Analyse der Dephosphorylierung des Entenhepatitis B-Virus Nukleokapsidproteins:

Einfluss auf Replikation und Infektiosität

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

> vorgelegt von Claudia Franke Hamburg, 2006

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. WILL Weiterer Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. H.-P: MÜHLBACH Tag der Disputation: 30. Juni 2006

Hamburg, den 16. Juni 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Die Leber	
2.1.1	Hepatozyten	∠
2.1.2	Sinusoidale Endothelzellen	
2.1.3	Weitere in der Leber beherbergte Zellen	
2.2	Hepatitis B	5
2.2.1	Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom	
2.3	Hepadnaviridae	
2.3.1	DHBV als Modellsystem für Hepatitis B.	
2.3.2	Struktur von DHBV-Partikeln und -Genom.	
2.3.3	Lebenszyklus und Replikation	
2.3.4	Struktur und Funktion des DHBV-Kapsidproteins	
2.3.5	Phosphorylierung und Dephosphorylierung des DHBV-Kapsidproteins	
2.3.6	Die viralen Hüllproteine L und S	
2.4	Phosphorylierung und Dephosphorylierung	22
2.4.1	Serin-/Threonin-Phosphatasen der PPP-Familie	23
2.4.1.1	Calcineurin	
2.4.1.2	Proteinphosphatase 2A	
3 3.1	MATERIALIEN UND METHODEN Materialien	
3.1.1	Tiere und primäre Zellen	
3.1.2	Eukaryotische Zelllinien	
3.1.3	Plasmide	
3.1.4	Oligonukleotide	
3.1.5	Peptide	
3.1.6	Enzyme	39
3.1.7	Antikörper	
3.1.8	Kits und fertige Lösungen.	
3.1.9	Chemikalien	
3.1.10	Kulturmedien und Zellkulturchemikalien	36
3.1.11	Verbrauchsmaterial	
3.1.12	Geräte	
3.1.13	Computerprogramme	
3.2	Methoden	39
3.2.1	Bakterien und Plasmide	
3.2.1.1	Glycerin-Kulturen	
3.2.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	
3.2.1.3	Transformation	
3.2.1.4	DNA-Plasmidpräparation (Miniformat)	
3.2.1.5		40
3.2.2	DNA-Plasmidpräparation (Maxiformat)	41
	Zellkulturtechniken	41 42
3.2.2.1 3.2.2.2		41 42

3.2.2.3	Die Präparation und Kultur primärer Leberzellkulturen der fötalen Ente	
3.2.2.4	Ernte von Zellen	
3.2.2.5	Transfektion	
3.2.2.6	Radioaktive Markierung von Zellen	
3.2.3	Ultrazentrifugation	
3.2.4	RNA-Techniken	
3.2.4.1 3.2.4.2	RNA-Extraktion aus Zellen	
3.2.4.2	DNA-Techniken	
3.2.5.1	Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA	
3.2.5.1	Restriktionsendonukleaseverdau von DNA	
3.2.5.3	Agarosegel-Elektrophorese	
3.2.5.4	Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Restriktionsverdau	
3.2.5.5	Ligation	
3.2.5.6	Isolierung von viraler DNA aus dem Zytoplasma	
3.2.5.7	Isolierung viraler DNA von Virionen aus Zellüberständen	
3.2.5.8	Polymerase-Kettenreaktion	
3.2.5.9	DNA-Dot-Blot	53
3.2.5.10	Southern Blot	
3.2.5.11	Hybridisierung von DNA-Dot-Blots und Southern Blots	
3.2.5.12	Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	
3.2.6	Proteintechniken	
3.2.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	
3.2.6.2	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	
3.2.6.3	Immunblot	
3.2.6.4 3.2.6.5	2D-Elektrophorese	
3.2.6.6	Serumtest auf DHBV-Infektion von Entenföten Immunzytochemie	
3.2.6.7	Immunhistochemie	
3.2.6.8	KLH-Kopplung von Phosphopeptiden	
3.2.6.9	Herstellung von phosphospezifischen Antikörpern	
3.2.6.10	Phosphatase-Behandlung	
3.2.6.11	Immunpräzipitation	
3.2.6.12	ELISA	
3.2.7	Hämatoxilin-Eosin-Färbung von Lebergefrierschnitten	68
3.2.8	Fluoreszenzmikroskopie	68
4	ERGEBNISSE	70
4.1	Einfluss der Phosphorylierung von DHBc auf Replikation und Infektiosität von Virionen .	
4.1.1	Einflussnahme auf die Calcineurinaktivität mit Cyclosporin A	
4.1.1.1	Einfluss von CsA auf die Virusproduktion	
4.1.1.2	Reproduzierbarkeit der Vorexperimente	
4.1.2	Dephosphorylierung von DHBc durch Calcineurin und PP2A	
4.1.2.1	Analyse der Phosphorylierungsmotive in DHBc, HBc und DHBL	
4.1.2.2 4.1.2.3	In vitro-Expression von Calcineurin zur Dephosphorylierung von DHBc	
4.1.2.3	Die endogene Expression von Calcineurin und PP2A	
4.1.2.5	Die Expression von Calcineurin und PP2A in der Entenleber	
4.1.3	Der Einfluss von Calcineurin- und PP2A-Inhibitoren auf die DHBc-Phosphorylierung in LMH-	
	und HuH7-Zellen	
4.1.3.1	Einfluss von CsA als Inhibitor und PMA/Ionomycin als Stimulatoren von Calcineurin	
4.1.3.2	Inhibition von PP2A mittels Okadainsäure	
4.1.3.3	Beteiligung von Proteasomen am Abbau von hyperphosphoryliertem Kapsidprotein	
4.1.4	Konsequenzen der Hypophosphorylierung durch Calcineurin für virale Replikation und	
	Infektiosität von DHBV	
4.1.4.1	Die Replikation von DHBV in HuH7-Zellen	
4.1.4.2	Bildung von SVPs und Virionen	
4.1.4.3	Infektiosität der Virionen	
4.1.4.4	Abhängigkeit der Infektionseffizienz von Variationen der Transfektionseffizienz	108

