinzugefügt. Nach 16 h wurde das Medium gewechselt.

## 4.1.4 Ernte und Lyse von eukaryotischen Zellen

### 4.1.4.1 Proteinlysate

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 200 - 300  $\mu$ l RIPA-Puffer (siehe 3.14) lysiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst, in Eppendorfröhrchen überführt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13300 rpm wurde die Proteinkonzentrationsbestimmung im Überstand mittels Bradford bestimmt (siehe 4.3.1). Für Western-Blot-Analysen wurden Zellen in 6-Loch-Platten in einer Konzentration von 0,5 -  $1 \times 10^6$  Zellen ausgelegt.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Gewinnung kompetenter *E. coli*

Um die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien zu gewährleisten, müssen diese hierfür aufnahmefähig gemacht werden. Durch die Behandlung der *E. coli* Bakterien mit Calcium-Ionen wird die Permeabilität der Membran erhöht und somit die Aufnahmefähigkeit der Bakterien gegenüber freier DNA aus dem Medium gesteigert. Um kompetente Bakterien zu generieren, wurden 200 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,3 - 0,4$ ) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert und in 50 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Nach 90-minütiger Inkubation wurden diese erneut abzentrifugiert und in 15 - 20 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert (50 - 100  $\mu$ l) und in einer Trockeneis/Ethanol-Mischung eingefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

### 4.2.2 Transformation von *E. coli* mit rekombinanter DNA

Für die Transformation chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen wurden 50 - 100 ng Plasmid-DNA mit 100  $\mu$ l kompetenten Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte mittels Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurden 500  $\mu$ l vorgewärmtes LB-Medium pro Ansatz hinzugefügt und für 60 min auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde bei 5000 g zentrifugiert, das Pellet in 100  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert, um ausschließlich das Wachstum der transformierten Bakterien mit der jeweiligen Resistenz zu gewährleisten. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

### 4.2.3 Präparation und Konservierung von Plasmiden

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde das *Plasmid Maxi Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers Qiagen verwendet. Das Prinzip beruht auf dem von Birnboim und Doly beschriebenen Verfahren, bei dem Bakterien unter alkalischen Bedingungen partiell lysiert und die Proteine denaturiert werden (Birnboim und Doly, 1979). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 300 ml Übernachtskultur. Anschließend wurden die Plasmide bei -20 °C gelagert.

### 4.2.4 Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA

Die Quantifizierung der gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm. Eine Extinktion von 1 entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Der Reinheitsgrad der DNA wurde durch das Verhältnis der Extinktionen von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  ermittelt. Liegt dieser Wert unter 1,8 - 2,0, spiegelt dies eine Verunreinigung durch Proteine wider.

Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$A = \varepsilon * c * d$$

$A$  = Absorption;  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient;  $c$  = Konzentration;  $d$  = Schichtdicke der Küvette

### 4.2.5 Agarosegelelektrophorese und Reinigung der DNA

Die Auftrennung der DNA- bzw. RNA-Moleküle erfolgte je nach ihrer Größe in 1-2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer. Die Agarose wurde in gewünschter Konzentration mit TAE-Puffer versetzt und unter Rühren zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung der flüssigen Agarose wurde diese mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Ladekamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE als Laufpuffer bedeckt. 1-10 µl der aufzutrennenden DNA bzw. RNA wurde mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 80 - 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels eines UV-Transilluminators und konnte durch das INTAS-Imaging-System dokumentiert werden. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in Nukleinsäuren interkalieren kann. Durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm werden die in die DNA eingelagerten Ethidiumbromid-Moleküle zu einer sichtbaren Fluoreszenz ( $\lambda = 590$  nm) angeregt und emittieren Licht im orange-roten Bereich (Sharp *et al.*, 1973). Zur Bestimmung der Basenzahl wurde ein entsprechender Längenstandard mit aufgetragen.

Bei der präparativen Agarosegelelektrophorese wurde nach Auftrennung der Fragmente das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels *peQGold*

*Gel Extraction Kit* nach dem Protokoll des Herstellers *peqLab* gereinigt. Die DNA wurde in 25 - 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 4.2.6 RNA-Isolierung

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA erfolgte mit Hilfe des *peqGOLD-TriFast<sup>TM</sup>*- Reagenzes. Die Methode beruht auf einer Ein-Schritt-Flüssigphasenseparation, entwickelt von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/Loch ausgelegt. Die Transfektion erfolgte wie in 4.1.3 beschrieben. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 400  $\mu\text{l}$  Trizol lysiert. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen abgeschabt, die Lösung von jeweils zwei Löchern gepoolt und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Die Proben wurden für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit 160  $\mu\text{l}$  Chloroform gemischt, in PhaseLock-Röhrchen überführt und für weitere 5 min zentrifugiert. Die RNA-enhaltende wässrige Phase wurde mit 400  $\mu\text{l}$  Isopropanol gemischt, invertiert und nach 2 - 3 min Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert. Das Waschen der gefällten RNA erfolgte mit 75 % Ethanol. Je nach Größe des Pellets wurde die RNA in 15 - 25  $\mu\text{l}$  DEPC H<sub>2</sub>O gelöst. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13300 rpm und 4 °C. Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe eines Agarosegels (siehe 4.2.5) überprüft.

#### 4.2.7 cDNA-Synthese

Um DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde im Anschluss an die RNA-Isolierung ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  DNase I und 1,2  $\mu\text{l}$  10x DNase Puffer zu 4  $\mu\text{g}$  RNA pipettiert und mit DEPC H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 12  $\mu\text{l}$  gebracht. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend die DNase I für 5 min bei 90 °C inaktiviert. Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde die RNA mit einem Gemisch aus 0,2  $\mu\text{g}$  kurzen DNA-Nukleotiden (*Random Hexamer Primer*), 10 mM dNTP's, 4  $\mu\text{l}$  RT-Puffer und 1  $\mu\text{l}$  (20 u) reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die Erststrangsynthese erfolgte nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h bei 42 °C, die Inaktivierung der RT 10 min bei 72 °C. Die cDNA wurde in einer Verdünnung von 1:10 für die PCR-Amplifikation (siehe 4.2.8) eingesetzt.

#### 4.2.8 Real-time PCR (RT-PCR)

Für die quantitative Analyse von DNA-Sequenzen wurde das LightCycler 1.5 System von Roche verwendet. Das Prinzip der Quantifizierung basiert auf einer Einlagerung des DNA-bindenden Farbstoffes *Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green qPCR Kit* (Fermentas) in die doppelsträngige DNA während der PCR Reaktion. Je höher der Gehalt an spezifischer DNA, umso stärker ist die Intensität der Fluoreszenz, welche nach jedem Zyklus gemessen wird. Mit Hilfe von Standards bekannter

Konzentration kann somit die Menge an DNA-Menge quantifiziert werden. Die RT-PCR erfolgte nach in Tab. 4.1 aufgeführtem Programm.

Programm	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Temperaturabnahme (°C/s)	Zyklen
<b>einleitende Denaturierung</b>	95	600	20	1
<b>Denaturierung</b>	95	15	20	45
<b>Annealing</b>	56	30	20	
<b>Elongation</b>	72	30	5	
<b>Schmelzkurve</b>	95	60	20	1
	60	30	20	
	95	0	0,1	
<b>"Cooling"</b>	40	30	20	

Tab. 4.1: Real time PCR-Programm

## 4.3 Proteinbiochemische Methoden

### 4.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay

Um gleiche Proteinmengen in den Experimenten einzusetzen, wurden die Proteinkonzentrationen in Zelllysaten mittels der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Die Methode beruht auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 und dessen resultierende Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm (Bradford, 1976). Das Zelllysate wurde mit dem Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:200 gemischt und anschließend die Extinktion bei 595 nm gemessen.

### 4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli wurden die mit SDS beladenen, reduzierten und denaturierten Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das Gel besteht aus einem Trenngel, welches mit einem Sammelgel überschichtet wird. Die Zusammensetzung des Trenngels ist in Tab. 4.2 dargestellt und wird abhängig vom Molekulargewicht des Proteins von Interesse bestimmt. Zur Denaturierung wurden jeweils 75 - 100 µg Protein in 1x SDS-PAGE Probenpuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt und bei 80 - 100 V in einer vertikalen Kammer elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 4.2: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

Sammelgel	4 %	Trenngel	8 %	10 %	12 %
Rotiphorese 40 (29:1)	6 ml	Rotiphorese 40 (29:1)	16 ml	20 ml	24 ml
Sammelgelpuffer (4x)	15 ml	Trenngelpuffer (4x)	20 ml	20 ml	20 ml
H <sub>2</sub> O	39 ml	H <sub>2</sub> O	44 ml	40 ml	36 ml
TEMED	40 $\mu$ l	TEMED	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l
APS	SSP	APS	SSP	SSP	SSP

### 4.3.3 Western-Blot-Analyse (WB-Analyse)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert, wo sie aufgrund starker hydrophober Interaktionen haften bleiben. Der Transfer erfolgte nach dem diskontinuierlichen Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems bei 1,3 mA/cm<sup>2</sup> (Tobwin et al., 1984) für 1 h. Der Blot wurde wie in Abb.4.1 dargestellt aufgebaut.

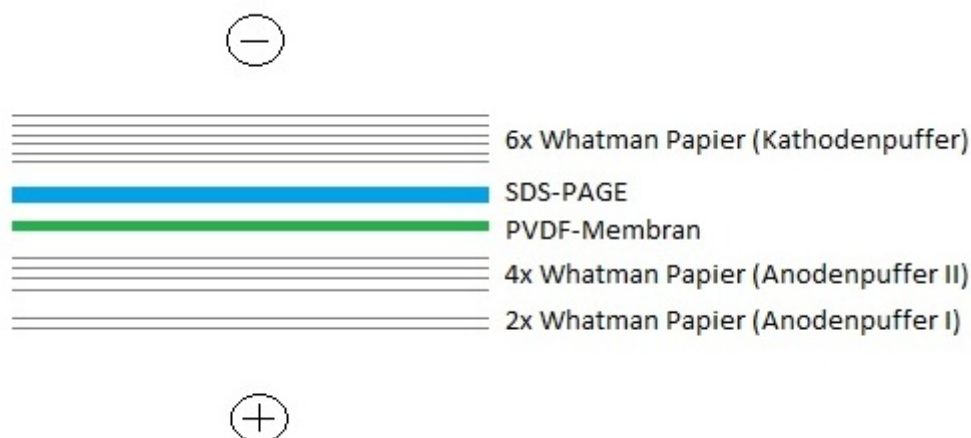


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau eines Western-Blots

Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu sättigen, wurde die Membran nach dem Transfer für 1 h in 10 % Milchpulver in TBS/T inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, der ebenfalls in 10 % Milchpulver in TBS/T verdünnt wurde, für 1 h bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler. Nicht gebundene Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen in TBS/T entfernt. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (10 % Milchpulver in TBS/T) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurde der Blot mit dem ECL-System nach Herstellerangaben entwickelt. Als Substrat diente ein 1:1 Gemisch aus *Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Solution* und *Immobilon Western HRP Substrate Luminol Reagent*. Die gekoppelte Peroxidase

am sekundären Antikörper setzt das Substrat um, was zu einer Emittierung von Lichtquanten bei einer Wellenlänge von 425 nm führt. Die Detektion der Lichtquanten erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms, der anschließend im automatischen Filmentwickler (Agfa Curix 60) entwickelt wurde.

## 4.4 Immunologische Methoden

### 4.4.1 Coimmunpräzipitation (Co-IP)

Für die Immunpräzipitation wurde eine Zellkulturflasche (T75) mit HepG2- /HepAD38- oder HuH7.5- Zellen mit je 8  $\mu\text{g}$  Plasmid transfiziert. Zwölf h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, nach 48 h wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit 800  $\mu\text{l}$  Co-IP-Lysepuffer lysiert, abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 5 min bei 13300 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit 30  $\mu\text{l}$  Protein A/G- Sepharose in einem neuen Reaktionsgefäß für 30 min bei 4 °C auf einem Schüttler präinkubiert. Die Protein A/G- Sepharose wurde für 5 min bei 13300 rpm und 4 °C pelletiert und der Überstand wurde in 300  $\mu\text{l}$  Aliquots in Eppendorfröhrchen überführt. Für die Präzipitation wurden 5  $\mu\text{g}$  Antikörper zum Überstand gegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 30  $\mu\text{l}$  Protein A/G- Sepharose wurden die Proben für 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert, um die Präzipitate zu gewinnen. Diese wurden zweimal mit Co-IP-Lysepuffer gewaschen und schließlich zusammen mit 60  $\mu\text{l}$  4x SDS-Probenpuffer auf eine SDS-PAGE aufgetragen (siehe 4.3.2).

### 4.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation und Verteilung von Proteinen wurden permeabilisierte Zellen mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Hierfür wurden HuH7.5-Zellen in einer 12-Loch-Platte auf Deckgläsern in einer Konzentration von  $3,5 \times 10^4$  ausgelegt, mit 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA transfiziert und nach 48 h mit 3,7 % Formaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Unspezifische Antikörperbindungen wurden nach zweimaligem Waschen in PBS durch Inkubation in 10 % BSA in 1x TBS/T für 1 h gesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 1 h in 10 % BSA in TBS/T in einer feuchten Kammer. Zur Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts wurde Fluorochrom-konjugiertes Phalloidin eingesetzt. Zellkerne wurden mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) gefärbt. Nach 3-maligem Waschen der Zellen in PBS wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern eingedeckelt. Um Eigenfluoreszenz der Zellen bzw. Kreuzreaktionen der Antikörper zu erkennen, wurden Kontrollen ohne primären Antikörper verwendet. Die Auswertung der indirekten



Immunfluoreszenz erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Zeiss) (siehe 4.5.1).

#### **4.4.3 Enzym-linked-immunosorbent-assay (ELISA)**

Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren, mit dessen Hilfe Proteine und Proteinfragmente nachgewiesen werden können (Ausubel et al., 2002). Beim Sandwich-ELISA bindet das in der Probe vorhandene HBe- bzw. HBs-Antigen an den in der Mikrotitrationsplatte immobilisierten monoklonalen Antikörper. In einer zweiten Reaktion werden Peroxidase-konjugierte monoklonale Antikörper an die Antigen determinanten gebunden. Die gebundene Enzymaktivität des Konjugates wird bestimmt und ist durch eine Farbreaktion sichtbar. Die Farbintensität ist proportional zur Konzentration an HBe- bzw. HBsAntigen. Der ELISA wurde entsprechend den Hersteller-Angaben der Firma Siemens durchgeführt und im *Tecan Reader* ausgewertet.

### **4.5 Mikroskopie**

#### **4.5.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)**

Fluoreszenz-markierte Proteine wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops analysiert und konnten mit der LSM Image Browser Software dokumentiert werden. Die Besonderheit der CLSM liegt darin, dass nur emittiertes Licht einer fokalen Ebene detektiert wird, während das Licht, welches nicht aus dieser Ebene stammt, durch die konfokal zur Fokusebene angeordnete Lochblende herausgefiltert wird. Die fluoreszenz-markierten Proteine auf einem Präparat werden mit Licht spezifischer Wellenlängen angeregt. Bei der CLSM wird das Präparat Zeile für Zeile sequentiell abgerastert und die im Photomultiplier detektierten Lichtemissionen werden an einen angeschlossenen Computer übertragen. Durch das Zusammenfügen mehrerer gescannter Ebenen erhält man ein dreidimensionales Bild einer Zelle. (Claxton, Fellers, Davidson; 2006)

### **4.6 Methoden zur Charakterisierung HBV-transgener Mäuse**

Um HBV-transgene und nicht-transgene Mäuse unterscheiden zu können, wurden HBsAg-ELISAs vom Blutserum der Mäuse (siehe 4.4.3) durchgeführt.

#### **4.6.1 Serumgewinnung von Mäusen**

Um das Blutserum von transgenen und nicht-transgenen Mäusen untersuchen zu können, wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen bzw. bei getöteten Mäusen das Herz punktiert. Um die Blutgerinnung zu verhindern, wurden dem Blut 50 µl 0,5 M EDTA zugegeben und zur

Serumgewinnung für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde bei -20 °C gelagert.

#### **4.6.2 Messung von ALT und AST**

Kommt es zu einer Schädigung von Leberzellen, so steigt die Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) im Blut stark an. Sie kann somit als Maß für die Schädigung der Leber herangezogen werden. Für die Bestimmung dieser beiden Enzyme wurde das Reflotron-Testsystem nach Angaben des Herstellers Roche verwendet und die Aktivität in enzymatischen Einheiten pro Liter (U/l) angegeben.

#### **4.6.3 Gewinnung von Organen**

Zur Gewinnung der Organe wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wurde die Bauchhöhle durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet und die Leber entnommen. Die Leber wurde in drei gleiche Teile geteilt und für die entsprechenden Versuche z.T. unterschiedlich gelagert. Für Paraffinschnitte wurden die Organproben in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Gewebe im Einbettmedium *Tissue-Tag* eingebettet und bei -80 °C gelagert. Für RNA und Proteinlysate wurden die Organproben mit einem Skalpell auf einem vorgekühlten Metallblock in kleine Stücke geschnitten und bei -80 °C gelagert.

#### **4.6.4 Präparation von Organlysaten**

Um die Proteine in den Organproben analysieren zu können, wurden Gewebestücke mit Hilfe eines Homogenisators (*Douncer*) zusammen mit 1 ml RIPA-Puffer lysiert und anschließend für 10 min bei 13300 rpm zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde, wie in 4.3.1 beschrieben, bestimmt.

#### **4.6.5 Isolierung von RNA aus Lebergewebe**

Zur Isolierung von RNA aus Lebergewebe wurden die Gewebestücke mit Hilfe eines Homogenisators (*Douncer*) zusammen mit 1 ml Trizol-Reagenz lysiert und anschließend, wie in 4.2.6 beschrieben, weiterverarbeitet.

#### **4.6.6 Paraffinpräparate und Färbeverfahren**

Die Paraffinpräparate der Lebern wurden freundlicherweise von Frau M. Wingerter unter der Leitung von Herrn Dr. R. Plesker aus der Abteilung 4/0 des Paul-Ehrlich-Instituts angefertigt.

Die Hämatoxolin-Eosin-Färbung (nach Mayer) wurde von Frau Wingerter nach Standardmethoden durchgeführt.