4.1.5	Konsequenz der Hypophosphorylierung durch PP2A für virale Replikation und Infektiosität von DHBV	110
4.2	Experimentelle Ansätze zur Bestimmung der intrazellulären Restphosphorylierung von DHBc nach der Koexpression von konstitutiv aktivem Calcineurin und PP2A	114
4.2.1	2D-Gelelektrophorese	
4.2.2	Radioaktive Markierung von DHBc	
4.2.3	Phosphospezifische Antikörper	
4.2.3.1	Herstellung phosphospezifischer Antikörper gegen DHBc	
4.2.3.2	Nachweis der Phosphospezifität ausgewählter Peptidantiseren	
4.2.3.3	Reaktivität der phosphospezifischen DHBc-Antiseren in der Immunhistochemie	
5	DISKUSSION	147
5.1	Das DHBV-Kapsidprotein ist ein potentielles Substrat für die zellulären Phosphatasen Calcineurin und PP2A	148
5.1.1	Fehlende Reproduzierbarkeit des Einflusses von Calcineurin auf DHBc-Phosphorylierung und DHBV-Infektiosität	
5.1.2	Nachweis von Calcineurin und PP2A in Leberzellen der Ente und Hepatomzelllinien	149
5.1.3	Hypophosphorylierung von DHBc durch Überexpression von konstitutiv aktivem Calcineurin A oder der katalytischen Untereinheit von PP2A in Zelllinien	151
5.2	Die virale Replikation unter den Bedingungen eines hypophosphorylierten Kapsidproteins	
5.2.1	Die Dephosphorylierung durch CNmut	
5.2.2 5.3	Die Dephosphorylierung durch PP2A	158
5.5	Dissektion der an der Dephosphorylierung durch Calcineurin und PP2A betroffenen Aminosäuren	150
5.3.1	Phosphospezifische Antikörper	
5.3.2	Widersprüche zu bereits veröffentlichten Daten	
5.4	Offene Fragen und Ausblick	165
6	LITERATURVERZEICHNIS	168
7	ANHANG	179
7.1	Plasmide	
7.1.1	DHBV-Expressionsplasmide	
7.1.2	Plasmide für die Expression der Phosphatasen	
7.1.3	Plasmid für die Herstellung der DHBV-Sonde	183
7.2	Sequenz-Vergleich hepadnaviraler Kapsidproteine	184
7.3	Abkürzungsverzeichnis	185

1 Zusammenfassung

Das Nukleokapsidprotein der Hepatitis B-Viren hat für ein Strukturprotein unerwartet viele Aufgaben: zusätzlich zur Ausbildung der Kapsidstruktur ist es beteiligt an der Formation von Ribonukleinsäure-Protein-Komplexen mit dem Prägenom und ist von zentraler Bedeutung für die reverse Transkription des viralen RNA-Prägenoms in DNA. Es vermittelt Signale, die entweder zur Membranbindung und Umhüllung oder nukleärem Transport führen und es ist, wenn es den Zellkern erreicht zur Dissemblierung fähig, die die Freisetzung des viralen DNA-Genoms ermöglicht. Ein denkbarer Regulationsmechanismus dieser Funktionsvielfalt ist die reversible Phosphorylierung.

Das Nukleokapsidprotein (DHBc) des Entenhepatitis B-Virus (DHBV) unterliegt einer reversiblen Phosphorylierung an mindestens 6 Serin/Threoninseitenketten durch Enzyme der Wirtszelle. Vor Beginn und während der Entstehung dieser Arbeit publizierte Funktionsanalysen, insbesondere mit Kapsidprotein-Phosphorylierungsmimikrymutanten, deuteten darauf hin, dass der Phosphorylierungsstatus wichtige Funktionen für die Koordinierung der (D)HBV-Replikation hat. Der die Reifung der DHBV-Virionen begleitende Übergang von hyperphosphoryliertem zu hypophosphoryliertem Kapsidprotein impliziert eine wichtige Rolle für Phosphatasen im Lebenszyklus des DHBV.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese Hinweise in Zelllinien und primären Entenleberzellkulturen (PDLCs) in einem unabhängigen experimentellen Ansatz überprüft und ergänzt werden. Hierzu sollte insbesondere nach zellulären Phosphatasen gesucht werden, die an der Dephosphorylierung von DHBc beteiligt sein könnten und in Hepatozyten oder Hepatomzelllinien exprimiert werden. Phosphataseaktivitäten sollten durch spezifische Inhibitoren oder durch Überexpression von konstitutiv aktiven oder dominant negativen Enzymen moduliert werden und anschließend die Konsequenzen für den intrazellulären Phosphorylierungsstatus von DHBc sowie für die virale Replikation analysiert werden. Aufgrund von zu Beginn der Arbeit vorliegenden Daten wurden vor allem die Funktionen von Calcineurin (CN) und, basierend auf eigenen Sequenzmotivanalysen, zusätzlich die von Proteinphosphatase 2A (PP2A) als potentiellen DHBc-Phosphatasen analysiert. Teils durch RT-PCR-Synthese, Immunblot und/oder Immunfluoreszenzfärbungen wurde in allen verwendeten Zelllinien eine endogene Expression von sowohl CN als auch PP2A nachgewiesen. In infizierten Entenlebern und Zellkulturen primärer Entenleberzellen (engl.: primary duck liver cells, PDLCs) wurde eine hohe Expression von CNA und PP2A vor allem in den Endothelzellen der Lebersinusoide (engl.: liver sinusoidal endothelial cells, LSECs) gefunden; CNB dagegen war hauptsächlich in Hepatozyten zu finden.

Die Überexpression beider Phosphatasen in Zelllinien führte zu einer DHBc-Hypophosphorylierung. Koexpression von konstitutiv aktivem CNA (CNmut) zusammen mit replikationskompetenten Genomen von DHBV in der humanen Hepatomzelllinie HuH7 führte zu einer hoch-effizienten DHBc-Dephosphorylierung, hatte jedoch keinen Effekt auf die virale Proteinexpression, DNA-Synthese, Formation und Sekretion von viralen Partikeln sowie die Infektiosität der Virionen in PDLCs.

Die Überexpression von PP2A führte ebenfalls zu einer DHBc-Dephosphorylierung. Verglichen mit Calcineurin war der Effekt geringer, jedoch assoziiert mit einer 3-fachen Reduktion von intrazellulärer viraler DNA, von sekretierten viralen Partikeln und einer entsprechend verminderten Zahl von infizierten Hepatozyten in PDLCs. Die Überexpression einer dominant-negativen Form der PP2A (PP2Adn) führte zu einer geringfügig gesteigerten DHBc-Phosphorylierung. Damit verbunden war ein 3-facher Anstieg der Menge an sekretierten Virionen. Die Menge an intrazellulärer Virus-DNA und die Anzahl infizierter Hepatozyten blieben dabei unverändert.

Die Ergebnisse der Dephosphorylierungsstudien mit CNmut und PP2A wiesen darauf hin, dass diese Enzyme unterschiedliche Phosphorylierungsstellen betreffen. Um dies zu belegen, wurden die Effekte der jeweiligen Phosphatasen auf individuelle Phosphorylierungsstellen des DHBc analysiert. Hierfür wurden Antikörper gegen entsprechende Phosphopeptide produziert. Für jede Phosphorylierungsstelle wurde mindestens ein Antiserum erhalten, welches das phosphorylierte DHBc-Sequenzmotiv mit sehr hoher Präferenz gegenüber dem Nicht-Phosphopeptid erkennt, gezeigt durch Verwendung von Phosphatase-behandelten Immunblots und in ELISAs. Die Ergebnisse mit diesen Antiseren verdeutlichten, dass die durch CNmut vermittelte starke DHBc-Dephosphorylierung zwar alle bekannten Phosphorylierungsstellen betrifft, die Positionen S232, S245, S257 und S259 jedoch bevorzugt. Eine trotz hoher CNmut-Expression vorhandene, geringe restliche DHBc-Phosphorylierung schien fast ausschließlich auf DHBc mit jeweils einer einzigen phosphorylierten Position zu beruhen. Die Analyse der PP2A-induzierten DHBc-Hypophosphorylierung mit den Peptidantiseren spricht für eine präferentielle Dephosphorylierung an den Positionen S232, S257 und S259, eine etwas geringere Dephosphorylierung an der Position S245 und weitgehende Resistenz der Phosphate an den Positionen T239 und S230. Besonders auffällig bei der PP2A-Koexpression war der Verlust an Einfachphosphorylierung an DHBc-T239. Phosphoryliertes T239 trat hier nur noch zusammen mit anderen Phosphorylierungen am selben Kapsidprotein zusammen auf, anscheinend hauptsächlich an der Position S245.

Zusammenfassend sprechen die erhaltenen Ergebnisse dafür, dass die Serin/Threonin-Phosphorylierung des Nukleokapsids für eine effiziente und infektionskompetente Viruspartikelproduktion von DHBV weitgehend, wenn nicht sogar vollkommen entbehrlich ist. Die offensichtlichen Widersprüche zu den Schlussfolgerungen aus Experimenten mit Virusmutanten sind möglicherweise auf strukturelle und/oder funktionelle Effekte der artifiziell eingeführten DHBc-Aminosäureaustausche in früheren Publikationen zurückzuführen. Sie könnten unabhängig zu dem exklusiv beabsichtigten Mimikry der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Serine und Threonine mit der veränderten molekularen Zusammensetzung, Geometrie und Ladung der Aminosäurenseitenketten bei Alanin und Glutamat assoziiert sein.

2 Einleitung

2.1 Die Leber

Die Leber stellt mit 2-5% des Körpergewichts das größte innere Organ der Vertebraten dar. Sie hat herausragende metabolische und sekretorische Funktionen, die die Aufnahme, Speicherung, metabolische Umwandlung und Verteilung von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Fetten und Vitaminen umfassen. Ebenso wichtig ist ihre Funktion bei der Entgiftung und Galleproduktion, sowie als immunologisches Bollwerk gegenüber Fremdstoffen wie Viren und Bakterien. Zur Erfüllung ihrer vielfältigen Aufgaben verfügt die Leber über eine duale Blutzufuhr. Sie erhält gleichzeitig nährstoffreiches, venöses Blut über die Vena portae (Pfortader) und sauerstoffreiches Blut über die Arteria hepatica (Leberarterie). Im Kapillarsystem der Sinusoide mischen sich venöses und arterielles Blut.

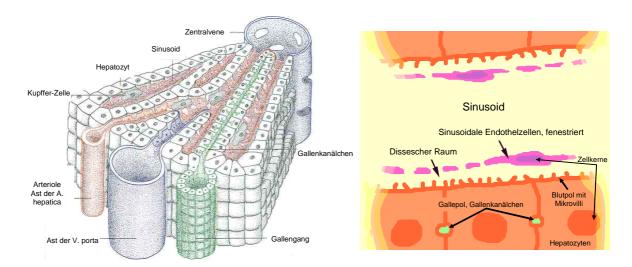


Abbildung 1: Aufbau der Leber

Reihen von Hepatozyten säumen die Sinusoide, in denen venöses und arterielles Blut gemischt zur Zentralvene fließt. Gallenkanälchen leiten die Galle entgegengesetzt zum Blutstrom in die Gallengänge ab. Zwischen Sinusoiden und Parenchym (Hepatozyten) liegt der Dissesche Raum (rechts), an den die Hepatozyten mit ihrer basolateralen Seite (Blutpol) grenzen. Die apikale Seite (Gallepol) befindet sich an der Grenzfläche zweier Hepatozyten.