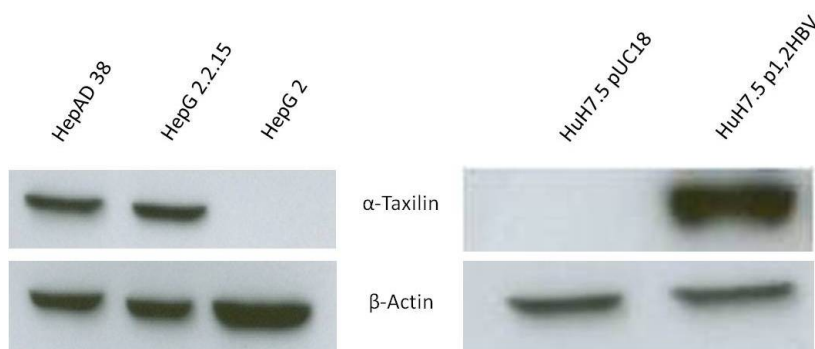
#### **4.6.7 Immunfärbung von Paraffinschnitten**

Zur Beurteilung der  $\alpha$ -Taxilin-Expression im Mausmodell wurden Paraffinschnitte von Lebern angefärbt. Hierzu wurden die auf Objektträgern fixierten Leberschnitte in Färbeküvetten zunächst für 15 min in Xylol, anschließend für 10 min in 99 % Ethanol und 10 min in 75 % Ethanol deparaffiniert und schließlich für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Reduzierung der Autofluoreszenz der Leberzellen wurden die Schnitte für 30 min in 3,7 % Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation in 10 % BSA in 1x TBS/T für 1 h gesättigt. Mit Hilfe eines Dako Pens wurden die Organproben umrandet und schließlich mit 50 - 100  $\mu$ l Primärantikörper für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x TBS/T folgte die Inkubation mit dem fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper, ebenfalls für eine Stunde. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Nach erneutem dreimaligen Waschen in 1x TBS/T wurden Deckgläschen mit Hilfe von Mowiol auf den Objektträgern eingedeckelt. Die Auswertung der Leberschnitte erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (siehe 4.5.1).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Erhöhte Mengen $\alpha$ -Taxilin in HBV-exprimierenden Zellkulturen

Expressionsuntersuchungen transgener Mäuse, welche das regulatorische Protein NS5A des Hepatitis-C-Virus (HCV) leberspezifisch überproduzieren, ergaben, dass NS5A eine deutliche Deregulation der  $\alpha$ -Taxilin-Expression bedingt (Kriegs *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Hepatitis-B-Virus auf die Expression von  $\alpha$ -Taxilin analysiert werden. Dazu wurde zunächst der Gehalt von  $\alpha$ -Taxilin in stabilen und transienten Zellsystemen untersucht und dessen Menge mit verschiedenen Methoden bestimmt. Western-Blot-Analysen zellulärer Lysate stabil HBV-exprimierender Zelllinien (HepAD38- und Hep2.2.15-Zellen) sowie HBV-negativer HepG2-Zellen zeigten, dass in HBV-replizierenden Zellen die Menge an  $\alpha$ -Taxilin deutlich erhöht ist. Um den beobachteten Effekt im transienten Transfektionssystem zu bestätigen, wurden HuH7.5-Zellen transient mit einem 1,2-fachen HBV-Genom (p1,2 HBV) bzw. als Kontrolle mit dem Leervektor pUC18 transfiziert. Die Analyse der Lysate mittels Western Blot zeigte, dass auch in transient HBV-exprimierenden Zellen eine deutlich erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin im Vergleich zu Kontrollzellen gefunden wird (siehe Abb 5.1).

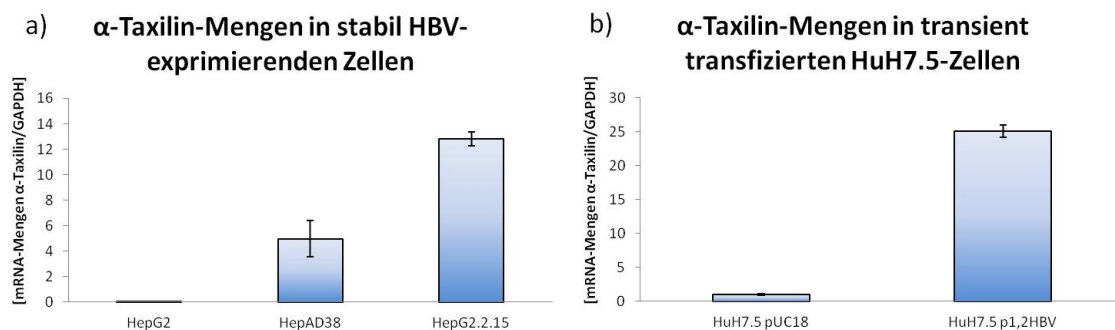


**Abb. 5.1: Erhöhte Mengen  $\alpha$ -Taxilin in HBV-exprimierenden Zellen**

Western-Blot-Analyse zellulärer Lysate von HBV-positiven (HepAD38 und HepG2.2.15) sowie HBV-negativen (HepG2) Zellen unter der Verwendung eines  $\alpha$ -Taxilin-spezifischen Antikörpers. Die HuH7.5-Zellen wurden mit dem 1,2-fachen HBV-Genom (p1,2HBV) bzw. dem Kontrollvektor (pUC18) transfiziert.  $\beta$ -Actin wurde als Gesamtprotein-Ladekontrolle mittels eines anti- $\beta$ -Actin-Serums detektiert.

Um zu untersuchen, ob die erhöhten Mengen an  $\alpha$ -Taxilin in HBV exprimierenden Zellen durch eine verstärkte Expression und nicht durch einen verminderten Abbau von  $\alpha$ -Taxilin bedingt sind,

wurde die Menge  $\alpha$ -Taxilin-spezifischer Transkripte mittels quantitativer PCR (qPCR) bestimmt. Hierfür wurde gesamtzelluläre RNA von HBV-positiven und -negativen Zellen isoliert (siehe 4.2.6), durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 4.2.7) und die mRNA-Menge mittels RT-PCR (siehe 4.2.8) unter Verwendung von  $\alpha$ -Taxilin-spezifischen Oligonukleotiden (#185, #186) bestimmt. Die  $\alpha$ -Taxilin Mengen wurden jeweils auf das konstitutiv exprimierte Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) unter Verwendung spezifischer Primer (#42, #43) normalisiert. In Abbildung 5.2 sind die Ergebnisse der RT-PCR graphisch dargestellt. In HBV-exprimierenden Zellen - sowohl im transienten, als auch im stabilen System - liegt eine deutlich erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin-spezifischen Transkripten im Vergleich zur Kontrolle vor. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die stabile als auch die transiente Expression replikationsfähiger HBV-Genome eine verstärkte Expression von  $\alpha$ -Taxilin bedingt, was sich auch in der deutlich erhöhten Menge an  $\alpha$ -Taxilin in den Lysaten HBV-exprimierender Zellen widerspiegelt.

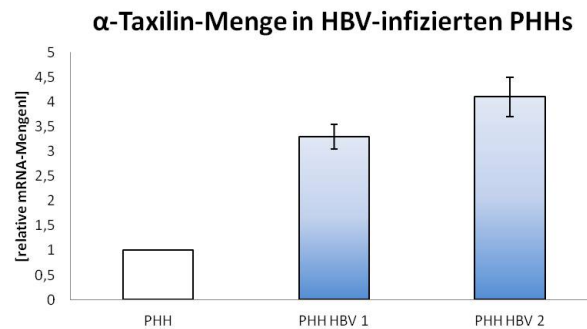


**Abb. 5.2: Erhöhte  $\alpha$ -Taxilin-Mengen in HBV-replizierenden Zellen**

Gesamtzelluläre RNA HBV-negativer (HepG2, HuH7.5 pUC18) und -positiver (HepAD38, HepG2.2.15, HuH7.5 p1,2HBV) Zellen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung  $\alpha$ -Taxilin-spezifischer Primer mittels qPCR analysiert. Die Grafiken stellen die auf GAPDH bezogenen Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ( $n=3$ ) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dar.

## 5.2 Erhöhte Mengen von $\alpha$ -Taxilin *in vivo*

Die oben beschriebenen Experimente zeigten, dass HBV *in vitro* die Expression von  $\alpha$ -Taxilin verstärkt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch in HBV-infizierten Zellen zu beobachten ist, wurden primäre humane Hepatozyten (PHH) mit HBV infiziert und die  $\alpha$ -Taxilin Expression mittels qPCR analysiert. Die Ergebnisse der Infektionsexperimente bestätigen die vorherigen Beobachtungen in stabil HBV-replizierenden Zellkultursystemen (siehe Abb. 5.3).

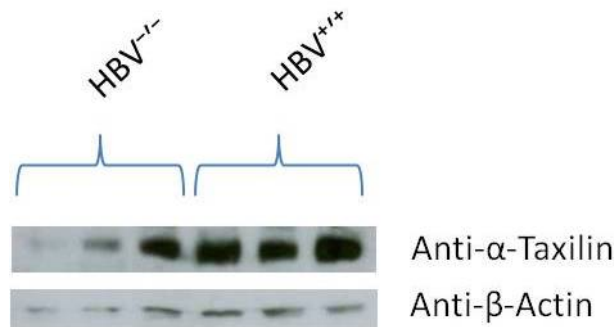


**Abb. 5.3: Erhöhte Mengen  $\alpha$ -Taxilin in HBV-infizierten PHHs**

Primäre humane Hepatozyten zweier unterschiedlicher PHH-Isolate wurden mit HBV infiziert (PHH HBV 1 und 2). Die gesamtzelluläre RNA infizierter sowie unbehandelter Kontrollzellen wurde isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die  $\alpha$ -Taxilin-mRNA-Menge mittels qPCR bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Grafik stellt die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ( $n=3$ ) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dar.

### 5.2.1 Expression von $\alpha$ -Taxilin in HBV-transgenen Mäusen

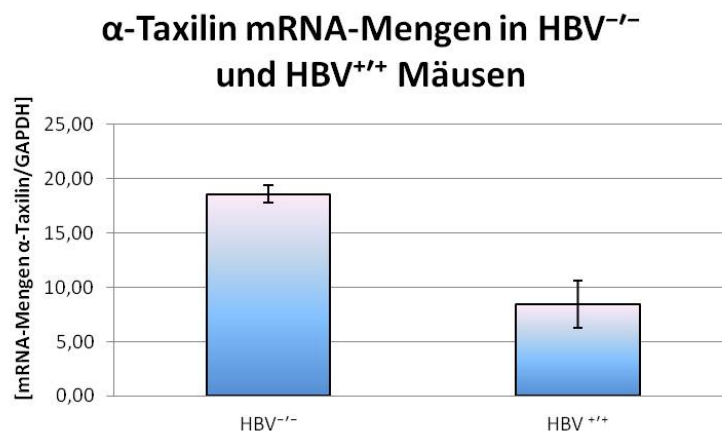
In den vorangegangenen Experimenten konnte beobachtet werden, dass in stabilen und transienten Zellsystemen (*in vitro*) sowie *in vivo* die Menge an  $\alpha$ -Taxilin in infizierten PHHs erhöht ist. Um die  $\alpha$ -Taxilin Expression in einem weiteren System *in vivo* zu untersuchen, wurden Leberzelllysate von HBV-transgenen und nicht-transgenen Kontrollmäusen mittels WB analysiert. Die WB-Analysen ergaben auch in HBV-transgenen Mäusen eine erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin (siehe Abb. 5.4).



**Abb. 5.4: Erhöhte Mengen  $\alpha$ -Taxilin in HBV-transgenen Mäusen**

Western-Blot-Analyse von Leberlysaten jeweils drei HBV-transgener und nicht transgener Mäuse unter der Verwendung eines  $\alpha$ -Taxilin-spezifischen Antikörpers.  $\beta$ -Actin wurde als Gesamtprotein-Ladekontrolle mittels eines anti- $\beta$ -Actin-Serums detektiert.

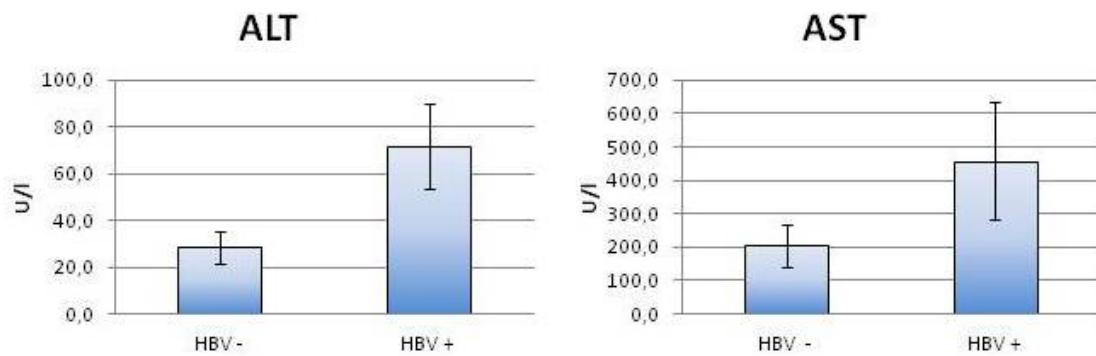
Zur Analyse der Expression des  $\alpha$ -Taxilin-Gens in den HBV-transgenen Mäusen wurden Leberstücke wie in Kapitel 4.6.5 beschrieben lysiert, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und  $\alpha$ -Taxilin mittels spezifischer Primer (# 185, #392) durch RT-PCR quantifiziert und die erhaltenen Daten auf GAPDH normalisiert. In Abb. 5.5 ist zu erkennen, dass niedrigere mRNA-Mengen an  $\alpha$ -Taxilin in HBV-transgenen Mäusen zu detektieren sind.



**Abb. 5.5: Verringerte Mengen von  $\alpha$ -Taxilin mRNA in HBV-transgenen Mäusen**

qPCR isolierter RNA aus Mäuselebern. In der Abbildung sind die Mittelwerte von jeweils drei HBV-transgenen ( $n=3$ ) und drei nicht-transgenen ( $n=3$ ) Kontrollmäusen zu sehen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dar.

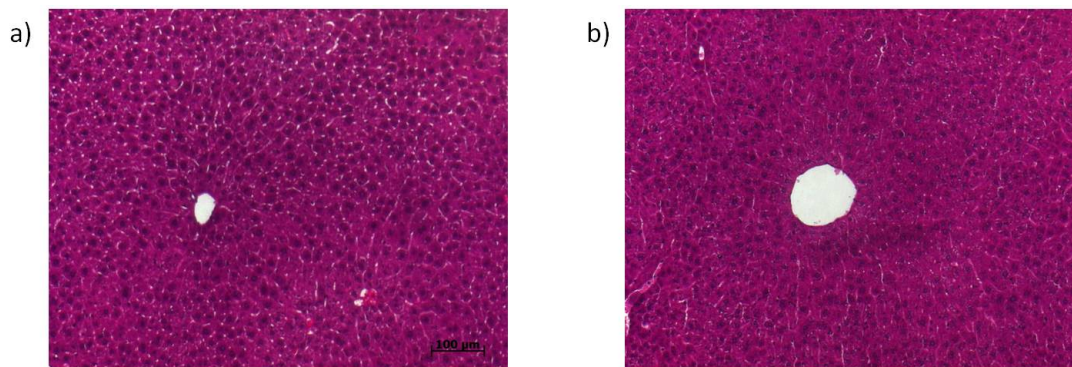
Um abzuklären, ob eine Lebererkrankung und eine damit verbundene Schädigung der Hepatozyten vorliegt, wurde die Aktivität der Leberenzyme im Serum der Mäuse, wie in 4.6.2 beschrieben, bestimmt. In Abb. 5.6 sind höhere Werte für die Alanin- und die Aspartat-Aminotransferase (ALT und AST) in HBV-transgenen Mäusen im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen erkennbar.



**Abb. 5.6: Erhöhte Aktivität der Leberenzyme ALT und AST in HBV-transgenen Mäusen**

Die Serumgewinnung erfolgte wie in 4.6.1 beschrieben. Anschließend wurde die Aktivität der beiden Enzyme mit Hilfe eines Reflotrons gemessen. In der Abbildung sind die Mittelwerte von jeweils drei nicht-transgenen (HBV-) (n=3) und drei transgenen (HBV+) (n=3) Mäusen zu sehen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dar.

Zur näheren Betrachtung der Lebermorphologie wurden Leberschnitte mit HE gefärbt. Hierbei waren keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Negativkontrollen erkennbar (Abb. 5.7).



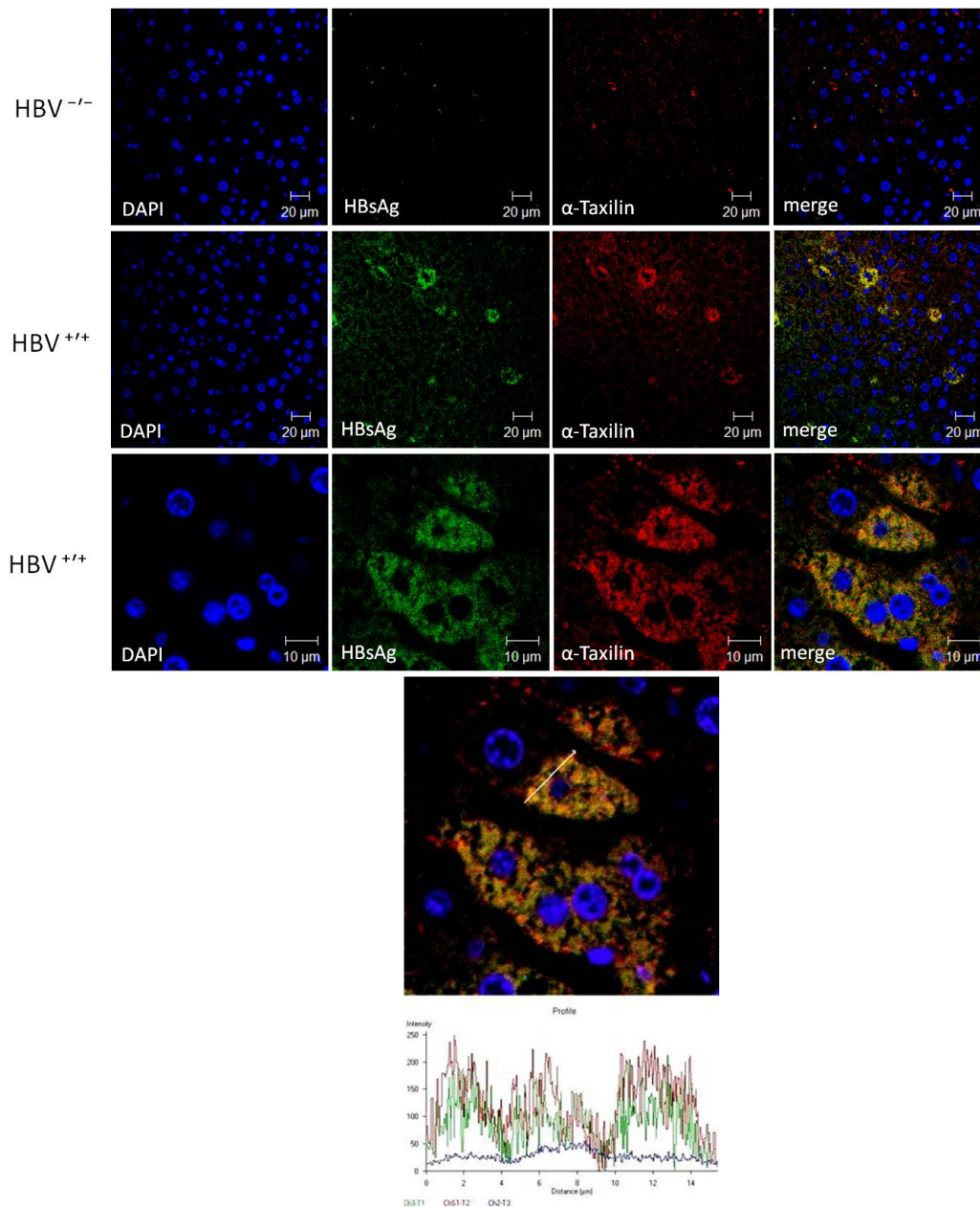
**Abb. 5.7: Histologische Situation in HBV-transgenen und -nicht-transgenen Mäuselebern**

a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit HE-angefärbten Leberschnittes einer nicht-transgenen Kontrollmaus.  
 b) Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit HE-angefärbten Leberschnittes einer HBV-transgenen Maus. Histologisch sind hier keine Unterschiede feststellbar.

Um zu untersuchen, ob in HBV-transgenen Mäusen die Expression des Transgens (p1,2 HBV) mit einer Überproduktion von  $\alpha$ -Taxilin korreliert, wurden Immunfärbungen von Paraffinschnitten der Mäuselebern angefertigt. Hierfür wurde das HBs-Protein mit einem Cy-2-gekoppelten Antikörper (488),  $\alpha$ -Taxilin mit einem Cy-3-gekoppelten Antikörper (543) gefärbt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzanalyse ergab, dass die HBsAg-positiven Zellen heterogen verteilt sind, jedoch eine erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin im Zytoplasma HBV-positiver Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen aufweisen (siehe Abb. 5.8). Zusammenfassend zeigt dies, dass auch in der



Leber der HBV-transgenen Mäuse eine erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin vorliegt, die Expression auf mRNA-Ebene allerdings gleichzeitig reduziert ist.