Die typische Architektur der Leber (Abbildung 1) entsteht während der Embryogenese, wenn Lebervorläuferzellen in einem Netzwerk von endotheliumgesäumten Zwischenräumen (Sinusoiden) wachsen. Diese Lebervorläuferzellen haben das Potential, sich in Hepatozyten (Parenchymzellen) oder intrahepatische Gallengangszellen zu differenzieren. So entsteht ein schwammartiges Netz von ein oder zwei Zellen hohen Gewebsschichten aus Hepatozyten, die die Sinusoide umkleiden, welches durchzogen ist von Gallengängen. Die Anordnung der Äste der Pfortader, der Leberarterie und des

Gallenganges in den sogenannten Portalfeldern und der sie umgebenden abführenden Lebervenen bestimmt auch den mikroskopischen Aufbau der Leber, der annähernd hexagonale Leberläppchen (Lobuli hepatici) erkennen lässt.

Der Dissesche Raum als perisinusoidaler Spalt zwischen Sinusoid und Parenchym ist 0,2 bis 1 µm weit. Er enthält eine Reihe von Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronektin und Lamidin, die ein dynamisches Netzwerk zur Übermittlung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Signalen zwischen den angrenzenden Zellen bilden. Seine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung des spezifischen Phänotyps und der Funktion von Hepatozyten und den Zellen der Sinusoide wird deutlich anhand des pathologischen Zustandes der Leberzirrhose (siehe Abschnitt 2.2.1).

2.1.1 Hepatozyten

Hepatozyten sind bipolare Zellen. Sie machen beim adulten Menschen 70% der Gesamtleberzellen aus. Bedingt durch den Aufbau der Leber grenzen sie mit ihrer basolateralen Seite an den Disseschen Raum, wo metabolische Aufnahme- und Abgabeprozesse stattfinden. Dieser sogenannte Blutpol ist mit vielen Mikrovilli besetzt, die die Austauschfläche mit dem Blutstrom um ein Vielfaches vergrößern, und besitzt keine Basallamina. Hier findet auch die rezeptorvermittelte Endozytose dar. Bei einem zwei Zellen hohen Parenchym befindet sich dem Blutpol gegenüber der schmale apikale Gallepol. Dieser liegt bei einem nur eine Zelle hohen Parenchym an der Grenzfläche zweier Hepatozyten. Der Gallepol trägt ebenfalls zahlreiche Mikrovilli. Dort findet die exokrine Sekretion von Galle in die Gallenkanälchen statt. Zwischen den beiden Polen der Hepatozyte befindet sich die Hepatozytenkontaktfläche, die gekennzeichnet ist durch tight junctions, intermediate junctions, gap junctions und Desmosomen. Insbesondere die tight junctions spielen eine wichtige Rolle als canaliculosinusoidale Barriere.

2.1.2 Sinusoidale Endothelzellen

Lebersinusoidale Endothelzellen (LSECs) stellen die Mehrheit der die Sinusoide auskleidenden Zellen. Eine Besonderheit dieser Zellen ist ihre Fenestrierung. Die Fenestrae von bis zu 0,5 µm im Durchmesser sind zu Siebplatten gruppiert. Dadurch stehen die basolateralen Pole der Hepatozyten in direktem Austausch mit dem Plasma. Tatsächlich können einige Hepatozyten mit filopodienartigen Ausläufern an den LSECs vorbei auch direkt Kontakt zum Lumen des Sinusoids aufnehmen.

Die vielen Funktionen der LSECs umfassen aktiven Transport, Regulation des Blutdrucks, Angiogenese, Fettstoffwechsel, Synthese von Stromakomponenten und Immunantworten.

Letzteres beruht vor allem auf ihrer Fähigkeit lösliche exogene Antigene auf MHC-Klasse I Rezeptoren zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Die Antigenpräsentation durch LSECs hat jedoch nicht Immunität, sondern Toleranz zur Folge. Es wird spekuliert, dass damit unerwünschte Autoimmunreaktionen oder Immunreaktionen gegen zirkulierende Nährstoffe vermieden werden können (Limmer et al., 2000).

2.1.3 Weitere in der Leber beherbergte Zellen

Neben Parenchymzellen, Gallengangszellen und LSECs beherbergt die Leber noch ortsständige Makrophagen, sogenannte Kupffersche Sternzellen, die 15% der Leberzellpopulationen ausmachen, Fettspeicherzellen (Itozellen) im Disseschen Raum oder zwischen den Hepatozyten sowie Nervenzellen, deren Dendriten jede einzelne Hepatozyte kontaktieren und die ganze Bandbreite der Blut- und Lymphzellen.

Kupffersche Sternzellen phagozytieren jegliche Abfallprodukte oder Fremdstoffe. Haben sie ausreichend Stoffe aufgenommen, können sie sich aus dem Sinusoid lösen und mit dem Blutstrom abtransportiert werden. Durch Antigene aktiviert, sekretieren sie Immunmodulatoren wie Zytokine, die wiederum LSECs, andere Immunzellen und auch Parenchymzellen beeinflussen.

Itozellen dienen der Vitamin A-Speicherung und spielen eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Kollagen und Matrix-Komponenten sowie der Sekretion von Enzymen zu deren Degradation. Unter der Wirkung von Zytokinen und beschädigten Hepatozyten kommt es zur Vermehrung und Aktivierung der Itozellen, die dann einen wichtigen Beitrag zur Entstehung von Leberzirrhose leisten.

2.2 Hepatitis B

Die Hepatitis B ist eine weit verbreitete Virusinfektion der Leber. Weltweit sind ca. 350 bis 500 Mio. Menschen chronisch mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) infiziert. In der BRD macht die Hepatitis B ca. 45% aller Hepatitiden aus. Pro Jahr werden 25 000 bis 50 000 Neuinfektionen registriert, dabei werden nur 20-40% aller Fälle erfasst. Die globale Durchseuchung der Normalbevölkerung liegt bei circa 5% (Abbildung 2). In manchen tropischen, subtropischen und arktischen Regionen infizieren sich 70-90% der Menschen mit HBV, bevor sie das 40. Lebensjahr erreicht haben und 8-20% von ihnen entwickeln eine chronische Erkrankung.

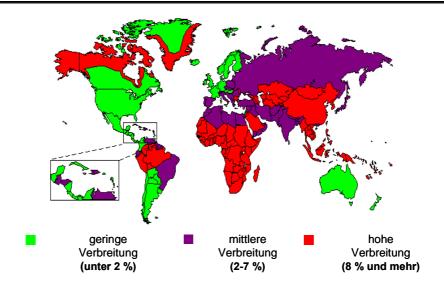


Abbildung 2: Risikogebiete für die Infektion mit HBV

Hepatitis B kommt weltweit vor. Gehäuft tritt sie in Zentral- und Südafrika, Südostasien, bestimmten Gegenden Südamerikas, Nordamerikas und in der Südsee auf. In diesen Gebieten sind bis zu zehn Prozent der Bevölkerung mit dem Virus infiziert. In einzelnen Gegenden liegt der Prozentsatz noch weit darüber. Hier wird das Virus häufig bereits während der Geburt übertragen. Nach Angaben von www.cdc.gov.

Die Infektion mit HBV führt zu Funktionseinschränkungen der Leber. Der Gallenfarbstoff kann dann nicht mehr normal ausgeschieden werden und wird bei einem Teil der Patienten als Gelbfärbung der Haut und Augen sichtbar ("Gelbsucht"). Daneben treten Allgemeinsymptome wie Kreislaufprobleme, Übelkeit, Durchfall oder allgemeine Schwäche auf. In bis zu 1% der Fälle einer Hepatitis B-Infektion verstirbt der Erkrankte in der akuten Phase. In 5-10% aller Fälle kommt es zur Chronifizierung (bei Säuglingen und Kleinkindern bis zu 90%). Von diesen Patienten entwickeln 30% bis 50% nach einem Zeitraum von 20 bis 30 Jahren eine Leberzirrhose oder seltener (2-5%) daraus einen bösartigen Leberkrebs (hepatozelluläres Karzinom, HCC). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist Hepatitis B für fast 30% aller Leberkarzinome in Europa verantwortlich. Weltweit zählt diese Infektionskrankheit mittlerweile zu den fünf häufigsten Todesursachen.

Nach derzeitigem Stand ist die chronische Hepatitis B nicht heilbar und auf gängige Therapien mit hohen Dosen an Interferon-α oder Nukleosidanaloga sprechen nicht alle Patienten an. Unter dem Selektionsdruck der Medikamente entstehen zunehmend resistente Viren (Pumpens et al., 2002). Aus dieser Situation wird ersichtlich, dass der weiteren Erforschung der Hepatitis B-Viren und der Virus-Zell-Wechselwirkungen für die Medikamenten- und Therapieentwicklung hochrangige Bedeutung zukommt.

2.2.1 Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom

Leberzirrhose

Die Leberzirrhose wird nach den Kriterien der WHO durch morphologische Kriterien definiert. Sie kann entstehen, wenn Lebererkrankungen über Jahre hinweg nicht ausheilen. Durch kontinuierliches, über größere Zeiträume erfolgendes Absterben von einzelnen Hepatozyten oder -gruppen kommt es einerseits zur Fibrotisierung (Entstehung von Bindegewebe) und andererseits zur Regeneration von Hepatozyten und Gallengangsepithelien. Diese ungeordnet ablaufenden Vorgänge führen zu einer Änderung die Gefäßversorgung der Leberläppchen, der Leberarchitektur, so dass Mikrozirkulation und Abfluss der produzierten Galle gestört sind. Die Leber vernarbt, wird härter und im Endstadium meist kleiner (Schrumpfleber). Eine Zirrhose kann sich nicht zurückbilden. Unbehandelt führt sie durch den Zusammenbruch Leberfunktionen (Leberkoma) zum Tod. Pro Jahr sterben in Deutschland ca. 20.000 Menschen an gemeldeten chronischen Lebererkrankungen. Die Dunkelziffer wird wesentlich höher eingeschätzt. Bei bis zu 9,5% aller Patienten, die nach dem Tode vom Pathologen obduziert werden, lässt sich eine Leberzirrhose feststellen (www.hepatitisnrw.de).

Eine Leberzirrhose entsteht am häufigsten infolge von übermäßigem Alkoholkonsum oder durch andere leberschädigende Giftstoffe und ist mit chronischen Hepatiden vom Typ B und C oder weiteren selteneren Krankheiten von Leber und Galle assoziiert. Circa 80% aller Fälle von heptozellulärem Karzinom geht eine Leberzirrhose voraus.

Hepatozelluläres Karzinom

Persistierende Infektionen führen zu chronischer Entzündung. Schon 1863 wurde von Virchow vermutet, dass der Ursprungsort von Krebsgeschwüren an Stellen chronischer Entzündung zu finden sei. Tatsächlich können bis zu 15% der bösartigen Tumorerkrankungen weltweit auf Infektionen zurückgeführt werden (Guidotti et al., 1999). Das Gleichgewicht von Zytokinen und Chemokinen an einem Entzündungsherd ist dabei entscheidend für die Entwicklung eines chronischen Verlaufs. Entzündungen gehen immer damit einher, dass aktivierte Immunzellen Wachstumsfaktoren sezernieren, die Angiogenese, Lymphangiogenese und den Umbau extrazellulärer Matrix (ECM) fördern (Coussens and Werb, 2002). Leukozyten und andere phagozytische Zellen induzieren DNA-Schäden in proliferierenden Zellen, indem sie reaktive Sauerstoffverbindungen und Nitrogene produzieren, die sie sezernieren, um die Infektion zu bekämpfen. Diese reagieren zu Peroxynitrit, einer mutagenen Substanz (Maeda and Akaike, 1998). Die Folge