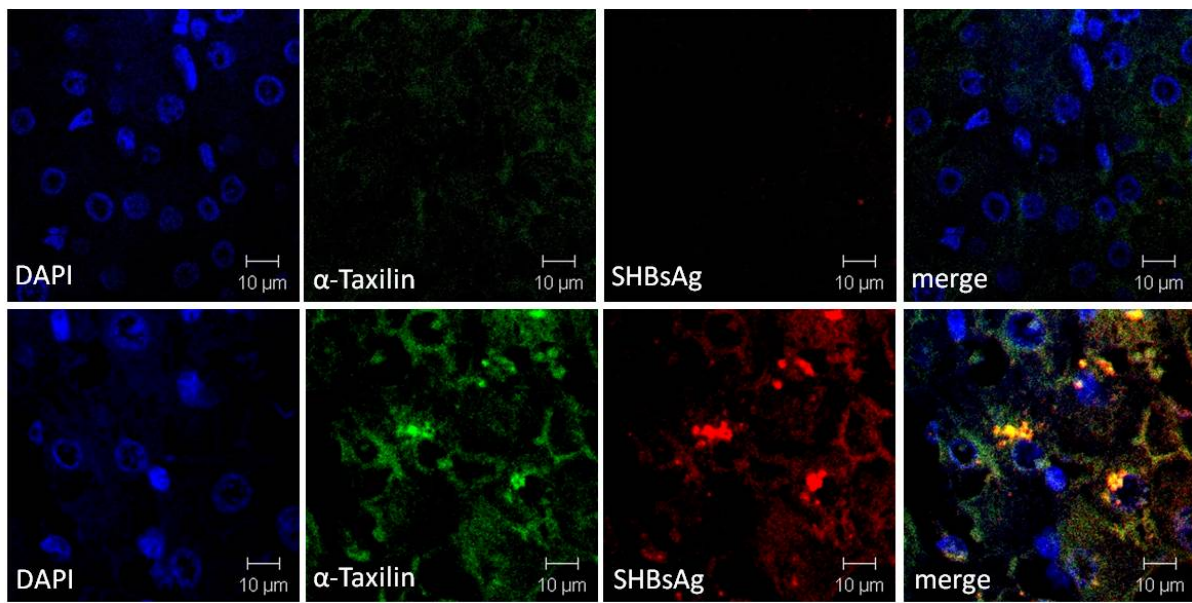


**Abb. 5.8: Expression von  $\alpha$ -Taxilin in HBV-transgenen bzw. nicht-transgenen Mäuselebern**

HBV<sup>-/-</sup>: Immunohistochemische Färbung von nicht-transgenen Mäuselebern (Kontrolle). Die Leberschnitte wurden wie in Kapitel 4.6.7 beschrieben gefärbt. HBV<sup>+/+</sup>: Immunohistochemische Färbung HBV-transgener Mäuselebern. Zur Identifikation HBV-positiver Zellen wurde jeweils ein HBs-Ag-spezifischer Antikörper (grüne Fluoreszenz) eingesetzt. Ein  $\alpha$ -Taxilin-spezifischer Antikörper detektiert das intrazelluläre  $\alpha$ -Taxilin (rote Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Das Intensitätsprofil zeigt eine partielle Colokalisation von HBsAg und  $\alpha$ -Taxilin.

### 5.2.2 Expression von $\alpha$ -Taxilin in HBV-infizierten Patienten

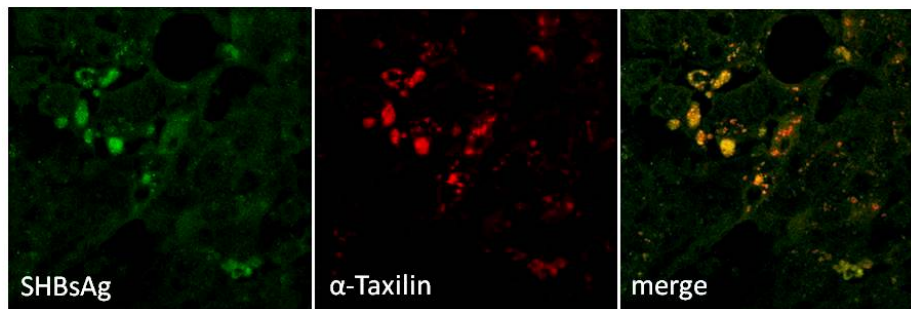
Um die Relevanz von  $\alpha$ -Taxilin in HBV-infizierten Menschen näher zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzen von Leberschnitten chronisch HBV-infizierter Patienten angefertigt. Hier kann eine deutliche Korrelation der Expression von HBV und der verstärkten Bildung von  $\alpha$ -Taxilin beobachtet werden. In Abb. 5.9 ist eine erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin im Zytoplasma von humanen HBV-positiven Lebern erkennbar.



**Abb. 5.9: Erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin in HBV-positiven humanen Lebern**

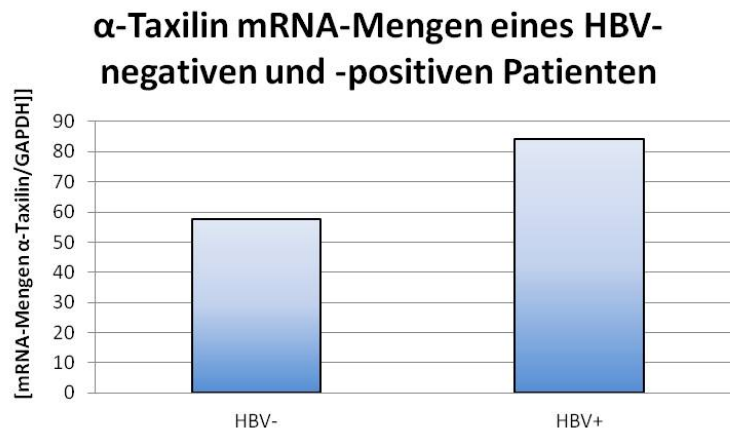
Obere Reihe: Immunfluoreszenzfärbung einer humanen HBV-negativen Kontrollleber. Untere Reihe: Immunfluoreszenzfärbung einer humanen HBV-positiven Leber.  $\alpha$ -Taxilin ist jeweils mit einem Cy2-gekoppelten Antikörper (grün), SHBsAg mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper (rot) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Auch in Gewebeproben von Patienten mit HBV-assoziiertem hepatozellulären Karzinom (HCC) konnte dies bestätigt werden (siehe Abb. 5.10). Diese Ergebnisse zeigen mithin, dass es auch *in vivo* zu einer verstärkten Bildung von  $\alpha$ -Taxilin in HBV-exprimierenden Hepatozyten kommt.



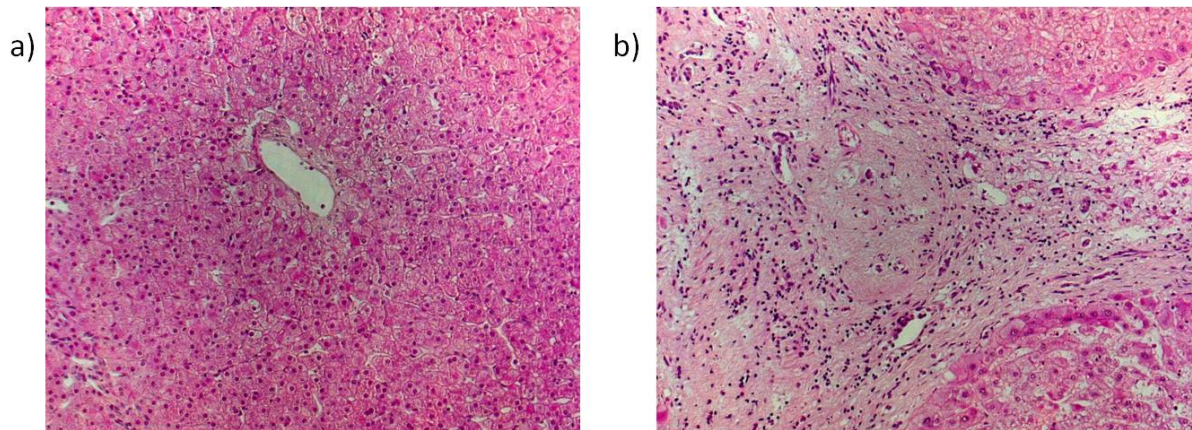
**Abb. 5.10: Höhere Mengen von  $\alpha$ -Taxilin in Gewebeproben von Patienten mit HBV-assoziiertem HCC**  
Die Leberschnitte wurden wie in 4.6.7 beschrieben mit sHBs- (grün) und  $\alpha$ -Taxilin- (rot) spezifischen Antikörpern gefärbt und anschließend mittels CLSM analysiert.

Um die Expression des  $\alpha$ -Taxilin-Gens in humanen Lebern zu analysieren, wurden jeweils vier verschiedene RNAs HBV-negativer und -positiver Patienten in cDNA umgeschrieben und die Menge an  $\alpha$ -Taxilin mittels spezifischer Primer (#185, #186) durch RT-PCR quantifiziert. Die erhaltenen Daten wurden auf GAPDH normalisiert. In Abb. 5.11 ist eine etwas höhere Menge an  $\alpha$ -Taxilin mRNA im HBV-positiven Patienten zu erkennen.



**Abb. 5.11: Erhöhte Menge an  $\alpha$ -Taxilin mRNA in HBV-positiven Patienten**  
qPCR isolierter RNA aus humanen Lebern. In der Abbildung ist beispielhaft das Ergebnis eines HBV-negativen und -positiven Patienten gezeigt.

Zur Beurteilung der histologischen Situation in HBV-infizierten Lebern wurden die Leberschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (siehe Abb. 5.12). Leberschnitte chronisch HBV-infizierter Patienten zeigen deutliche Veränderungen der Lebermorphologie im Vergleich zu den HBV-negativen Kontrollschnitten. Hier sind multifokale bis diffuse mononukleäre Infiltrate erkennbar sowie verbreiterte Bindegewebssepten, die die normale Läppchenstruktur der Leber fast vollständig verdrängen. Dies deutet auf eine in das Parenchym einstrahlende Vernarbungsreaktion der Leber hin.

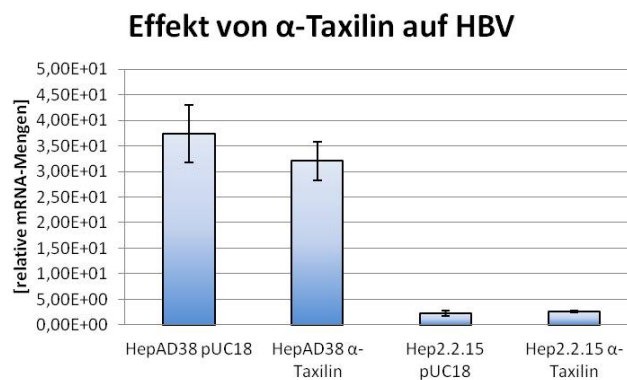


**Abb. 5.12: Histologische Situation in HBV-negativen und positiven humanen Lebern**

a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit HE angefärbten humanen HBV-negativen Leberschnittes. Man erkennt ein reguläres Parenchym mit geringem Bindegewebsanteil. b) Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit HE angefärbten humanen HBV-positiven Leberschnittes. Hier sind multifokale bis diffuse mononukleäre Infiltrate sowie verbreiterte Bindegewebssepten erkennbar.

### 5.3 Überexpression von $\alpha$ -Taxilin

Um den Einfluss auf die Freisetzung viraler Partikel zu analysieren, wurden HBV-exprimierende Zelllinien mit einem  $\alpha$ -Taxilin-Expressionsvektor (pDest26a- $\alpha$ -TxIn) oder einem Kontrollvektor (pUC18) transfiziert und die Menge freigesetzter Viren mittels qPCR quantifiziert. Die moderate Coexpression von  $\alpha$ -Taxilin zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl freigesetzter HBV-Genome (siehe Abb. 5.13).

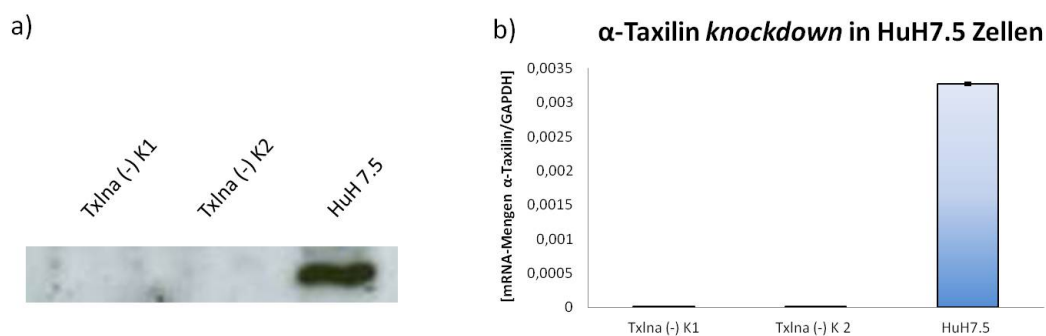


**Abb. 5.13: Einfluss von  $\alpha$ -Taxilin auf HBV**

Zwei HBV-exprimierende Zelllinien (HepAD38- und Hep2.2.15-Zellen) wurden mit einem  $\alpha$ -Taxilin-Expressionsvektor (pDest26a- $\alpha$ -TxIn) oder einem Kontrollvektor (pUC18) transfiziert. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Menge mittels qPCR unter Verwendung von HBV-spezifischen Primern quantifiziert. Die Grafik stellt die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente (n=3) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dar.

## 5.4 Knockdown von $\alpha$ -Taxilin

Um zu untersuchen, welchen Effekt eine verminderte Expression von  $\alpha$ -Taxilin auf die HBV-Replikation hat, wurden *knockdown*-Experimente durchgeführt. Zum knockdown des gewünschten Zielgens alpha -Taxilin wurden shRNAs mit unterschiedlichen Zielsequenzen gegen die mRNA von alpha-Taxilin getestet. Die shRNA wurde in ein lentivirales Gentransfersystem kloniert und mittels lentiviraler Infektion und Selektion der transduzierten Zellen mit Hilfe von Puromycin stabil in HuH7.5-Zellen exprimiert. Der Erfolg der Supprimierung von  $\alpha$ -Taxilin wurde mittels WB-Analysen und qPCR kontrolliert (siehe Abb. 5.14).

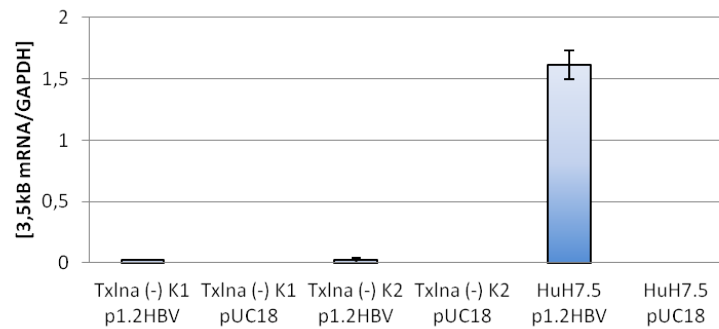


**Abb. 5.14: Kontrolle der Supprimierung von  $\alpha$ -Taxilin**

a) Western-Blot-Analyse von Zelllysaten zweier  $\alpha$ -Taxilin-*knockdown*-Klone (Txlna (-) K1 und K2), welche mit lentiviraler shRNA transduziert wurde, im Vergleich zu HuH7.5-Kontrollzellen. b) Gesamtzelluläre RNA der  $\alpha$ -Taxilin-*knockdown*-Klone (Txlna (-) K1 und K2) und HuH7.5-Kontrollzellen wurde isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer  $\alpha$ -Taxilin Primer in einer qPCR analysiert. Die Grafik stellt die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente (n=3) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dar.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der *knockdown* auf die HBV-Replikation hat, wurden die  $\alpha$ -Taxilin-*knockdown*-Zellen mit dem 1,2-fachen HBV-Genom oder dem Kontrollvektor pUC18 transfiziert und die RNA unter Verwendung eines spezifischen 3,5 kb mRNA HBV-Primers mittels qPCR analysiert. Wie in Abb. 5.15 ersichtlich, führt der *knockdown* von  $\alpha$ -Taxilin zu einer verminderten HBV-Replikation.

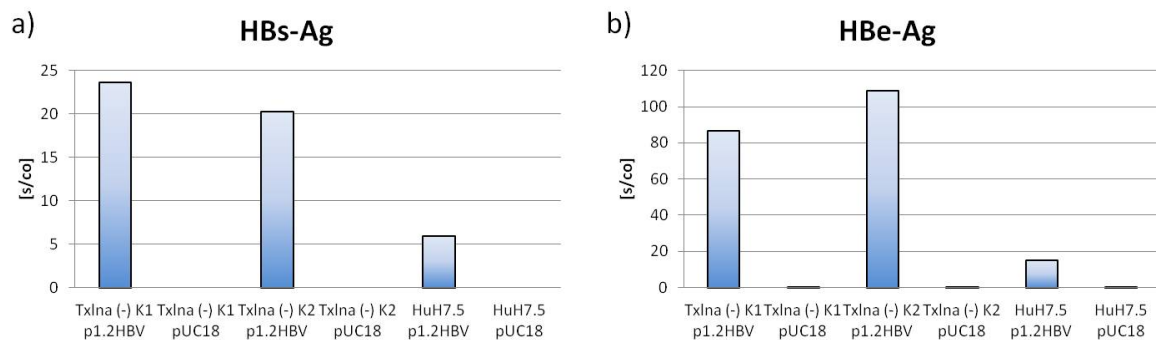
### HBV mRNA-Mengen nach $\alpha$ -Taxilin *knockdown*



**Abb. 5.15:**  $\alpha$ -Taxilin-*knockdown* hemmt die HBV-Replikation

Zwei unterschiedliche *knockdown*-Klone und HuH7.5-Zellen wurden mit dem 1,2-fachen HBV-Genom (p1,2HBV) oder dem Kontrollvektor pUC18 transfiziert, die RNA isoliert und unter Verwendung eines spezifischen 3,5kb mRNA HBV-Primers mittels qPCR analysiert. Die Grafik stellt die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente (n=3) inklusive der Standardabweichungen (SD, *standard deviation*) dar. (\* =  $p < 0,05$ ; n.s. = nicht signifikant)

Um herauszufinden, ob die verminderte Menge an  $\alpha$ -Taxilin auch zu einer Modulation der Mengen an freigesetzten Viruspartikeln führt, wurden HBs- und HBe-Ag-ELISA-Messungen durchgeführt. Diese zeigten, dass 72 h nach Transfektion des 1,2-fachen HBV-Genoms bzw. dem Kontrollvektor pUC18 erhöhte Mengen an HBs- und HBe-Antigen im Überstand der HBV-positiven Zellen vorhanden waren (siehe Abb 5.16). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass  $\alpha$ -Taxilin eine essentielle Rolle in der HBV-Replikation spielt.