können Punktmutationen, Deletionen oder genomische Umordnungen sein. Zusätzlich führt der von Makrophagen und T-Lymphozyten exprimierte migrationsinhibierende Faktor (MIF) zur Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von p53, was zu erhöhter Proliferation und verlängerter Lebensdauer von Zellen führen kann (Hudson et al., 1999). Somit sind Immunzellen Promotoren für frühe neoplastische Prozesse. Die molekularen Mechanismen des mit Hepatitis B oder C verbundenen Risikos an HCC zu erkranken, sind nach wie vor weitgehend unbekannt. Ein Hepatitis-Mausmodell zeigte jedoch, dass NF- κ B-Aktivierung in Hepatozyten durch Hochregulation des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF α) in angrenzenden Endothel- und Immunzellen das Tumorwachstum fördert, indem es die Apoptose transformierter Hepatozyten verhindert (Pikarsky et al., 2004).

2.3 Hepadnaviridae

Die Gruppe der Hepatitis B-Viren, die auch als Hepadnaviren bezeichnet wird, zählt zu den Pararetroviren. Das sind kleine, umhüllte DNA-Viren, deren Verwandtschaft zu den Retroviren darin begründet liegt, dass das virale DNA-Genom durch reverse Transkription eines RNA-Intermediats generiert wird (Summers and Mason, 1982).

Das humane Hepatitis B-Virus (HBV) gilt als Prototyp der Familie der Hepadnaviren. Sie werden unterteilt in Ortho-(Säugetier-) und Avi-(Vogel-)hepadnaviren. Neben HBV finden sich Vertreter der Orthohepadnaviren unter anderem beim Murmeltier (engl.: woodchuck, WHV) und Erdhörnchen (engl.: ground squirrel, GSHV). Gut charakterisierte Avihepadnaviren sind das DHBV (engl.: duck, Ente), HHBV (engl.: heron, Graureiher), RgHBV (engl.: Ross's Goose, Zwergschneegans) und das StHBV (engl.: stork, Storch).

Allen Hepadnaviren gemeinsam ist die virale Hülle, ein in ein Nukleokapsid verpacktes 3- bis 3,3-kb entspannt zirkuläres, partiell doppelsträngiges DNA-Genom (engl.: relaxed circular DNA, rcDNA), eine Virion-assozierte Polymerase, eine eng begrenzte Wirtsspezifität und die Initiation persistierender Infektionen mit ausgeprägtem, aber nicht absolutem Lebertropismus. Bei der Infektion einer Wirtszelle kommt es bei allen Hepadnaviren zur Sekretion eines großen Überschusses an subviralen Lipoproteinpartikeln (SVPs).

2.3.1 DHBV als Modellsystem für Hepatitis B

Um ein volles Verständnis von der Biologie des HBV zu bekommen, fehlte es bislang sowohl an einer infizierbaren stabilen Zelllinie als auch an einem geeigneten

Kleintiermodell. Seit kurzer Zeit ist nun eine von einem Hepatokarzinom abgeleitete Zelllinie, genannt HepaRG, für *in vitro*-Infektionen etabliert worden (Gripon et al., 2002). Sie benötigt jedoch eine lange Differenzierungsphase, um permissiv zu werden, kann nur unter Zuhilfenahme von PEG infiziert werden und unterstützt anscheinend weder cccDNA-Amplifikation noch horizontale Zell-zu-Zell-Infektion (Olivier Hantz, unveröffentlichte Daten).

Die Infektion von Pekingenten mit DHBV erweist sich daher weiterhin als ein wertvolles Tiermodellsystem für Studien von allgemeiner Bedeutung für Hepadnaviren. Infizierbare Enten sind kommerziell erhältlich und die Herstellung sowie die Kultur infizierbarer Entenleberzellen in vitro stellt keine prinzipielle Hürde dar. Obwohl Mensch und Ente nur entfernt verwandte Wirte sind, zeigen ihre Hepatitis B-Viren fundamentale Gemeinsamkeiten in Struktur und Lebenszyklus auf. Daneben gibt es jedoch auch substantielle Unterschiede im Detail. DHBV scheint bei kongenitaler Übertragung über Dottersackzellen auf Entenküken (Urban et al., 1985) bzw. bei der Infektion 1-3 Tage nach dem Schlüpfen nicht pathogen zu sein, denn die so infizierten Tiere entwickeln keinerlei Hepatitissymptome, keine Leberzirrhose oder HCC. Nur in einem Fall wurde von HCC bei der Ente nach DHBV-Infektion berichtet (Cullen et al., 1989). Bei Tieren, die erst einige Zeit (fünf Tage bis mehrere Monate) nach dem Schlüpfen infiziert werden, kommt es jedoch in Abhängigkeit von der Virusdosis zu einem akuten Verlauf und es treten milde pathogene Effekte in der Leber auf, wozu mononukleare Zellinfiltrationen in Portaltrakte gehören (Jilbert et al., 1998), bevor die Infektion ausheilt.

Lange Zeit wurde angenommen, dass Avihepadnaviren kein dem X von HBV entsprechendes Protein kodieren. HBx dient als Transaktivator in infizierten Zellen, wodurch es möglicherweise zur Entstehung von HCC beiträgt (Bouchard and Schneider, 2004; Chan and Ng. 2006), und stimuliert wahrscheinlich die Replikation von HBV (Tang 2005). Erst kürzlich wurde die Expression eines **Proteins** transkriptionsregulierender Funktion, genannt DHBx, auch für DHBV nachgewiesen (Chang et al., 2001). Bis zu diesem Zeitpunkt konnte nicht geklärt werden, welche Rolle DHBx im Lebenszyklus von DHBV zukommt. Auf die Etablierung einer transienten oder persistierenden Infektion unter standardisierten Bedingungen scheint es keinen Einfluss zu nehmen (Meier et al., 2003). Nicht klar ist bisher, ob das X-Protein von DHBV eventuell für die Etablierung einer chronischen Infektion notwendig ist oder nur, wenn der zweite Transaktivator, das phosphorylierte große Hüllprotein DHBL, ausfällt. Vorläufige, unveröffentlichte Daten zeigten jedoch, dass auch der Verlust beider Transaktivatoren,

DHBL und DHBx, keinen generellen Einfluss auf die Replikation von DHBV in LMH-Zellen und dessen Infektiosität für PDLCs hat (Diplomarbeit von Christine Kranig am HPI, 2006).

HBV besitzt im Gegensatz zu DHBV drei Leserahmen für Hüllproteine (preS1, preS2 und S bzw. L, M und S) und die Verteilung der verschiedenen Hüllproteine auf die einzelnen Formen der viralen Partikel unterscheidet sich von der bei DHBV. Auch für DHBV wurde neben dem großen Hüllprotein (L) und dem kleinen Hüllprotein (S) ein drittes Hüllprotein (St) gefunden (Grgacic and Anderson, 2005), welches jedoch anders als bei HBV ein proteolytisches Produkt von S ist.

SVPs treten bei HBV in Form von sphärischen Partikeln und Filamenten auf. Bei DHBV entstehen dagegen nur sphärische SVPs (siehe unten). Diese leeren Hüllen werden jedoch sowohl bei HBV als auch bei DHBV in ca. 1000-fachem Überschuss im Vergleich zu Virionen produziert.

2.3.2 Struktur von DHBV-Partikeln und -Genom

Während einer Infektion mit DHBV werden zwei verschiedene Partikeltypen produziert (Abbildung 3), umhüllte Virionen und pleomorphe, 35-60 nm große, leere Hüllen, die SVPs (Mason et al., 1980; McCaul et al., 1985). Letztere werden von infizierten Zellen in einem ca. 1000-fachen Überschuss zu Virionen sezerniert. Ein dritter Partikeltyp von DHBV tritt auf, wenn Zellen mit Expressionsvektoren, die für das DHBV-Genom kodieren, transfiziert werden. Es handelt sich dabei um nicht umhüllte Nukleokapside, die das DHBV-Genom enthalten können, jedoch nicht infektiös sind.

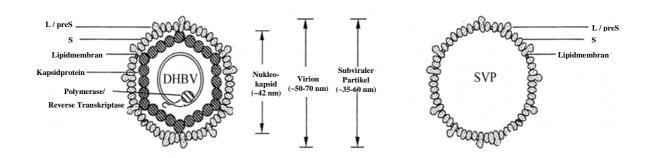


Abbildung 3: Struktur von DHBV-Partikeln

Die Virionen des DHBV (links) bestehen aus einer Lipidhülle, in welche die Hüllproteine L/preS und S eingebettet sind, und dem in Innern der Hülle liegenden Nukleokapsid, welches die virale rcDNA und die virale Polymerase beherbergt. Subvirale Partikel (SVPs, rechts), die lediglich aus der viralen Hülle bestehen, werden in großem Überschuss produziert.

DHBV-Virionen haben sphärische Gestalt mit einem ungefähren Durchmesser von 50-70 nm (W. Gerlich, persönliche Kommunikation). Mittels Negativfärbung in der Elektronenmikroskopie erscheinen sie doppelschalig, bedingt durch das im Innern der Hülle liegende, ikosaedrisch aus 240 Einheiten aufgebaute, ungefähr 35 nm große Nukleokapsid (Nassal and Schaller, 1993).

Die äußere Hülle entstammt einer Lipidmembran der Wirtszelle, der des endoplasmatischen Retikulums (Patzer et al., 1986). Sie weicht aber in ihrer Lipidzusammensetzung wie bei HBV vermutlich stark von den zellulären Membranen ab (Satoh et al., 2000; Satoh et al., 1990) und in sie sind die viralen Hüllproteine L und S in hoher Anzahl eingebettet. Das Nukleokapsid wird aus einem einzigen Baustein – dem viralen Kapsidprotein (DHBc) – geformt. Es enthält das virale Genom, die virale Polymerase und eine Anzahl zellulärer Proteine, wie Hsc70, Hsp40 (Beck and Nassal, 2003), Hsp90 und p23 (Hu et al., 1997), die als Chaperone die Aktivierung der Polymerase unterstützen.

Das virale Genom von 3,0 kb im Virion ist partiell doppelsträngig und zirkulär, jedoch nicht kovalent geschlossen. Es wird daher als entspannt zirkuläre (relaxed circular) DNA (rcDNA) bezeichnet. Der Negativ-Strang der DNA (-) hat mehr als volle Länge durch eine kleine terminale Redundanz. Er ist an seinem 5'-Ende nicht-kovalent mit der viralen Polymerase (P) verbunden, die neben ihrer Aktivität als DNA-abhängige DNA-Polymerase auch die einer reversen Transkriptase und einer RNaseH besitzt. Der Positiv-Strang (+) ist unvollständig und bedingt das sogenannte "Gap" (Lücke) im Genom. Er trägt an seinem 5'-Ende ein kurzes Oligoribonukleotid, welches dem 5'-Ende der prägenomischen RNA entstammt. Das DHBV-Genom ist wie alle hepadnaviralen Genome extrem kompakt organisiert. Es kodiert insgesamt sechs Proteine, wobei jedes Nukleotid Teil eines oder zweier offener Leserahmen ist (Abbildung 4).

Dem Leserahmen für das kleine Hüllprotein S ist die preS-Region vorangestellt, von der aus das N-terminal verlängerte große Hüllprotein L (DHBL) transkribiert wird. Dem Leserahmen für das Kapsidprotein C ist die präC-Region vorangestellt. Beim Transkriptionsstart am präC-Startkodon entsteht ein N-terminal verlängertes DHBc, genannt Präcore-Protein, welches während der Reifung noch C- und N-terminal prozessiert, z.T. glykosyliert und als nicht-viruspartikelassoziiertes, lösliches Protein sekretiert wird. In dieser Form wird es als e-Antigen (eAg) bezeichnet und gilt bei HBV als Marker für aktive Virus-Vermehrung (Ferenci, 2004).