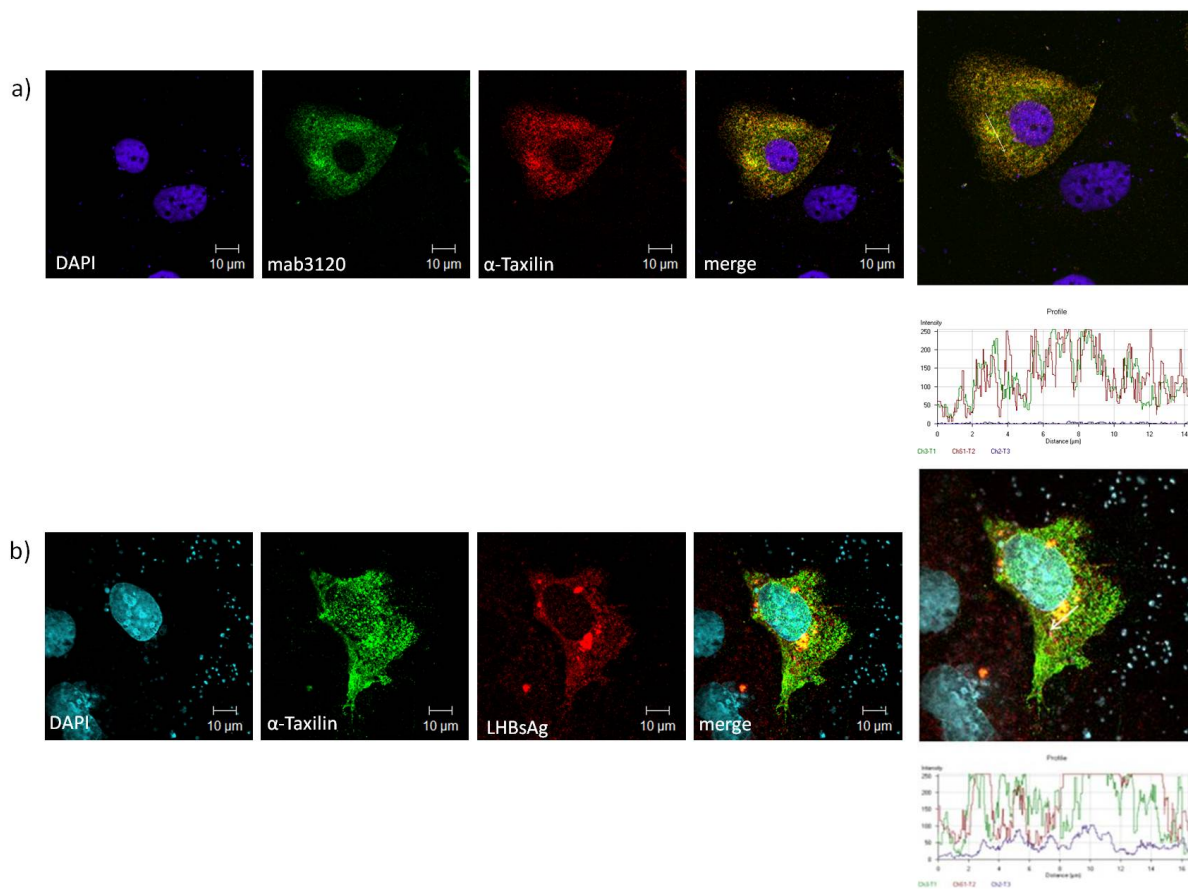


**Abb. 5.16:** Erhöhte Mengen an HBs- und HBe-Antigenen im Überstand transfizierter *knockdown*-Zellen

ELISA-Messungen der Überstände transfizierter  $\alpha$ -Taxilin *knockdown*-Zellen (Txlna (-)). Zwei unterschiedliche *knockdown*-Klone (K1 und K2) wurden mit dem 1,2-fachen HBV-Genom oder dem Kontrollvektor pUC18 transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Mengen an HBs- und HBe-Ag mittels ELISA im Überstand bestimmt.

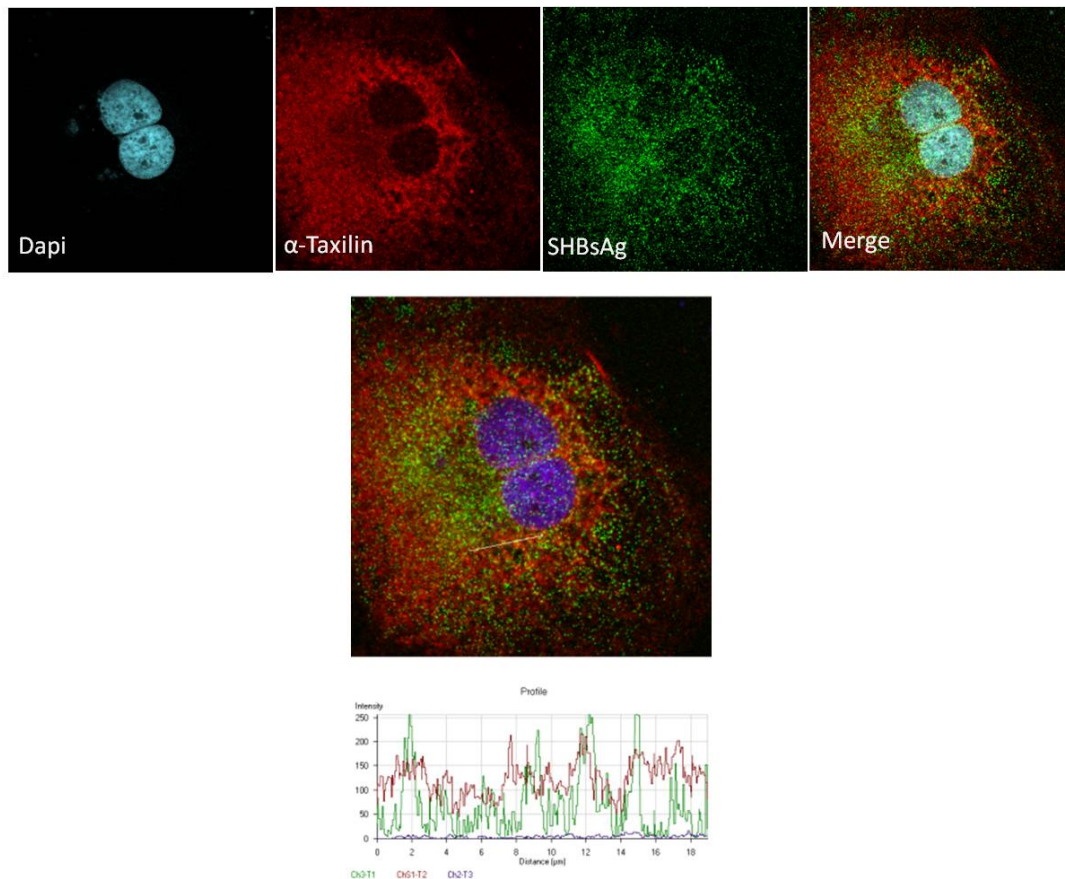
## 5.5 Colokalisation von HBV mit $\alpha$ -Taxilin

Die Ergebnisse der *knockdown*-Untersuchungen deuten darauf hin, dass  $\alpha$ -Taxilin eine essentielle Rolle für den Lebenszyklus von HBV spielen könnte. Um dies näher zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisation von HBV-Strukturproteinen und  $\alpha$ -Taxilin in HBV-produzierenden HuH7.5-Zellen mittels CLSM analysiert. Zur Färbung wurden LHBs-, HBcAg- oder SHBs-Ag-spezifische Antikörper sowie  $\alpha$ -Taxilin-spezifische Seren verwendet. Die Abbildungen 5.17 - wie auch durch das Intensitätsprofil verdeutlicht - zeigen, dass eine Fraktion von  $\alpha$ -Taxilin mit Fraktionen der HBV-Strukturproteine (LHBs- und HBc-Ag) colokalisiert. Dies deutet auf eine Interaktion von LHBs- und HBc-Ag mit  $\alpha$ -Taxilin hin. Im Gegensatz dazu ist im Falle von SHBs-Ag und  $\alpha$ -Taxilin keine Colokalisation erkennbar (siehe Abb. 5.18).



**Abb. 5.17: Colokalisation von  $\alpha$ -Taxilin mit HBV-Strukturproteinen**

a) HuH7.5-Zellen wurden mit dem 1,2-fachen HBV-Genom transfiziert und 72 h nach Transfektion mit HBc-Ag- (Mab3120) (grün) und  $\alpha$ -Taxilin- (rot) spezifischen Antikörpern gefärbt. Mab 3120 erkennt ausschliesslich assemblierte Kapsidpartikel. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. b) HuH7.5-Zellen wurden mit dem 1,2-fachen HBV-Genom transfiziert und 72 h nach Transfektion mit  $\alpha$ -Taxilin- (grün) und LHBs-Ag- (rot) spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (türkis) gefärbt. Das Intensitätsprofil zeigt eine partielle Colokalisation von HBc-Ag bzw. LHBs-Ag und  $\alpha$ -Taxilin.



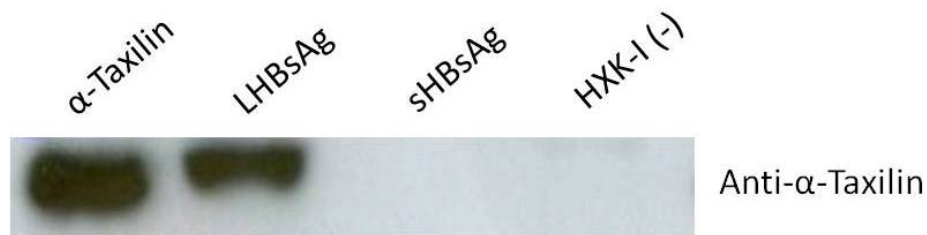
**Abb. 5.18: Immunfluoreszenzfärbung von  $\alpha$ -Taxilin mit SHBs-Ag**

HuH7.5-Zellen wurden mit dem 1,2-fachen HBV-Genom transfiziert und 72 h nach Transfektion mit SHBs- (grün) und  $\alpha$ -Taxilin- (rot) spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Dapi (blau) gefärbt. Im Intensitätsprofil ist keine Colokalisation der beiden Proteine erkennbar.

## 5.6 Interaktion zwischen $\alpha$ -Taxilin und LHBs

Die Ergebnisse der CLSM deuten auf eine Interaktion zwischen  $\alpha$ -Taxilin und HBV hin. Um dies zu überprüfen, wurden Lysate HBV-produzierender Zellen (HepAD38) einer Coimmunpräzitationsanalyse (Co-IP) unterzogen. Dazu wurden  $\alpha$ -Taxilin-, LHBs-, SHBs- und als Kontrolle Hexokinase-I- (HXK-I) spezifische Antikörper verwendet. Die Präzipitate wurden anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Taxilin-spezifischen Antikörpers analysiert. Der WB zeigt, dass mittels  $\alpha$ -Taxilin-spezifischem Antikörper LHBs copräzipitiert werden kann, während SHBs nicht präzipitierbar ist. Diese Daten bestätigen, dass  $\alpha$ -Taxilin und LHBs interagieren (siehe Abb. 5.19 ).



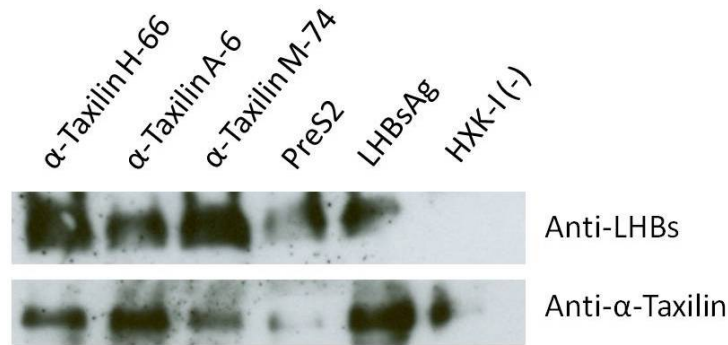


**Abb. 5.19: Interaktion zwischen  $\alpha$ -Taxilin und LHBs**

Zelllysate von HBV-replizierenden Zellen (HepAD38) wurden einer Co-IP unterzogen. Hierzu wurden  $\alpha$ -Taxilin-, LHBs-, SHBs- und Hexokinase-I- (HXK-I, Negativkontrolle) spezifische Antikörper verwendet. Die Bindung wurde mit einem  $\alpha$ -Taxilin-spezifischen (Anti- $\alpha$ -Taxilin) Antikörper nachgewiesen.

## 5.7 Interaktion zwischen gereinigtem $\alpha$ -Taxilin und der PreS1PreS2-Domäne

Die oben beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass  $\alpha$ -Taxilin mit LHBs interagiert. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine direkte Interaktion handelt oder ob weitere Faktoren für die Interaktion erforderlich sind, wurde eine Mischung aus gereinigtem  $\alpha$ -Taxilin mit einer gereinigten PreS1PreS2-Domäne von  $\alpha$ -Taxilin der Co-IP-Analyse unterzogen. Dazu wurden drei verschiedene  $\alpha$ -Taxilin- (H-66, A-6, M-74) sowie PreS2-, LHBs- und als Negativkontrolle Hexokinase-I- (HXK-I (-)) spezifische Antikörper verwendet. Die Präzipitate wurden anschließend mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Taxilin-spezifischen Antikörpers analysiert. Die WBs zeigen, dass mittels  $\alpha$ -Taxilin spezifischer Antikörper LHBs und umgekehrt mittels LHBs-spezifischer Antikörper  $\alpha$ -Taxilin copräzipitiert werden kann. Diese Daten bestätigen, dass  $\alpha$ -Taxilin und LHBs direkt miteinander interagieren (siehe Abb. 5.20).

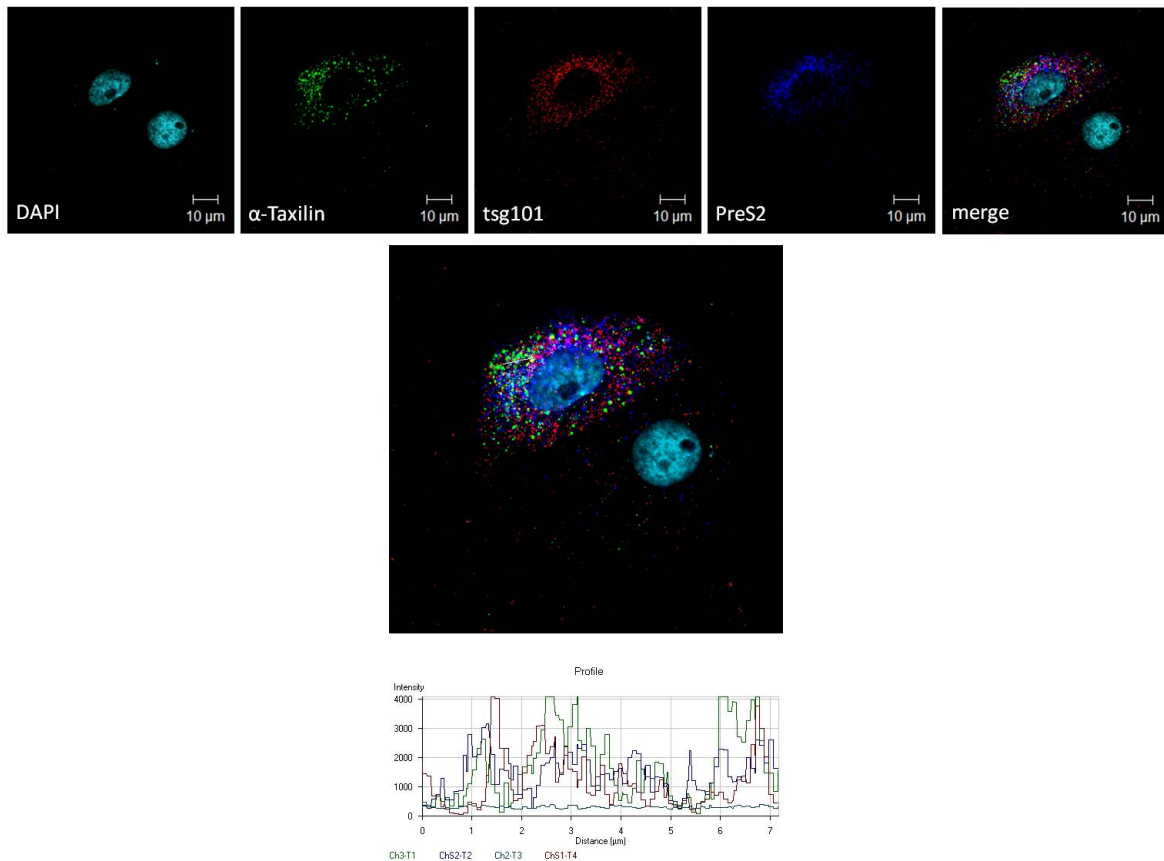


**Abb. 5.20: Interaktion zwischen gereinigtem  $\alpha$ -Taxilin und der PreS1PreS2-Domäne**

Eine Mischung gereinigten  $\alpha$ -Taxilins wurde mit gereinigter PreS1PreS2-Domäne einer Co-IP-Analyse unterzogen. Die beiden Proteine wurden zuvor mittels Affinitätschromatographie unter der Verwendung von Streptavidin- bzw.  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säulen angereichert. Für die Co-IP wurden drei verschiedene  $\alpha$ -Taxilin- sowie PreS2-, LHBs- und als Negativkontrolle Hexokinase-I (HXK-I) -spezifische Antikörper verwendet. Die Präzipitate wurden mittels LHBsAg- und  $\alpha$ -Taxilin-spezifischer Antikörper analysiert.

## 5.8 Einfluss von $\alpha$ -Taxilin auf die Expression von Komponenten des ESCRT-Systems

Die bisherigen Experimente hatten gezeigt, dass die Freisetzung viraler Partikel von  $\alpha$ -Taxilin abhängen könnte, nicht jedoch die Freisetzung subviraler Partikel. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die viralen Partikel via LHBs mit  $\alpha$ -Taxilin interagieren. Virale Partikel und subvirale Partikel verlassen die Zelle über unterschiedliche Wege. Die Freisetzung der viralen Partikel erfolgt über das ESCRT-System. Die Interaktion von Viren mit Komponenten des ESCRT-Systems erfordert das Vorhandensein von sogenannten *late domains* in den viralen Strukturproteinen. Diese fehlen jedoch in den Strukturproteinen von HBV. Daher stellte sich die Frage, ob  $\alpha$ -Taxilin, das eine Vielzahl von PXXP-Motiven aufweist, als Adapter zwischen LHBs und der ESCRT-Maschinerie fungieren könnte und somit am Export viraler Partikel beteiligt ist. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass parallel zur Expression von  $\alpha$ -Taxilin auch die Expression der ESCRT-System-Komponente tsg101 in HBV-positiven Zellen erhöht ist (siehe Abb. 5.21).



**Abb. 5.21: Erhöhte Mengen tsg101 in HBV-positiven Zellen**

HuH7.5-Zellen wurden transient mit dem 1,2-fachen HBV-Genom transfiziert und 48 h nach Transfektion mit  $\alpha$ -Taxilin- (grün), tsg101- (rot) und PreS2- (dunkelblau) spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels CLSM analysiert. Die Zellkerne sind mit DAPI (türkis) gefärbt.

Umgekehrt zeigte sich, dass der *knockdown* der  $\alpha$ -Taxilin-Expression eine deutliche Verminderung der tsg101-Expression bedingt (siehe Abb. 5.22). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass  $\alpha$ -Taxilin eine essentielle Rolle beim Export von viralen Partikeln spielen könnte.

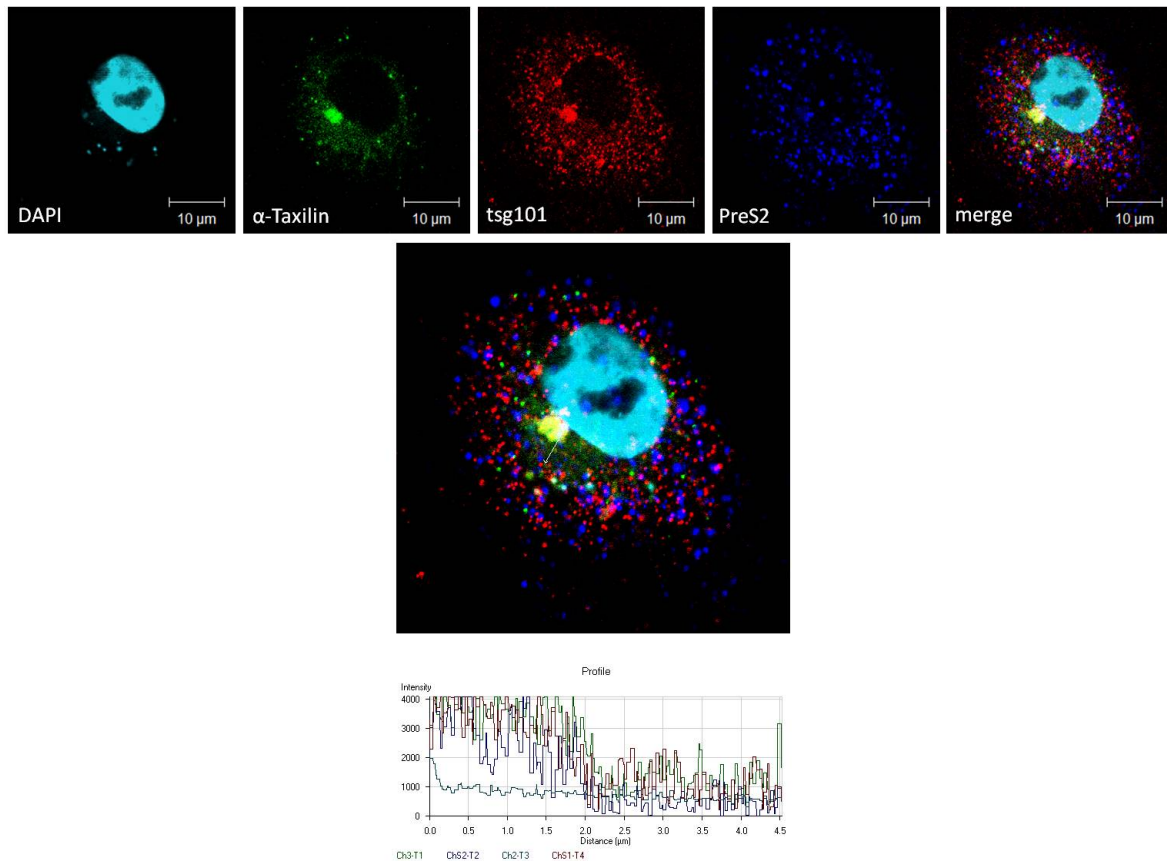


**Abb. 5.22: Verminderte Mengen tsg101 in  $\alpha$ -Taxilin-knockdown-Zellen**

Die RNA zweier unterschiedlicher  $\alpha$ -Taxilin-knockdown-Klone (Txlna (-) K1 und K2) sowie der HuH7.5-Zellen wurde isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung eines spezifischen tsg101-Primers mittels qPCR analysiert. Die Grafik stellt die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente ( $n=3$ ) inklusive der Standardabweichungen (SD, *standard deviation*) dar.

## 5.9 $\alpha$ -Taxilin colokalisiert mit tsg101

Die oben beschriebenen Experimente deuten auf eine funktionelle Interferenz von  $\alpha$ -Taxilin mit dem ESCRT-System hin. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die subzellige Lokalisation von HBV,  $\alpha$ -Taxilin und tsg101 in HBV-produzierenden HuH7.5-Zellen mittels CLSM analysiert. Zur Färbung wurden tsg101-, PreS2-, sowie  $\alpha$ -Taxilin-spezifische Seren verwendet. Die CLSM - wie auch durch das Intensitätsprofil verdeutlicht - zeigt, dass eine Fraktion von  $\alpha$ -Taxilin mit einer Fraktion von tsg101 colokalisiert (siehe Abb. 5.23). Dies unterstützt die Hypothese, dass  $\alpha$ -Taxilin und tsg101 interagieren könnten.



**Abb. 5.23: Colokalisation von  $\alpha$ -Taxilin mit tsg101**

HuH7.5-Zellen wurden mit dem 1,2-fachen HBV-Genom transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit  $\alpha$ -Taxilin- (grün), tsg101- (rot) und PreS2- (dunkelblau) spezifischen Seren gefärbt. Die Zellkerne sind mit Dapi (türkis) gefärbt.

## 5.10 Interaktion zwischen $\alpha$ -Taxilin und tsg101

Um eine eventuelle Interaktion zwischen  $\alpha$ -Taxilin und tsg101 nachzuweisen, wurden Lysate HBV-replizierender Zellen (HepAD38) einer Co-IP unterzogen. Hierzu wurden drei  $\alpha$ -Taxilin-, tsg101- und Glykogen-Synthase-Kinase- (GSK) spezifische Antikörper verwendet. Die Präzipitate wurden anschließend mittels Western-Blot unter Verwendung von  $\alpha$ -Taxilin- und tsg101-spezifischen Antikörpern analysiert. Der WB zeigt, dass tsg101 mittels  $\alpha$ -Taxilin und umgekehrt, dass  $\alpha$ -Taxilin mittels tsg101 copräzipitiert werden kann. Diese Daten bestätigen eine Interaktion zwischen  $\alpha$ -Taxilin und tsg101.



**Abb. 5.24: Interaktion zwischen  $\alpha$ -Taxilin und tsg101**

Zelllysate HBV-replizierender Zellen (HepAD38) wurden einer Co-IP unterzogen. Hierzu wurden drei verschiedene  $\alpha$ -Taxilin- (A-6, H-66, M-74) sowie tsg101- und Glykogen-Synthase-Kinase- (GSK, Negativkontrolle) spezifische Antikörper verwendet. Die Bindungen wurden mit einem  $\alpha$ -Taxilin- bzw. tsg101-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

## 6 Diskussion

Trotz eines effektiven Impfstoffes gegen das Hepatitis-B-Virus, ist Hepatitis B mit weltweit 400 Millionen chronisch infizierten Menschen immer noch eine der weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. HBV ist neben HCV der Hauptauslöser von hepatozellulären Karzinomen (HCC), die eine der weltweit meistverbreiteten Tumorerkrankungen darstellen (Lupberger und Hildt, 2007). Dennoch sind die Interaktionen der zellulären Signalwege mit dem Virus, die zu einem HCC führen, noch nicht vollständig verstanden. Das Membrantransportsystem spielt jedoch bei der Zellteilung und besonders bei der Karzinogenese sowie der Tumورprogression verschiedener Tumore eine wichtige Rolle. Grundlegend kann man vier Kategorien von Proteinen unterscheiden, die am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind (Bröcker *et al.*, 2010, Brown und Pfeffer, 2010, Angers und Merz, 2011): a) Zielmembran-verankerte t-SNARES (*soluble N-ethylmaleinimide-sensitive factor attachment receptors*) und Vesikel-verankerte v-SNARES. Das Aufeinandertreffen von zusammengehörigen v- und t-SNARES leitet die Fusion ein und führt zur Bildung sehr stabiler SNARE-Komplexe (Söllner *et al.*, 1993). b) Rab-Proteine (*Ras-related in brain*) sind kleine GTPasen, welche beim Andocken des Vesikels und der Erkennung der Zielmembran beteiligt sind. c) NSF (*N-Ethylmaleinimide-sensitive factor*) und SNAP (*soluble attachment proteins*) führen zur Dissoziation der SNARE-Komplexe, damit sie anschließend wiederverwertet werden können (Mayer, 2002, Zhao *et al.*, 2007). d) Sec1/Munc18 (SM)-Proteine. SM-Proteine sind zytosolische Proteine, die im Verdacht stehen, vor und nach der Vesikelandockung mit den SNARES zu interagieren (Südhof und Rothman, 2009). SNARE-Proteine sowie dessen Bestandteil, das Syntaxin, stellen somit die zentralen Regulatorproteine des Membrantransports dar, indem sie die Fusion vermitteln. Syntaxin gehört zur Familie der t-SNARES (Rathore *et al.*, 2010, Südhof und Rothman, 2009, Carr und Rizo, 2010, Angers und Merz, 2011). Das Protein  $\alpha$ -Taxilin konnte als wichtiger Bindungspartner von Syntaxin identifiziert werden (Nogami *et al.*, 2003a). Detailliertere Untersuchungen ergaben, dass Syntaxin-1a, -3 und -4, welche auf der Plasmamembran lokalisiert sind,  $\alpha$ -Taxilin spezifisch und dosisabhängig binden (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a, Nogami *et al.*, 2004). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass  $\alpha$ -Taxilin durch die Bindung an Syntaxin an dem post-Golgimembrantransport beteiligt ist. Die Bindung der Proteine konnte jedoch durch SM-Proteine inhibiert werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass  $\alpha$ -Taxilin nur Syntaxin bindet, welches nicht Teil des SNARE-Komplexes ist. Die genaue Funktion von  $\alpha$ -Taxilin ist jedoch noch unbekannt. Es wird spekuliert, dass  $\alpha$ -Taxilin analog zu SM-Proteinen fungieren könnte, somit die für den Vesikeltransport essentielle Komplexbildung zwischen v-SNARE und t-SNARE modulieren könnte (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a) und so einen direkten

Einfluss auf die Membranfusion nimmt.

Ohtomo und Kollegen fanden heraus, dass die Menge an  $\alpha$ -Taxilin in tumorösem Gewebe höher ist als in nicht tumorösem Gewebe (Ohtomo *et al.*, 2010). Dies konnte sowohl in Geweben mesenchymalen Ursprungs als auch in Geweben epithelialen Ursprungs nachgewiesen werden. Sowohl in mesenchymalen Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS), in Nierenzellkarzinomen als auch in HCCs konnten höhere Mengen von  $\alpha$ -Taxilin nachgewiesen werden. Außerdem korreliert die Expression von  $\alpha$ -Taxilin mit der Zellproliferation und dem malignen Potential des Tumors. So konnten in schlecht-differenzierten und invasiv wachsenden HCCs deutlich höhere Mengen  $\alpha$ -Taxilin im Vergleich zu benachbartem, nicht-tumorösem Gewebe detektiert werden (Ohtomo *et al.*, 2010). *In-vitro*-Studien zeigten außerdem eine positive Korrelation der Zellwachstumsrate mit der Intensität der  $\alpha$ -Taxilin-Expression (Ohtomo *et al.*, 2010). Die Expression von  $\alpha$ -Taxilin könnte somit als Marker für das bösartige Potential eines Tumors dienen (Ohtomo *et al.*, 2010). Die Rolle der Taxilin-Familie in translationalen und transkriptionellen Prozessen über die Bindung des *nascent polypeptide-associated complexes* (NAC) wurde von Yoshida und Kollegen näher untersucht (Yoshida *et al.*, 2005). NAC ist ein ubiquitäres Protein in eukaryotischen Zellen, welches an neu synthetisierte Polypeptidketten bindet und so fehlerhafte Faltungen oder ungewünschte Proteininteraktionen verhindert (Rospert *et al.*, 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass  $\alpha$ -Taxilin an NAC bindet, woraus sich eine Assoziation von  $\alpha$ -Taxilin mit translatierenden Ribosomen ableiten lässt (Yoshida *et al.*, 2005). Somit könnte  $\alpha$ -Taxilin Einfluss auf die Entartung von Zellen und die Entstehung von Tumoren nehmen.

In vorangegangenen Experimenten wurde die Regulation der  $\alpha$ -Taxilin-Expression mittels Luciferase-Reportergen-Assays näher untersucht. Hierbei wurden verschiedene Hepatoblastom-Zelllinien mit einem Taxilin-Luciferase-Reporterkonstrukt in verschiedenen Konzentrationen transfiziert. Die Ergebnisse des Luciferase Assays zeigten eine starke Aktivierung des  $\alpha$ -Taxilin-Promotors in HBV-positiven Zellen. Die viralen regulatorischen Proteine PreS2 und HBx konnten als Aktivatoren des  $\alpha$ -Taxilin-Promotors identifiziert werden. Sie aktivieren den Promotor über den MEK-Signalweg. Die verstärkte Aktivierung dieser Signalkaskade durch transiente Überexpression von cRaf führte im Reportergenassay zu einer erhöhten Aktivierung des  $\alpha$ -Taxilin-Promotors, während die Expression der transdominant-negativen (tdn) Mutante von cRaf die Aktivierung des Promotors hemmt (D. Glatzel, Bachelorarbeit 2011).

Die Taxilin-Familie besteht in Säugetieren aus mindestens drei Mitgliedern:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Taxilin (Nogami *et al.*, 2004).  $\alpha$ -Taxilin besitzt eine lange *coiled-coil*- und eine Leucin-Zipper-Domäne. Beide dieser Domänen sind notwendig für Protein-Protein-Interaktionen bzw. Protein-Dimerisierungen (Nishizawa *et al.*, 1989) und werden in einer Vielzahl von Proteinen gefunden, die in wichtigen biologischen Funktionen, wie zum Beispiel der Regulation der Gen-Expression, involviert sind (Ohtomo *et al.*, 2010).

Offensichtlich gibt es einen Zusammenhang zwischen der  $\alpha$ -Taxilin-Expression und dem malignen Potential eines virus-induzierten HCCs. Da die chronische HBV-Infektion zu den Hauptursachen der Entstehung von HCCs zählt, sollten im Zuge der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkungen



zwischen der  $\alpha$ -Taxilin-Expression und dem HBV-Lebenszyklus näher analysiert werden. Hierzu wurden zunächst der Proteingehalt von  $\alpha$ -Taxilin in stabilen und transienten Zellsystemen untersucht. In HBV-replizierenden Zellen waren deutlich höhere Mengen an  $\alpha$ -Taxilin im Vergleich zu HBV-negativen Zellen detekierbar (siehe Kapitel 5.1 Abb. 5.1). Da in HBV-positiven Zellen die  $\alpha$ -Taxilin-RNA-Mengen höher sind, sind die erhöhten  $\alpha$ -Taxilin-Proteinmengen wahrscheinlich auf eine verstärkte Expression des Taxilin-Gens und nicht etwa eine Verminderung des Proteinabbaus zurückzuführen (siehe Kapitel 5.1 Abb. 5.2). Um die Expression *in vivo* zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell für HBV auf dem Hintergrund von C57BL/6-Mäusen etabliert. Anhand dieses Mausmodells konnten die *in vitro* Daten bestätigt werden. Der Effekt einer gesteigerten  $\alpha$ -Taxilin-Proteinmenge konnte *in vivo* ebenfalls nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.2.1 Abb. 5.4). Um zu untersuchen, ob die  $\alpha$ -Taxilin-Mengen nach einer HBV-Infektion auch im humanen System reguliert sind, wurden Gewebeproben von Patienten mit einem HBV-assoziierten HCC untersucht. Auch hier waren deutlich höhere  $\alpha$ -Taxilin-Proteinmengen im Vergleich zu negativen Kontrolllebern nachweisbar (siehe Kapitel 5.2.2, Abb. 5.9 und 5.10). Auffallend war, dass im Gegensatz zum Zellkultursystem (Kapitel 5.1 Abb. 5.2) und humanen Lebern (Kapitel 5.2.2 Abb. 5.11) die  $\alpha$ -Taxilin-RNA-Mengen in HBV-transgenen Mäusen bei gleichzeitig hohen Proteinmengen niedrig waren (siehe Kapitel 5.2.1 Abb. 5.5). Es ist vorstellbar, dass  $\alpha$ -Taxilin im humanen System anderen Regulationsmechanismen unterliegt als im murinen System. Eine Erklärung für die Beobachtungen im Mausmodell wäre, dass  $\alpha$ -Taxilin eine längere Halbwertszeit hat, welche zu einer verringerten mRNA-Menge führt. Eine andere Erklärung für diese Beobachtung könnte ein negativer *feedback*-Mechanismus sein, der durch die hohen  $\alpha$ -Taxilin-Mengen bedingt ist und das mRNA-Niveau herunterreguliert.

Da sowohl in HBV-replizierenden Zellen als auch in HBV-infizierten Lebern  $\alpha$ -Taxilin in erhöhten Mengen detektierbar war, sollte analysiert werden, ob HBV einen Einfluss auf die Lebern dieser Tiere hat und die Lebermorphologie dadurch beeinflusst wird. Bei der makroskopischen Betrachtung der HBV-transgenen Mäuselebern fielen keinerlei Veränderungen oder Tumore der Lebern auf. Auch bei der Betrachtung der Lebermorphologie in HE-gefärbten Leberschnitten von jeweils drei transgenen und nicht-transgenen Tieren waren keine Veränderungen erkennbar (siehe Kapitel 5.2.1 Abb. 5.7). Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Publikation von Guidotti *et al.*, die gezeigt hat, dass die Hepatozyten der transgenen Mäuse das Virus zwar in vergleichbaren Mengen zu Lebern chronisch HBV-infizierter Patienten produzieren, jedoch ohne jegliche Anzeichen einer Zytopathogenität (Guidotti *et al.*, 1995). Dies ist verwunderlich, da die Leber bei HBV-infizierten Menschen massiv in Mitleidenschaft gezogen wird. Hier lässt sich im Verlauf einer chronischen HBV-Infektion ein fortschreitender Untergang des Leberparenchyms beobachten. In Kapitel 5.2.2 Abb. 5.12 ist die histologische Situation in humanen HBV-infizierten Lebern dargestellt. Man erkennt massive multifokale bis diffuse mononukleäre Infiltrate sowie verbreiterte Bindegewebssepten, die die normale Läppchenstruktur der Leber fast vollständig verdrängen. Diese sogenannten Mottenfrassnekrosen (Gruppennekrosen) stellen den Beginn des bindegewebigen Umbaus (Fibrose) der Leber dar. Der deutliche Unterschied des Ausmasses der Leberzellschädigung im murinen

System ist möglicherweise auf eine modifizierte Immunantwort im Vergleich zum humanen System zurückzuführen. Im Verlauf einer chronischen HBV-Infektion beim Menschen ist das zelluläre Immunsystem, welches eine Reihe von unspezifischen Effektorsystemen auslöst, für die Zerstörung der humanen Hepatozyten verantwortlich (Chisari und Ferrari, 1995, Guidotti und Chisari, 2006). CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen hierbei eine sehr wichtige Rolle und gelten als primäre Effektorzellen. Sie weisen zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen auf: Auf der einen Seite kommt es zu einer Verringerung der Viruslast durch die Sekretion antiviraler Zytokine wie z. B. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Auf der anderen Seite werden infizierte Hepatozyten durch zytotoxische Mechanismen (z. B. Apoptoseinduktion, Zellyse) eliminiert, was mit einer Zerstörung der Hepatozyten und einem Anstieg der Transaminasen einhergeht (Thimme *et al.*, 2002, Thimme *et al.*, 2003, Guidotti *et al.*, 1994). Bei einer chronischen HBV-Infektion ist die Immunantwort schwächer ausgeprägt und nur gegen wenige Epitope gerichtet. Diese reicht nicht aus, um die virale Genexpression zu unterdrücken und führt so zu einer Zerstörung der Hepatozyten und einem fortschreitenden Untergang des Leberparenchyms. In der Maus wird das Produkt des Transgens nicht als fremd erkannt und führt somit also zu keiner CTL-Antwort. Die Immunpathogenese und die dadurch bedingte histologische Veränderung bleibt somit aus. Dennoch sind die gemessenen Transaminasen im Blut der HBV-transgenen Mäuse geringfügig erhöht (siehe Kapitel 5.2.1 Abb. 5.6). Diese Erhöhung muss jedoch nicht unbedingt auf eine Leberpathogenese zurückzuführen sein, da insbesondere die AST nicht leberspezifisch ist und auch vermehrt im Herzmuskel vorkommt. In Studien konnten außerdem große Variabilitäten der Transaminasen in C57BL/6-Mäusen festgestellt werden (Dissertation Zur, 2005). Geschlechtsspezifische Unterschiede sowie eine herbeigeführte Hämolyse durch zu schnelle Blutentnahme können zu starken Schwankungen der Transaminasen führen, weshalb die Werte hier eher zu vernachlässigen sind.

Um nähere Informationen über die zelluläre Lokalisation von  $\alpha$ -Taxilin zu erhalten, wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen HBV-positiver Zellen durchgeführt. Diese zeigten eine partielle Colokalisation von  $\alpha$ -Taxilin mit assemblierten Kapsidpartikeln und LHBsAg, nicht jedoch mit SHBsAg (siehe Kapitel 5.5 Abb. 5.17 und 5.18). Um die Ergebnisse der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie (CLSM) zu verifizieren und zu untersuchen, ob LHBs-Ag tatsächlich mit  $\alpha$ -Taxilin interagiert, wurden Lysate HBV-replizierender Zellen einer Co-Immunpräzipitationsanalyse unterzogen (siehe Kapitel 5.6 Abb. 5.19 und Kapitel 5.7 Abb. 5.20). In der Tat bestätigte sich die Interaktion von  $\alpha$ -Taxilin mit LHBs-Ag, nicht jedoch mit SHBs-Ag.

Im Zuge der Beobachtung der alleinigen Interaktion von  $\alpha$ -Taxilin mit LHBs-Ag und nicht mit SHBs-Ag stellte sich die Frage, auf welchem Weg Viruspartikel und subvirale Partikel (SVP) die Zelle verlassen und welche Rolle  $\alpha$ -Taxilin dabei spielen könnte. Wie bereits beschrieben, werden während einer HBV-Infektion außer den infektiösen viralen Partikeln auch subvirale Partikel (SVP) sekretiert (Ganem, 1991). SVPs bestehen nur aus der Hüllmembran (hauptsächlich SHBs-Ag), besitzen keine DNA und sind deshalb nicht infektiös. Virale und subvirale Partikel verlassen die Zelle über unterschiedliche Wege. Für HBV wurde die Freisetzung viraler Partikel unter der Beteiligung der ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex required for transport*) bereits

nachgewiesen (Lambert *et al.*, 2007). Auch andere Virus-Klassen verlassen die Zelle durch ähnliche Mechanismen unter Beteiligung der ESCRT-Maschinerie (Lambert *et al.*, 2007). Das ESCRT-System erkennt ubiquitinierte Proteine und sortiert sie in intraluminale Vesikel (ILV) (Hurley und Hanson, 2010). Späte Endosomen mit einer Vielzahl von ILVs werden auch multivesikuläre Körper genannt (MVB) (Hurley und Hanson, 2010). Die Coexpression dominant-negativer Mutanten verschiedener ESCRT-Komponenten in HBV-replizierenden Zellen führte zur Hemmung des HBV-Zusammenbaus und dessen Freisetzung (Lambert *et al.*, 2007). Die Freisetzung subviraler Partikel blieb jedoch unbeeinflusst, was einen alternativen, ESCRT-unabhängigen Sezernierungsweg der SVPs vermuten lässt (Lambert *et al.*, 2007). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Um die Rolle von  $\alpha$ -Taxilin und einen eventuellen Einfluss auf die Freisetzung viraler Partikel zu analysieren, wurde das Protein transient in HBV-positiven Zellen überexprimiert und der Einfluss auf die Menge freigesetzter Viren mittels qPCR quantifiziert. Eine moderate Überexpression von  $\alpha$ -Taxilin zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl freigesetzter HBV-Genome (siehe Kapitel 5.3 Abb. 5.13). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass endogene  $\alpha$ -Taxilin-Mengen in HBV-positiven Zellen so hoch sind, dass eine weitere Überexpression keinen Effekt auf die HBV-Freisetzung hat.

Dass  $\alpha$ -Taxilin die Replikation des HBV dennoch beeinflusst, konnte in Depletionsstudien nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Überexpression führte der *knockdown* des  $\alpha$ -Taxilin-Gens zu einer signifikant verminderten Anzahl freigesetzter Viren (siehe Kapitel 5.4 Abb. 5.15). Dies unterstützt die Hypothese, dass  $\alpha$ -Taxilin eine entscheidende Rolle in der HBV-Replikation spielt. Aber nicht nur die Virusreplikation wird durch  $\alpha$ -Taxilin massiv reguliert, sondern auch die Freisetzung viraler Partikel. So konnten in Zellüberständen transfizierter *knockdown*-Zellen erhöhte Mengen an HBe- und HBs-Ag im Vergleich zur Kontrolle mittels ELISA detektiert werden (siehe Kapitel 5.4 Abb. 5.16). Wie bereits beschrieben wird spekuliert, dass  $\alpha$ -Taxilin als SM-Protein fungieren könnte, indem es freies Syntaxin bindet und die SNARE-Komplex-Bildung und folglich den Vesikeltransport verhindert (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a). Wird die Expression von  $\alpha$ -Taxilin inhibiert, steht ausreichend freies Syntaxin für die Bildung des SNARE-Komplexes zur Verfügung. Somit kann der vesikuläre Transport ungestört ablaufen, was die erhöhten Mengen HBe- und HBs-Ag im Überstand erklären könnte.

Bei der Betrachtung der Proteinsequenz von  $\alpha$ -Taxilin fiel eine Vielzahl an prolinreichen Motiven (sogenannten PXXP-Motiven) auf. Diese sogenannten *late domains* sind für die Interaktion von Viren mit Komponenten des ESCRT-Systems erforderlich (Hurley und Hanson, 2010, Lambert *et al.*, 2007). Im Replikationszyklus entstehen neue Viruspartikel umhüllter Viren durch die Knospung an Membranen der Wirtszelle (Rost *et al.*, 2008). In diesem Prozess steuert die ESCRT-Maschinerie die Vesikelbildung und -abschnürung und führt so zur Bildung der MVBs. Die entstehenden ILVs können mit dem Lysosom oder aber auch mit der Plasmamembran fusionieren. Somit könnte das ESCRT-System einen potentiellen Sekretionsweg viraler Partikel aus der infizierten Zelle vermitteln. Lokalisationsstudien ergaben, dass die Virusmorphogenese und die Umhüllung der HBV-Partikel

vermutlich direkt an den MVBs stattfindet (Lambert *et al.*, 2007). Die beteiligten Wirtszellkomponenten sind für HBV jedoch bisher wenig erforscht. Für HIV konnte bereits eine Interaktion des gag-Proteins über seine PXXP-Motive mit der ESCRT-Komponente tsg101 nachgewiesen werden (Garrus *et al.*, 2001, VerPlank *et al.*, 2001). Aber auch andere Viren wie zum Beispiel Ebola- und Marburgviren interagieren über ihre PXXP-Motive mit der ESCRT-Komponente tsg101 (Martin-Serrano *et al.*, 2001, Dolnik *et al.*, 2010). Auch  $\alpha$ -Taxilin besitzt eine Vielzahl dieser PXXP-Motive. Deshalb ist eine Interaktion mit dem ESCRT-System vorstellbar. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Hier war eine erhöhte Menge tsg101 in HBV-replizierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen detektierbar (Daten nicht gezeigt). In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass parallel zur Expression von  $\alpha$ -Taxilin auch die Expression von tsg101 in HBV-positiven Zellen erhöht ist und Fraktionen der beiden Proteine colokalisieren (siehe Kapitel 5.9 Abb. 5.23). Umgekehrt zeigte sich, dass der *knockdown* der  $\alpha$ -Taxilin-Expression eine deutliche Verminderung der tsg101-Expression zur Folge hat (siehe Kapitel 5.8 Abb. 5.22). Die Korrelation der Mengen dieser beiden Proteine sowie dessen Colokalisation warf die Frage auf, ob es sich hierbei um eine Interaktion handeln könnte. Und tatsächlich konnte die Interaktion zwischen tsg101 und  $\alpha$ -Taxilin mittels Co-Immunpräzipitationsanalysen verifiziert werden (siehe Kapitel 5.10 Abb. 5.24). Dies deutet darauf hin, dass  $\alpha$ -Taxilin direkt mit einer Komponente des ESCRT-Systems interagiert und auf diese Weise am Export viraler Partikel beteiligt sein könnte.

Bisher sind die genauen Mechanismen der Transportwege des Virus aus der Zelle noch nicht vollständig verstanden. Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nahe, dass  $\alpha$ -Taxilin als Adapterprotein zwischen Virus und dem ESCRT-System fungieren könnte. Die erhöhten Mengen von  $\alpha$ -Taxilin in HBV-replizierenden Zellen sowie *in vivo* deuten auf eine pathologische Relevanz und eine wichtige Rolle des Proteins im HBV-Lebenszyklus hin. Dabei scheint  $\alpha$ -Taxilin essentiell für die Regulation der HBV-Replikation zu sein, da die Depletion des  $\alpha$ -Taxilin-Gens zu einer massiven Verminderung der HBV-Replikation führt. Daraus kann man schließen, dass  $\alpha$ -Taxilin für das Virus essentiell zu sein scheint und die Vermehrung des Virus gewährleistet.  $\alpha$ -Taxilin scheint aber nicht nur an der Replikation von HBV beteiligt zu sein, sondern könnte auch Teil der Virusmorphogenese sein. In dieser Arbeit konnten wir sowohl die Interaktion von  $\alpha$ -Taxilin mit einem Oberflächenprotein viraler Partikel (LHBs-Ag) nachweisen als auch die Interaktion von  $\alpha$ -Taxilin mit der ESCRT-Komponente tsg101. Da den HBV-Strukturproteinen die PXXP-Motive, die für die Interaktion mit dem ESCRT-System essentiell sind, fehlen, ist es vorstellbar, dass  $\alpha$ -Taxilin über seine PXXP-Motive den Kontakt zu tsg101 vermittelt. Auf diese Weise könnte  $\alpha$ -Taxilin als Adapter zwischen HBV und der ESCRT-Maschinerie fungieren und somit an der Virusmorphogenese an den MVBs beteiligt sein. Viruspartikel könnten so mit Hilfe von  $\alpha$ -Taxilin aus der Zelle transportiert werden.

In weiteren Versuchen könnte untersucht werden, ob  $\alpha$ -Taxilin zusätzlich mit anderen Komponenten der ESCRT-Maschinerie interagiert. Ist dies nicht der Fall, so könnte man die Interaktion mit tsg101 möglicherweise hemmen und somit die Virus-Sekretion unterbinden. Würde dies gelingen,

so könnte das einen möglichen Therapieansatz darstellen, der die Verbreitung des Virus verhindern würde. Zuvor müssten durch Kartierung der funktionellen Abschnitte die Bindestellen von  $\alpha$ -Taxilin identifiziert werden. Außerdem ist von Interesse, ob  $\alpha$ -Taxilin ein Ubiquitin-Interaktions-Motiv besitzt, welches zusätzlich den Kontakt zur ESCRT-Maschinerie vermitteln könnte. Des Weiteren könnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden, ob es in  $\alpha$ -Taxilin-defizienten Zellen zu einer intrazellulären Akkumulation von HBV-spezifischen Proteinen kommt bzw. eine andere subzelluläre Verteilung zu beobachten ist. In weiteren Experimenten könnten *rescue*-Experimente Aufschluss darüber geben, ob die Replikation durch die Transfektion eines  $\alpha$ -Taxilin-Expressionsplasmids wiederhergestellt werden kann.

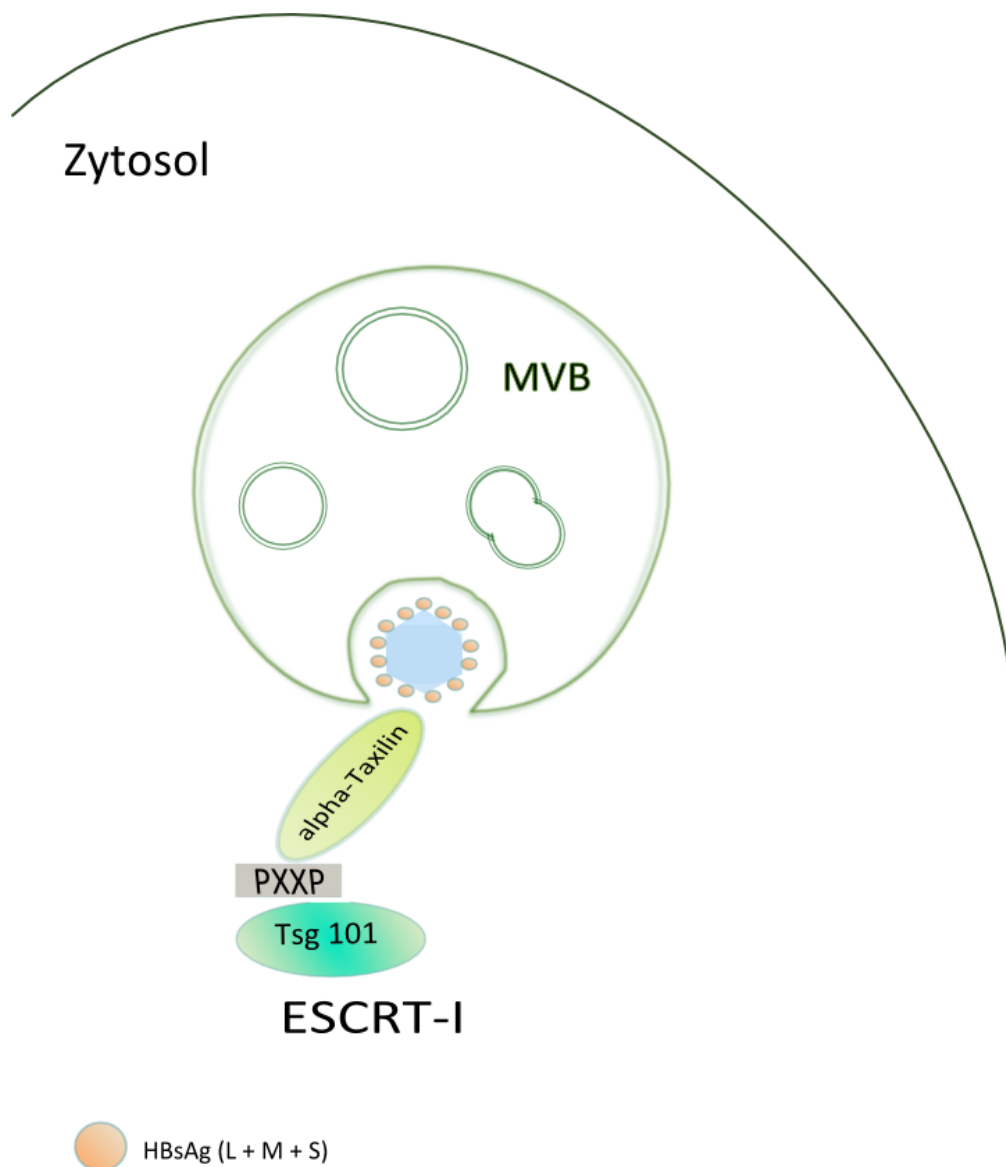


Abb. 6.1: Hypothese

## 7 Summary

### Characterization of the importance of $\alpha$ -taxilin for the life cycle of the hepatitis B virus

The human hepatitis B virus (HBV) belongs to the family of *hepadnaviridae* (Schädler und Hildt, 2009). It harbors a partially double-stranded DNA genome which is about 3.2 kb in size (Schädler und Hildt, 2009). HBV is a major cause of liver disease which can cause acute or chronic hepatitis. In addition, HBV is considered to be a major etiological factor in the development of human hepatocellular carcinoma (HCC) (Lupberger und Hildt, 2007, Cougot *et al.*, 2005). Beside the viral particles there are also so called subviral particles (SVP) detectable in the blood of infected patients (Ganem, 1991). SVPs are composed of SHBs-Ag, do not contain viral DNA and are therefore not infectious.

HBV itself is not cytopathogenic. But the risk of HCC in HBV infected patients is much higher than in uninfected patients (Beasley *et al.*, 1981). Therefore HBV plays an important role in the pathogenesis of HCC (Beasley, 1988). Recent studies showed that  $\alpha$ -taxilin, a newly identified membrane traffic-related molecule, is upregulated in malignant tissues of HCCs (Ohtomo *et al.*, 2010), which can be the consequence of a chronic HBV infection.  $\alpha$ -taxilin is a ubiquitously expressed protein of 62 kDa. There is not much known about the function of this protein. Therefore in this study the interference between HBV and  $\alpha$ -taxilin should be investigated in more detail. Western blot analysis and immunofluorescence staining revealed higher  $\alpha$ -taxilin amounts in stable HBV-expressing and transiently transfected cells. This investigation could be confirmed in *in vivo* models, such as HBV-transgenic mice and livers of HBV infected patients (see chapter 5.1 fig. 5.1, chapter 5.2.1 fig. 5.4, chapter 5.2.2 fig. 5.9 and 5.10). In contrast to the finding of high  $\alpha$ -taxilin mRNA levels in HBV-replicating cells (see chapter 5.1 fig. 5.2) and in human liver samples (see chapter 5.2.2 fig. 5.11), the  $\alpha$ -taxilin mRNA levels in HBV-transgenic mice were lower compared to the control (see chapter 5.2.1 fig. 5.5). A possible explanation to this finding could be a different regulation mechanism of  $\alpha$ -taxilin in humans and mice. A long half life of the protein  $\alpha$ -taxilin in mice which causes the lower amounts of mRNA, could be possible. A different explanation could be a negative feedback mechanism caused by the high  $\alpha$ -taxilin amounts in order to downregulate the mRNA levels.

Based on the higher  $\alpha$ -taxilin amounts in several HBV infection models, we wanted to know if an overexpression of  $\alpha$ -taxilin would influence the HBV replication. However, overexpression of  $\alpha$ -taxilin showed no significant effect on the HBV replication (see chapter 5.3 fig. 5.13). The

$\alpha$ -taxilin amounts are so high that a moderate overexpression has presumably no effect.

In contrast to the overexpression, inhibition of  $\alpha$ -taxilin by siRNA abolishes HBV replication almost completely (see chapter 5.4 fig. 5.15). This supports the hypothesis that  $\alpha$ -taxilin plays an important role in HBV replication. But not only the viral replication is massively regulated by  $\alpha$ -taxilin, but also the release of viral particles. ELISA measurements of supernatants of  $\alpha$ -taxilin knockdown cells revealed higher amounts of HBs- and HBe-antigen (see chapter 5.4 fig. 5.16). As already described, it is speculated that  $\alpha$ -taxilin acts as a SM-protein by binding free syntaxin and therefore prevents the SNARE complex formation and the vesicle transport (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a). When the expression of  $\alpha$ -taxilin is inhibited, the syntaxins are available for SNARE complex formation and therefore the vesicular transport can take place which explains the elevated levels of HBe- and HBs-antigen in the supernatant.

In order to get more information about the subcellular distribution of  $\alpha$ -taxilin, we performed immunofluorescence staining. It was found that  $\alpha$ -taxilin colocalizes with core and LHBs-antigen, but not with SHBs-antigen, which is the main constituent of SVPs (see chapter 5.5 fig. 5.17 and 5.18). To verify if this colocalization is due to an interaction or not, we performed co-immunoprecipitation. These data confirm the interaction between  $\alpha$ -taxilin and LHBs-Ag and PreS1PreS2, respectively (see chapter 5.6 fig. 5.19 and chapter 5.7 fig. 5.20), which confirms our assumption of an essential role of  $\alpha$ -taxilin for the HBV lifecycle.

Recent work provides evidence that viral particles leave the cell by a pathway that is different from the pathway used by SVPs (Lambert *et al.*, 2007). Although HBV is an enveloped DNA virus, there is evidence that maturation and egress of HBV depends on intraluminal vesicles (ILV) of maturing endosomes – the multivesicular bodies (MVB) (Patient *et al.*, 2009, Lambert *et al.*, 2007, Watanabe *et al.*, 2007). It could be shown that HBV assembly and egress were potentially blocked by perturbing the MVB machinery. The release of subviral particles was not affected by MVB inhibitors (Lambert *et al.*, 2007). However, efficient release of enveloped viruses using the ESCRT system requires the presence of viral late domains including PXXP motives (Hurley und Hanson, 2010, Lambert *et al.*, 2007). For HIV it could be shown that the structural gag protein binds to tsg101 (a component of the ESCRT-I complex) via its PXXP motives (Garrus *et al.*, 2001, VerPlank *et al.*, 2001). The sequence of  $\alpha$ -taxilin harbors a variety of such PXXP motives, which are found in the N-terminal domain and clustered in the C-terminal part of the protein. Therefore the ESCRT system could represent a potential secretion pathway for HBV viral particles. In order to analyze the influence of HBV on the ESCRT system, western blot analysis and immunofluorescence stainings were performed.

Western blot (data not shown) and immunofluorescence analysis could show that the expression of the ESCRT-component tsg101 is upregulated in HBV-positive cells in parallel to the higher  $\alpha$ -taxilin amounts (see chapter 5.8 fig. 5.21). In chapter 5.9 fig. 5.23 a partial colocalization of both proteins can be seen. Vice versa, inhibition of  $\alpha$ -taxilin expression results in decreased levels of intracellular tsg101 (see chapter 5.8 fig. 5.22). In co-immunoprecipitation experiments we could prove an interaction between  $\alpha$ -taxilin and tsg101 (see chapter 5.10 fig. 5.24).

Taken together, these results indicate that  $\alpha$ -taxilin plays an essential role in HBV replication, as well as an important role in the morphogenesis of HBV. HBV infection has an enhancing effect on the  $\alpha$ -taxilin expression, which could be shown in several infection models. The important role of  $\alpha$ -taxilin could be proved by inhibition of  $\alpha$ -taxilin which abolished HBV replication almost completely. The interaction of  $\alpha$ -taxilin with the viral structural protein LHBs on one side and the interaction of  $\alpha$ -taxilin with the ESCRT system on the other side makes it very likely that  $\alpha$ -taxilin serves as an adaptor protein. Because HBV structural proteins lack the late domains which are essential for the binding to the ESCRT system we conclude that  $\alpha$ -taxilin serves as an adaptor protein binding LHBs-Ag and provides the PXXP motives which are essential for the binding to the ESCRT system.

In future experiments, it could be investigated whether  $\alpha$ -taxilin also interacts with other components of the ESCRT machinery. If this is not the case, one could inhibit the interaction with tsg101 and thus prevent the virus secretion. If this would succeed, it could be a potential therapeutic approach that would prevent the spread of the virus. Previously, the functional binding sites of  $\alpha$ -taxilin which are responsible for the binding to the ESCRT machinery and the virus must be identified. This could be analyzed by means of a genetic mapping of  $\alpha$ -taxilin. Moreover, it would be interesting to see whether  $\alpha$ -taxilin harbors a ubiquitin interaction motif which also provides contact to the ESCRT machinery. In further experiments, rescue experiments could shed light on whether the HBV replication can be recovered by the transfection of an  $\alpha$ -taxilin expression plasmid.



## 8 Zusammenfassung

### Charakterisierung der Bedeutung von $\alpha$ -Taxilin für den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) besteht aus einem kleinen (3,2 kb) zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA-Genom und verursacht akute und chronische Hepatitiden, Leberzirrhose und hepatozelluläre Karzinome (Ganem und Varmus, 1987).

In vorangegangenen Studien anderer Arbeitsgruppen konnten vermehrte Mengen des Proteins  $\alpha$ -Taxilin in tumorösem Gewebe von Nierenzellkarzinomen und HCCs nachgewiesen werden (Ohtomo *et al.*, 2010). HCCs können als Folge einer chronischen HBV-Infektion entstehen (Lupberger und Hildt, 2007, Cougot *et al.*, 2005).  $\alpha$ -Taxilin ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einer Größe von 62 kDa. Allgemein ist relativ wenig über dieses Protein bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interferenz von HBV mit  $\alpha$ -Taxilin näher untersucht. In Western-Blot- und Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass sich HBV steigend auf die Expression von  $\alpha$ -Taxilin auswirkt. Dies konnte sowohl in stabil und transient transfizierten HBV-replizierenden Zelllinien als auch *in vivo* im HBV-transgenen Mausmodell und in Lebern HBV-infizierter Patienten nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.1 Abb. 5.1, Kapitel 5.2.1 Abb. 5.4, Kapitel 5.2.2 Abb. 5.9 und 5.10). Die Messung gesamtzellulärer RNA in stabil und transient transfizierten, HBV-replizierenden Zellen (siehe Kapitel 5.1 Abb. 5.2) sowie in humanen Leberproben (siehe Kapitel 5.2.2 Abb. 5.11) mittels quantitativer real-time PCR (RT-PCR) wies ebenfalls erhöhte  $\alpha$ -Taxilin-Mengen auf. In Lebern HBV-transgener Mäuse war jedoch eine geringere  $\alpha$ -Taxilin-mRNA-Menge trotz höherer Proteinmengen im Vergleich zu den Kontrollmäusen detektierbar (siehe Kapitel 5.2.1 Abb. 5.5). Hierfür könnten unterschiedliche Regulationsmechanismen des  $\alpha$ -Taxilin-Gens verantwortlich sein. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen im Mausmodell ist, dass  $\alpha$ -Taxilin eine längere Halbwertszeit hat, welche zu einer verringerten mRNA-Menge führt. Eine andere mögliche Erklärung könnte ein negativer feedback-Mechanismus sein, welcher durch die hohen  $\alpha$ -Taxilin-Mengen bedingt ist und das mRNA-Niveau herunterreguliert.

Die Beobachtungen erhöhter  $\alpha$ -Taxilin-Mengen durch HBV warf die Frage auf, wie sich eine Überexpression von  $\alpha$ -Taxilin auf die HBV-Replikation auswirken würde. Die Überexpression führte jedoch zu keinem signifikanten Effekt auf die HBV-Replikation, da die  $\alpha$ -Taxilin-Expression in HBV-replizierenden Zellen schon so weit hochreguliert ist, dass die Replikation durch eine weitere Überexpression unbeeinflusst bleibt (siehe Kapitel 5.3 Abb. 5.13).

Im Gegensatz dazu führte der *knockdown* des  $\alpha$ -Taxilin-Gens zu einer signifikant verminderten Anzahl freigesetzter Viren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen (siehe Kapitel 5.4 Abb. 5.15). Dies lässt vermuten, dass die Inhibierung von  $\alpha$ -Taxilin zu einer verminderten HBV-Replikation und somit zu einer verminderten Freisetzung infektiöser Viruspartikel führt. ELISA-Messungen der Überstände transfizierter  $\alpha$ -Taxilin-*knockdown*-Zellen zeigten erhöhte Mengen an HBs- und HBe-Ag (siehe Kapitel 5.4 Abb. 5.16). Wie bereits beschrieben wird spekuliert, dass  $\alpha$ -Taxilin als SM-Protein fungieren könnte (Nogami *et al.*, 2003, Nogami *et al.*, 2003a). Es ist vorstellbar, dass  $\alpha$ -Taxilin als negativer Regulator auf die SNARE-Formation wirkt, indem es freies Syntaxin bindet und die SNARE-Komplex-Bildung und folglich den Vesikeltransport verhindert. Wird die Expression von  $\alpha$ -Taxilin inhibiert, steht ausreichend freies Syntaxin für die Bildung des SNARE-Komplexes zur Verfügung. Somit kann der vesikuläre Transport ungestört ablaufen, was die erhöhten Mengen HBe- und HBs-Ag im Überstand erklären könnte.

Der beobachtete Effekt der verminderten Anzahl freigesetzter Viren in  $\alpha$ -Taxilin-*knockdown*-Zellen lässt jedoch vermuten, dass  $\alpha$ -Taxilin eine wichtige Rolle im Export viraler Partikel spielen könnte. Um dies näher zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisation von  $\alpha$ -Taxilin mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen näher analysiert. Hier fiel auf, dass  $\alpha$ -Taxilin mit Core und LHBs-Ag colokalisiert, nicht aber mit SHBs-Ag, welches Hauptbestandteil subviraler Partikel ist (siehe Kapitel 5.5 Abb. 5.17 und 5.18). Um zu verifizieren, ob es sich dabei um echte Interaktionen handelt, wurden Co-Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt. Diese bestätigten die Interaktion von  $\alpha$ -Taxilin mit LHBs-Ag bzw. PreS1PreS2 (siehe Kapitel 5.6 Abb. 5.19 und Kapitel 5.7 Abb. 5.20). Dies bestätigt die Vermutung einer essentiellen Rolle von  $\alpha$ -Taxilin für den HBV-Lebenszyklus. Es ist bekannt, dass virale und subvirale Partikel die infizierte Zelle über unterschiedliche Mechanismen verlassen (Lambert *et al.*, 2007). Virale Partikel werden unter Beteiligung der ESCRT-Maschinerie sezerniert, der Weg der subviralen Partikel ist ESCRT-unabhängig (Lambert *et al.*, 2007). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden und sind Gegenstand aktueller Forschung.

Bei der Betrachtung der Proteinsequenz von  $\alpha$ -Taxilin fielen eine Vielzahl von prolinreichen Motiven, sogenannten PXXP-Motiven, auf. Beim humanen Immundefizienzvirus (HIV) enthält das gag-Protein eine Vielzahl dieser *late domains* (PXXP-Motive) und vermittelt so die Interaktion mit der ESCRT-Komponente tsg101 (Garrus *et al.*, 2001, VerPlank *et al.*, 2001). Das ESCRT-System ist für die Erkennung ubiquitinerter Membranproteine verantwortlich und sortiert sie in intraluminale Vesikel (ILVs) (Hurley und Hanson, 2010). Die entstehenden ILVs können mit dem Lysosom oder aber auch mit der Plasmamembran fusionieren. Somit könnte das ESCRT-System einen potentiellen Sekretionsweg viraler Partikel aus der infizierten Zelle vermitteln. In Western-Blot-Analysen (Daten nicht gezeigt) und Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass parallel zur Expression von  $\alpha$ -Taxilin auch die Expression der ESCRT-Komponente tsg101 in HBV-positiven Zellen erhöht ist (siehe Kapitel 5.8 Abb. 5.21) und dass beide Proteine colokalisieren (siehe Kapitel 5.9 Abb. 5.23). Umgekehrt zeigte sich, dass der *knockdown* der  $\alpha$ -Taxilin-Expression eine deutliche Verminderung der tsg101-Expression zur Folge hat (siehe Kapitel 5.8 Abb. 5.22). Die Interaktion

der beiden Proteine konnte mittels Co-Immunpräzipitationsanalyse schließlich verifiziert werden (siehe Kapitel 5.10 Abb. 5.24). Da HBV-Strukturproteine frei von sogenannten *late domains* sind, liegt die Vermutung nahe, dass  $\alpha$ -Taxilin eine Adapterrolle im HBV-Lebenszyklus einnimmt, dem ESCRT-System die prolinreichen Motive liefert und so die Bindung an tsg101 ermöglicht. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Taxilin sowohl eine Rolle in der Replikation von HBV als auch eine Rolle in der Virusmorphogenese spielt. Die HBV-Infektion wirkt sich steigend auf die Expression von  $\alpha$ -Taxilin aus, was in mehreren Infektionsmodellen nachgewiesen werden konnte.  $\alpha$ -Taxilin scheint für die Replikation des Virus essentiell zu sein, da der *knockdown* des Gens die Replikation hemmt. Die Interaktion von  $\alpha$ -Taxilin mit LHBs-Ag und  $\alpha$ -Taxilin mit der ESCRT-Komponente tsg101 konnte nachgewiesen werden und legt eine Rolle als Adapterprotein von  $\alpha$ -Taxilin nahe. *Late domains* sind für die Interaktion von Viren mit dem ESCRT-System erforderlich (Lambert *et al.*, 2007). Die Sequenz von  $\alpha$ -Taxilin weist eine Vielzahl dieser PXXP-Motive auf, welche den HBV-Strukturproteinen fehlen. Auch die Expression der ESCRT-Komponente tsg101 ist in HBV-replizierenden Zellen erhöht, was die Hypothese unterstützt.

In zukünftigen Experimenten könnten *rescue*-Experimente Aufschluss darüber geben, ob die Replikation durch die Transfektion eines  $\alpha$ -Taxilin-Expressionsplasmids wiederhergestellt werden kann. Außerdem ist es von Interesse herauszufinden, welche Stelle von  $\alpha$ -Taxilin für die Bindung mit dem ESCRT-System sowie mit dem Virus verantwortlich ist. Dies könnte mittels einer Genkartierung von  $\alpha$ -Taxilin analysiert werden. In weiteren Versuchen könnte untersucht werden, ob  $\alpha$ -Taxilin zusätzlich mit anderen Komponenten der ESCRT-Maschinerie interagiert. Ist dies nicht der Fall, so könnte man die Interaktion mit tsg101 möglicherweise hemmen und somit die Virus-Sekretion unterbinden. Würde dies gelingen, so könnte das einen möglichen Therapieansatz darstellen, der die Verbreitung des Virus verhindern würde. Außerdem ist von Interesse, ob  $\alpha$ -Taxilin ein Ubiquitin-Interaktions-Motiv besitzt, welches zusätzlich den Kontakt zur ESCRT-Maschinerie vermitteln könnte.

# Literaturverzeichnis

- ANGERS C G und MERZ A J. New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Semin Cell Dev Biol* 22(1): 18–26. **2011**
- APPENZELLER-HERZOG C und HAURI H P. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119(Pt 11): 2173–2183. **2006**
- BEASLEY R P. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61(10): 1942–1956. **1988**
- BEASLEY R P, HWANG L Y, LIN C C und CHIEN C S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2(8256): 1129–1133. **1981**
- BEHNIA R und MUNRO S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438(7068): 597–604. **2005**
- BIRNBOIM H C und DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513–1523. **1979**
- BÖKER K H und MANNS M P. [Inhibition of the progression of chronic liver diseases]. *Internist (Berl)* 34(4): 316–325. **1993**
- BLIGHT K J, MCKEATING J A und RICE C M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 76(24): 13001–13014. **2002 Dec**
- BOCK J B, MATERN H T, PEDEN A A und SCHELLER R H. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409(6822): 839–841. **2001**
- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254. **1976**
- BRÖCKER C, ENGELBRECHT-VANDRÉ S und UNGERMANN C. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr Biol* 20(21): R943–R952. **2010**
- BROWN F C und PFEFFER S R. An update on transport vesicle tethering. *Mol Membr Biol* 27(8): 457–461. **2010**
- BRUNS M, MISKA S, CHASSOT S und WILL H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 72(2): 1462–1468. **1998**
- BRUSS V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 106(2): 199–209. **2004**

- BRUSS V, LU X, THOMSEN R und GERLICH W H. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* 13(10): 2273–2279. **1994**
- BUSTER E H C J und JANSSEN H L A. Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection—immune modulation or viral suppression? *Neth J Med* 64(6): 175–185. **2006**
- CARLTON J G und MARTIN-SERRANO J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316(5833): 1908–1912. **2007**
- CARR C M und RIZO J. At the junction of SNARE and SM protein function. *Curr Opin Cell Biol* 22(4): 488–495. **2010**
- CHANG M H. Cancer prevention by vaccination against hepatitis B. *Recent Results Cancer Res* 181: 85–94. **2009**
- CHISARI F V und FERRARI C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 17(2-3): 261–281. **1995**
- CHISARI F V, ISOGAWA M und WIELAND S F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 58(4): 258–266. **2010**
- CHRISTOFORIDIS S, MIACZYNSKA M, ASHMAN K, WILM M, ZHAO L, YIP S C, WATERFIELD M D, BACKER J M und ZERIAL M. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1(4): 249–252. **1999**
- CORNBERG M, PROTZER U, PETERSEN J, WEDEMEYER H, BERG T, JILG W, ERHARDT A, WIRTH S, SARRAZIN C, DOLLINGER M M, SCHIRMACHER P, DATHE K, KOPP I B, ZEUZEM S, GERLICH W H, MANNS M P und A W M F. [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline]. *Z Gastroenterol* 49(7): 871–930. **2011**
- COUGOT D, NEUVEUT C und BUENDIA M A. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* 34 Suppl 1: S75–S78. **2005**
- DE FRANCHIS R, HADENGUE A, LAU G, LAVANCHY D, LOK A, MCINTYRE N, MELE A, PAUMGARTNER G, PIETRANGELO A, RODÉS J, ROSENBERG W, VALLA D und E A S L J. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *J Hepatol* 39 Suppl 1: S3–25. **2003**
- DE FRANCHIS R, MEUCCI G, VECCHI M, TATARELLA M, COLOMBO M, DEL NINNO E, RUMI M G, DONATO M F und RONCHI G. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med* 118(3): 191–194. **1993**
- DIRAC-SVEJSTRUP A B, SUMIZAWA T und PFEFFER S R. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J* 16(3): 465–472. **1997**

- DOLNIK O, KOLESNIKOVA L, STEVERMANN L und BECKER S. Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles. *J Virol* 84(15): 7847–7856. **2010**
- EBLE B E, LINGAPPA V R und GANEM D. The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol* 64(3): 1414–1419. **1990**
- EHRHARDT M M K A W A W V U L S CS. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction S.* 179–184. **2006**
- FASSHAUER D. Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1641(2-3): 87–97. **2003**
- FASSHAUER D, OTTO H, ELIASON W K, JAHN R und BRÜNGER A T. Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* 272(44): 28036–28041. **1997**
- FASSHAUER D, SUTTON R B, BRUNGER A T und JAHN R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15781–15786. **1998**
- FERRARI C, PENNA A, BERTOLETTI A, VALLI A, ANTONI A D, GIUBERTI T, CAVALLI A, PETIT M A und FIACCADORI F. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 145(10): 3442–3449. **1990**
- FILIMONENKO M, STUFFERS S, RAIBORG C, YAMAMOTO A, MALERØD L, FISHER E M C, ISAACS A, BRECH A, STENMARK H und SIMONSEN A. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 179(3): 485–500. **2007**
- FUJII K, HURLEY J H und FREED E O. Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat Rev Microbiol* 5(12): 912–916. **2007**
- GANEM D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol* 168: 61–83. **1991**
- GANEM D und PRINCE A M. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350(11): 1118–1129. **2004**
- GANEM D und VARMUS H E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 56: 651–693. **1987**
- GANEM D U R J S. "Hepadnaviridae: the viruses and their replication.". In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Volume 2. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins 2923-2969. **2002**

- GARRUS J E, VON SCHWEDLER U K, PORNILLOS O W, MORHAM S G, ZAVITZ K H, WANG H E, WETTSTEIN D A, STRAY K M, CÔTÉ M, RICH R L, MYSZKA D G und SUNDQUIST W I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107(1): 55–65. **2001**
- GERLICH W H und ROBINSON W S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21(3): 801–809. **1980**
- GLEBE G W D. Neue Wege der Impfung gegen Hepatitis B **2009**
- GRIPON P, CANNIE I und URBAN S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 79(3): 1613–1622. **2005**
- GROSSHANS B L, ORTIZ D und NOVICK P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 11821–11827. **2006**
- GUIDOTTI L G, ANDO K, HOBBS M V, ISHIKAWA T, RUNKEL L, SCHREIBER R D und CHISARI F V. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3764–3768. **1994**
- GUIDOTTI L G und CHISARI F V. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 8(4): 478–483. **1996**
- GUIDOTTI L G und CHISARI F V. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* 273(2): 221–227. **2000**
- GUIDOTTI L G und CHISARI F V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 1: 23–61. **2006**
- GUIDOTTI L G, MATZKE B, PASQUINELLI C, SHOENBERGER J M, ROGLER C E und CHISARI F V. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol* 70(10): 7056–7061. **1996**
- GUIDOTTI L G, MATZKE B, SCHALLER H und CHISARI F V. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 69(10): 6158–6169. **1995**
- HAFNER A, BRANDENBURG B und HILDT E. Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein. *EMBO Rep* 4(8): 767–773. **2003**
- HEERMANN K H, GOLDMANN U, SCHWARTZ W, SEYFFARTH T, BAUMGARTEN H und GERLICH W H. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* 52(2): 396–402. **1984**
- HICKE L und DUNN R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141–172. **2003**
- HOLLINGER F B. Comprehensive control (or elimination) of hepatitis B virus transmission in the United States. *Gut* 38 Suppl 2: S24–S30. **1996**

- HUOTARI J und HELENIUS A. Endosome maturation. *EMBO J* 30(17): 3481–3500. **2011**
- HURLEY J H und HANSON P I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(8): 556–566. **2010**
- JAHN R und SCHELLER R H. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9): 631–643. **2006**
- KANN G W M. *Hepadnaviridae: structure and molecular virology*. In: Zuckerman, A., Thomas, H., eds., *Viral Hepatitis*, London: Churchill Livingstone 77-105. **1998**
- KANN M und GERLICH W H. Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol* 68(12): 7993–8000. **1994**
- KAPLAN P M, GREENMAN R L, GERIN J L, PURCELL R H und ROBINSON W S. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 12(5): 995–1005. **1973**
- KATZ M, SHTIEGMAN K, TAL-OR P, YAKIR L, MOSESSON Y, HARARI D, MACHLUF Y, ASAO H, JOVIN T, SUGAMURA K und YARDEN Y. Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* 3(10): 740–751. **2002**
- KÖCK J, BORST E M und SCHLICHT H J. Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol* 70(9): 5827–5831. **1996**
- KIDD-LJUNGGREN K, ZUKER M, HOFACKER I L und KIDD A H. The hepatitis B virus pregenome: prediction of RNA structure and implications for the emergence of deletions. *Intervirology* 43(3): 154–164. **2000**
- KLINGMÜLLER U und SCHALLER H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol* 67(12): 7414–7422. **1993**
- KNOWLES B B, HOWE C C und ADEN D P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209(4455): 497–499. **1980**
- KRIEGS M, BÜRCKSTÜMMER T, HIMMELSBACH K, BRUNS M, FRELIN L, AHLÉN G, SÄLLBERG M und HILDT E. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein impairs both the innate and adaptive hepatic immune response in vivo. *J Biol Chem* 284(41): 28343–28351. **2009**
- KYHSE-ANDERSEN J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: simple and efficient method for immunoblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10(3-4): 203–209. **1984**
- LADNER S K, OTTO M J, BARKER C S, ZAIFERT K, WANG G H, GUO J T, SEEGER C und KING R W. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected



- hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* 41(8): 1715–1720. **1997**
- LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685. **1970**
- LAMBERT C, DÖRING T und PRANGE R. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol* 81(17): 9050–9060. **2007**
- LE SEYEC J, CHOUTEAU P, CANNIE I, GUGUEN-GUILLOUZO C und GRIPON P. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* 72(7): 5573–5578. **1998**
- LEE J A, BEIGNEUX A, AHMAD S T, YOUNG S G und GAO F B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 17(18): 1561–1567. **2007**
- LEPÈRE-DOUARD C, TROTARD M, LE SEYEC J und GRIPON P. The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J Virol* 83(22): 11819–11829. **2009**
- LUPBERGER J und HILDT E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 13(1): 74–81. **2007**
- MAGNIUS L O und NORDER H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38(1-2): 24–34. **1995**
- MARTIN-SERRANO J, ZANG T und BIENIASZ P D. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7(12): 1313–1319. **2001**
- MARTINEZ O und GOUD B. Rab proteins. *Biochim Biophys Acta* 1404(1-2): 101–112. **1998**
- MASHIDORI T, SHIRATAKI H, KAMAI T, NAKAMURA F und YOSHIDA K I. Increased alpha-taxilin protein expression is associated with the metastatic and invasive potential of renal cell cancer. *Biomed Res* 32(2): 103–110. **2011**
- MAYER A. Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 289–314. **2002**
- MILICH D und LIANG T J. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 38(5): 1075–1086. **2003**
- MILLER S L H, MALOTKY E und O'BRYAN J P. Analysis of the role of ubiquitin-interacting motifs in ubiquitin binding and ubiquitylation. *J Biol Chem* 279(32): 33528–33537. **2004**
- MODROW F D T U S H S. *"Molekulare Virologie"*. Springer Spektrum. **2010**
- MORGAN M, PARK W und KEEFFE E B. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B: an update. *Minerva Gastroenterol Dietol* 53(1): 25–41. **2007**

- MORITA E, SANDRIN V, CHUNG H Y, MORHAM S G, GYGI S P, RODESCH C K und SUNDQUIST W I. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* 26(19): 4215–4227. **2007**
- MORITA E und SUNDQUIST W I. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 395–425. **2004**
- NEURATH A R, KENT S B, PARKER K, PRINCE A M, STRICK N, BROTMAN B und SPROUL P. Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine* 4(1): 35–37. **1986**
- NEWBOLD J E, XIN H, TENCZA M, SHERMAN G, DEAN J, BOWDEN S und LOCARNINI S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 69(6): 3350–3357. **1995**
- NISHIZAWA M, KATAOKA K, GOTO N, FUJIWARA K T und KAWAI S. v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(20): 7711–7715. **1989**
- NOGAMI S, SATOH S, NAKANO M, SHIMIZU H, FUKUSHIMA H, MARUYAMA A, TERANO A und SHIRATAKI H. Taxilin; a novel syntaxin-binding protein that is involved in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *Genes Cells* 8(1): 17–28. **2003a**
- NOGAMI S, SATOH S, NAKANO M, TERANO A und SHIRATAKI H. Interaction of taxilin with syntaxin which does not form the SNARE complex. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 797–802. **2003b**
- NOGAMI S, SATOH S, TANAKA-NAKADATE S, YOSHIDA K, NAKANO M, TERANO A und SHIRATAKI H. Identification and characterization of taxilin isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 319(3): 936–943. **2004**
- NOVICK P, MEDKOVA M, DONG G, HUTAGALUNG A, REINISCH K und GROSSHANS B. Interactions between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 5): 683–686. **2006**
- OHTOMO N, TOMIYA T, TANOUE Y, INOUE Y, NISHIKAWA T, IKEDA H, SEYAMA Y, KOKUDO N, SHIBAHARA J, FUKAYAMA M, KOIKE K, SHIRATAKI H und FUJIWARA K. Expression of ?-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol* 37(6): 1417–1423. **2010**
- OSTAPCHUK P, HEARING P und GANEM D. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J* 13(5): 1048–1057. **1994**
- PARAN N, GEIGER B und SHAUL Y. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J* 20(16): 4443–4453. **2001**
- PATIENT R, HOURIOUX C und ROINGEARD P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol* 11(11): 1561–1570. **2009**

- PATIENT R, HOURIOUX C, SIZARET P Y, TRASSARD S, SUREAU C und ROINGEARD P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* 81(8): 3842–3851. **2007**
- PEREIRA-LEAL J B und SEABRA M C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313(4): 889–901. **2001**
- POISSON F, SEVERAC A, HOURIOUX C, GOUDEAU A und ROINGEARD P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* 228(1): 115–120. **1997**
- POLO S, SIGISMUND S, FARETTA M, GUIDI M, CAPUA M R, BOSSI G, CHEN H, DE CAMILLI P und DI FIORE P P. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416(6879): 451–455. **2002**
- PRANGE R und STREECK R E. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J* 14(2): 247–256. **1995**
- RABE B, VLACHOU A, PANTÉ N, HELENIUS A und KANN M. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17): 9849–9854. **2003**
- RADZIWILL G, TUCKER W und SCHALLER H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol* 64(2): 613–620. **1990**
- RATHORE S S, BEND E G, YU H, HAMMARLUND M, JORGENSEN E M und SHEN J. Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(52): 22399–22406. **2010**
- ROSPERT S, DUBAQUIÉ Y und GAUTSCHI M. Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci* 59(10): 1632–1639. **2002**
- ROSSNER M T. Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J Med Virol* 36(2): 101–117. **1992**
- ROST M, DÖRING T und PRANGE R. gamma2-Adaptin, a ubiquitin-interacting adaptor, is a substrate to coupled ubiquitination by the ubiquitin ligase Nedd4 and functions in the endosomal pathway. *J Biol Chem* 283(46): 32119–32130. **2008**
- ROST M, MANN S, LAMBERT C, DÖRING T, THOMÉ N und PRANGE R. Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J Biol Chem* 281(39): 29297–29308. **2006**
- ROTHMAN J E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372(6501): 55–63. **1994**
- SATTLER F und ROBINSON W S. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* 32(1): 226–233. **1979**

- SCHAEFER S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 13(1): 14–21. **2007**
- SCHÄDLER S und HILDT E. HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses* 1(2): 185–209. **2009**
- SCHUSTER R, HILDT E, CHANG S F, TERRADILLOS O, POLLICINO T, LANFORD R, GERLICH W H, WILL H und SCHAEFER S. Conserved transactivating and pro-apoptotic functions of hepadnaviral X protein in ortho- and avihepadnaviruses. *Oncogene* 21(43): 6606–6613. **2002**
- SÜDHOF T C und ROTHMAN J E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323(5913): 474–477. **2009**
- SEEGER C und MASON W S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1): 51–68. **2000**
- SELLS M A, CHEN M L und ACS G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(4): 1005–1009. **1987**
- SHARP P A, SUGDEN B und SAMBROOK J. Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12(16): 3055–3063. **1973**
- SÖLLNER T, WHITEHEART S W, BRUNNER M, ERDJUMENT-BROMAGE H, GEROMANOS S, TEMPST P und ROTHMAN J E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418): 318–324. **1993**
- SÖNNICHSEN B, DE RENZIS S, NIELSEN E, RIETDORF J und ZERIAL M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149(4): 901–914. **2000**
- SPITZER C, SCHELLMANN S, SABOVLJEVIC A, SHAHRIARI M, KESHAVAIAH C, BECHTOLD N, HERZOG M, MÜLLER S, HANISCH F G und HÜLSKAMP M. The Arabidopsis elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development* 133(23): 4679–4689. **2006**
- STANDRING D N, RUTTER W J, VARMUS H E und GANEM D. Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region. *J Virol* 50(2): 563–571. **1984**
- STENMARK H und OLKKONEN V M. The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2(5): REVIEWS3007. **2001**
- STRÖMBERG S, AGNARSDÓTTIR M, MAGNUSSON K, REXHEPAJ E, BOLANDER A, LUNDBERG E, ASPLUND A, RYAN D, RAFFERTY M, GALLAGHER W M, UHLEN M, BERGQVIST M und PONTEN F. Selective expression of Syntaxin-7 protein in benign melanocytes and malignant melanoma. *J Proteome Res* 8(4): 1639–1646. **2009**

- TAGAYA M, WILSON D W, BRUNNER M, ARANGO N und ROTHMAN J E. Domain structure of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein involved in vesicular transport. *J Biol Chem* 268(4): 2662–2666. **1993**
- THIMME R und BLUM H E. [Therapy of hepatitis B]. *Praxis (Bern 1994)* 95(36): 1383–1388. **2006**
- THIMME R, BUKH J, SPANGENBERG H C, WIELAND S, PEMBERTON J, STEIGER C, GOVINDARAJAN S, PURCELL R H und CHISARI F V. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15661–15668. **2002**
- THIMME R, WIELAND S, STEIGER C, GHAYEB J, REIMANN K A, PURCELL R H und CHISARI F V. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 77(1): 68–76. **2003**
- VERPLANK L, BOUAMR F, LAGRASSA T J, AGRESTA B, KIKONYOGO A, LEIS J und CARTER C A. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7724–7729. **2001**
- WATANABE T, SORENSEN E M, NAITO A, SCHOTT M, KIM S und AHLQUIST P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24): 10205–10210. **2007**
- WEBSTER G J und BERTOLETTI A. Control or persistence of hepatitis B virus: the critical role of initial host-virus interactions. *Immunol Cell Biol* 80(1): 101–105. **2002**
- WEBSTER G J, REIGNAT S, MAINI M K, WHALLEY S A, OGG G S, KING A, BROWN D, AMLOT P L, WILLIAMS R, VERGANI D, DUSHEIKO G M und BERTOLETTI A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32(5): 1117–1124. **2000**
- WEIMER R M und RICHMOND J E. Synaptic vesicle docking: a putative role for the Munc18/Sec1 protein family. *Curr Top Dev Biol* 65: 83–113. **2005**
- WILLIAMS R L und URBÉ S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 355–368. **2007**
- WILSON D W, WILCOX C A, FLYNN G C, CHEN E, KUANG W J, HENZEL W J, BLOCK M R, ULLRICH A und ROTHMAN J E. A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* 339(6223): 355–359. **1989**
- YOSHIDA K, NOGAMI S, SATOH S, TANAKA-NAKADATE S, HIRAISHI H, TERANO A und SHIRATAKI H. Interaction of the taxilin family with the nascent polypeptide-associated complex that is involved in the transcriptional and translational processes. *Genes Cells* 10(5): 465–476. **2005**

ZERIAL M und MCBRIDE H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 107–117. **2001**

ZEUZEM S. [Treatment of hepatitis B and C – current standards]. *Dtsch Med Wochenschr* 129 Suppl 2: S57–S59. **2004**

ZHAO C, SLEVIN J T und WHITEHEART S W. Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett* 581(11): 2140–2149. **2007**

ZUR B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Dissertation, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. **2005**

## 9 Abkürzungen

<b>ALT</b>	Alanin-Aminotransferase	<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>APS</b>	Ammoniumperoxidsulfat	<b>ELISA</b>	<i>Enzym-linked immunosorbant assay</i>
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ASHBV</b>	<i>Arctic squirrel Hepatitis B Virus</i>	<b>ERAD</b>	Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase	<b>ESCRT</b>	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat		
<b>ATPase</b>	Adenosintriphosphatase	<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin	<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
		<b>GiHBV</b>	Gibbon Hepatitis B Virus
<b>cccDNA</b>	<i>covalently closed circular DNA</i>	<b>GoHBV</b>	Gorilla Hepatitis B Virus
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA	<b>GRE</b>	<i>Glucocorticoid response element</i>
<b>CHBV</b>	<i>Crane Hepatitis B Virus</i>	<b>GSHBV</b>	<i>Ground squirrel Hepatitis B Virus</i>
<b>ChHBV</b>	<i>Chimpanzee Hepatitis B Virus</i>	<b>GTHBV</b>	<i>Grey Teal Hepatitis B Virus</i>
<b>CLSM</b>	konfokale Laser-Scan-Mikroskopie	<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid		
<b>Co-IP</b>	Coimmunpräzipitation	<b>HBcAg</b>	Hepatitis B Core Antigen
<b>CTL</b>	zytotoxische T-Lymphozyten	<b>HBsAg</b>	Hepatitis B <i>early</i> Antigen
<b>Cy3/ Cy5</b>	Cyanin 3/ Cyanin 5	<b>HBsAg</b>	Hepatitis B <i>surface</i> Antigen
		<b>HBV</b>	Hepatitis-B-Virus
<b>DAPI</b>	4,6-Diamidin-2-Phenylindol	<b>HBx</b>	regulatorisches X-Protein
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser	<b>HCC</b>	hepatozelluläres Karzinom
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat	<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>DHBV</b>	<i>Duck Hepatitis B Virus</i>	<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	<b>HHBV</b>	<i>Heron Hepatitis B Virus</i>
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>HIV</b>	humanes Immundefizienzvirus
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease	<b>HRP</b>	<i>horseraddish Peroxidase</i>

<b>IF</b>	Immunfluoreszenz	<b>HXK-I</b>	Hexokinase-I
<b>kb</b>	Kilobase	<b>R</b>	Arginin
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>rcDNA</b>	relaxed circular DNA
<b>LB-Medium</b>	<i>lysogeny broth Medium</i>	<b>RGHBV</b>	Ross Goose Hepatitis B Virus
<b>LHBsAg</b>	<i>Large Hepatitis B surface Antigen</i>	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>MDHBV</b>	<i>Maned Duck Hepatitis B Virus</i>	<b>RT</b>	reverse Transkriptase
<b>MHBsAg</b>	<i>middle Hepatitis B surface Antigen</i>	<b>RT-PCR</b>	real-time-PCR
<b>MHC</b>	<i>major histocompatibility complex</i>	<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>MOI</b>	<i>multiplicity of infection</i>	<b>SGHBV</b>	<i>Snow Goose Hepatitis B Virus</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>	<b>SHBsAg</b>	<i>small Hepatitis B surface Antigen</i>
<b>MVB</b>	<i>multivesicular bodies</i>	<b>shRNA</b>	<i>short hairpin RNA</i>
<b>NAC</b>	<i>nascent polypeptide-associated complexes</i>	<b>SNAP</b>	<i>soluble NSF attachment protein</i>
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA</b>	Nickel-Nitrilotriessigsäure	<b>SNARE</b>	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
<b>NK-Zellen</b>	natürliche Killerzellen	<b>STHBV</b>	<i>Stork Hepatitis B Virus</i>
<b>NSF</b>	<i>N-Ethylmaleinimid-sensitive factor</i>	<b>SVP</b>	subvirale Partikel
<b>OD</b>	optische Dichte	<b>TBST</b>	<i>Tris-buffered Saline + Tween 20</i>
<b>OHBV</b>	Orangutan Hepatitis B Virus	<b>TGN</b>	trans-Golgi-Netzwerk
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i>	<b>tsg101</b>	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered Saline</i>	<b>t-SNARE</b>	<i>target-SNARE</i>
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion	<b>Txlna</b>	$\alpha$ -Taxilin
<b>PEG-IFN</b>	peyliertes Interferon	<b>v-SNARE</b>	<i>vesicle-SNARE</i>
<b>PEI</b>	Polyethylenimin	<b>WB</b>	Western-Blot
<b>pgRNA</b>	prägenomische RNA	<b>WHBV</b>	<i>Woodchuck Hepatitis B Virus</i>
<b>PHH</b>	primäre humane Hepatozyten	<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i>
<b>PXXP-Motiv</b>	Motiv, welches von zwei Prolinen flankiert wird	<b>WMHBV</b>	<i>Wooly Monkey Hepatitis B Virus</i>
<b>Q</b>	Glutamin	<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
<b>qPCR</b>	quantitative PCR		



# 10 Publikationsverzeichnis

## Publikation

Hoffmann J, Böhm C, Weiss T, Ploen D, Himmelsbach K, Hildt, E. Identification of  $\alpha$ -Taxilin as an essential factor for the life cycle of Hepatitis B virus, eingereicht bei *Journal of Hepatology*, 2012.

## Poster

10. Workshop „Pathogenitätsmechanismen und Immunkontrolle viraler Erreger“ des GfV-Arbeitskreises „Immunbiologie von Virusinfektionen“, Deidesheim, 2011.

Guhl J, Weisser I, Heilmann M, Böhm C, Röttger H, Ploen D, Himmelsbach K, Hildt E. HCV- and HBV-infection affects the expression of  $\alpha$ -Taxilin.

*International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*, Oxford, 2012.

Guhl J, Böhm C, Röttger H, Himmelsbach K, Hildt E.  $\alpha$ -Taxilin acts as an adapter between LHBs and the ESCRT machinery and is thereby a crucial factor for the release of hepatitis B virus.

*22nd Annual Meeting of the Society for Virology*, Essen, 2012.

Guhl J, Böhm C, Röttger H, HimmelsbachK, Hildt E.  $\alpha$ -Taxilin is a crucial factor for the morphogenesis of hepatitis B virus (HBV).

# 11 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Eberhard Hildt für die exzellente Betreuung dieser Arbeit. Seine fachliche Kompetenz, sein unerschütterlicher Optimismus und sein intensives Engagement, bei gleichzeitig gewährter Eigenverantwortung, half mir dabei, die Arbeit fokussiert und zielgerichtet zu vollenden.

Herrn Prof. Ralf Einspanier danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Klaus Boller für die professionelle Einführung und seine Hilfsbereitschaft am LSM.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Plesker und vor allem Frau Wingerter für die Anfertigung der Paraffinpräparate sowie deren Färbungen.

Dr. Kiyoshi Himmelsbach danke ich für die Einarbeitung im Labor und die fachliche und methodische Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Nadja Kettern, Dagmar Fecht-Schwarz und Jasmin Hoffmann für das kritische und zeitaufwendige Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen wertvollen Tipps.

Daniela Ploen (also known as "DDD") danke ich für ihre unerschöpfliche Geduld und Unterstützung am LSM sowie jegliche weitere Hilfestellungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe: Jasmin, Nadja, Danni, Stef, Kiyoshi, Thekla, Andrea, Hendrik, Lilli, Sanita, Christian, Sami, Gert, Daniel und Nina. Danke für

Eure außerordentliche Hilfsbereitschaft und die super Arbeitsatmosphäre sowie die vielen lustigen Abende mit Euch! Ich werde Euch vermissen!

Weiterhin danke ich all meinen Freunden, insbesondere meinen Mädels Katrin, Birte, Tinnen, Anna, Telse, Cathi und Conny für die grandiose Zeit in Budapest und Hannover. Ihr seid und bleibt die Besten!

Großer Dank an Janina Bischoff. Du weißt wofür ...

Ein ganz spezieller Dank geht an meine Eltern für ihre fortwährende, unersetzliche und liebevolle Unterstützung. Ohne ihre Hilfe wäre das Studium und diese Arbeit gar nicht erst möglich gewesen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Tobi für seine grenzenlose Unterstützung, Liebe und Motivation.

**Danke.**

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Frankfurt, den 05. Oktober 2012

Caroline Böhm