Die Funktion des eAg liegt bislang im Dunkeln, zumal auch eAg-defiziente Mutanten von DHBV existieren und infektiös sind (Schneider et al., 1991). Vor kurzem sind jedoch erste Anhaltspunkte gefunden worden, die für einen möglichen selektiven Vorteil von eAgproduzierenden Viren gegenüber eAg-defizienten Viren während bestimmter Infektionsstadien sprechen (Zhang and Summers, 1999) und dem eAg eine Rolle bei der Vermittlung der Immuntoleranz zusprechen (Chen et al., 2005).

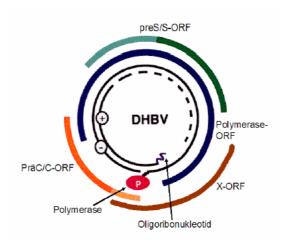


Abbildung 4: Die Organisation des DHBV-Genoms

Die inneren schwarzen Linien stellen das Genom mit (+)- und (-)-Strang dar. Die kovalent mit dem (-)-Strang verbundene Polymerase ist als roter Punkt, das mit dem (+)-Strang assoziierte Oligoribonukleotid ist als Haken dargestellt. Um das Genom liegen als farbige Kreisabschnitte die offenen Leserahmen (ORF).

Die viralen Proteine werden von vier mRNA-Spezies, X-, S-, preS/S-mRNA und der sogenannten prägenomischen RNA (pgRNA), translatiert. Die pgRNA umfasst das gesamte Genom inklusive eines N-terminalen Überhangs. Von ihr wird ebenfalls das P-Protein und möglicherweise bei einigen Viren auch das X-Protein translatiert. Sie wird als Prägenom vor der reversen Transkription in Nukleokapside verpackt und hat somit eine Doppelfunktion.

2.3.3 Lebenszyklus und Replikation

Hepadnaviren infizieren fast ausschließlich Hepatozyten. Nur vom Gallengangsepithel ist bekannt, dass auch dort die Replikation von DHBV ablaufen kann (Lee et al., 2001). Geringe Mengen an Protein und DNA (auch replikative Intermediate) von DHBV wurden außerdem in der Milz, im Pankreas, der Niere und lymphatischen Organen nachgewiesen, sind aber nicht mit pathologischen Erscheinungsbildern verbunden (Cullen et al., 1989; Halpern et al., 1983; Jilbert et al., 1987; Walter et al., 1991).

Der Lebenszyklus von DHBV (Abbildung 5) beginnt mit der Bindung von Virionen an die Zellmembran. Dies erfolgt vermutlich über die Interaktion einer definierten preS-Region des L-Proteins mit dem Membranprotein gp180 (CPD, Carboxypeptidase D; Urban et al., 1998).

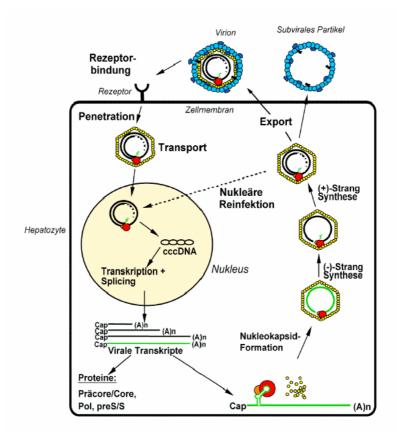


Abbildung 5: Lebenszyklus des DHBV

Nach der Rezeptorbindung wird ein DHBV-Virion internalisiert und das Kapsid in den Zellkern transportiert. Dort wird das virale rcDNA-Genom zur cccDNA komplettiert und transkribiert. Im Zytoplasma werden die viralen Transkripte translatiert und die pgRNA zusammen mit der Polymerase von Kapsidproteinen eingekapselt. Innerhalb des Nukleokapsids findet die reverse Transkription statt. DNA-haltige Nukleokapside werden schließlich umhüllt und exportiert oder zurück zum Nukleus transportiert. Die an der ER-Membran synthetisierten Hüllproteine bilden ohne Nukleokapsid sogenannte subvirale Partikel aus, welche gemeinsam mit Virionen sekretiert werden

An der spezifischen infektionskompetenten Internalisierung von Virionen und möglicherweise SVPs in Hepatozyten sind vermutlich jedoch zusätzlich andere Faktoren beteiligt, da gp180 nicht exklusiv auf Hepatozyten vorkommt. Auch die hohe Wirtsspezifität und Organotropie von Hepadnaviren lässt die Beteiligung von weiteren wirts- und gewebsspezifischen Faktoren beim Eintritt und Transport der Viren in Hepatozyten vermuten.

Die Internalisierung erfolgt über Endozytose (Köck et al., 1996). Internalisierte DHBV-rcDNA kann im Zytoplasma 30 min nach Beginn einer Exposition nachgewiesen werden (Qiao et al., 1999). Der Ausbruch der Viren aus dem endosomalen Transportweg erfolgt

vermutlich durch Fusion der viralen Hülle mit der endosomalen Membran (Chojnacki et al., 2005; Grgacic and Schaller, 2000) oder durch Translokation des viralen Partikels durch die endosomale Membran mithilfe von Translokationsmotiven (TLM) auf den Hüllproteinen (Stoeckl et al., 2006) Eine Kandidatenregion für die Membranpermeabilisierung durch DHBV wurde im N-Terminus der Transmembranregion TM1 in der Sequenz des S-Proteins durch Sequenzvergleiche mit Translokationssequenzen von HBV identifiziert (Oess and Hildt, 2000). Diese Sequenzen verursachen Membranpermeabilisierung unter der Voraussetzung einer vorherigen proteolytischen Abspaltung des preS-Teils (Lu et al., 1996) bzw. pH-induzierter Konformationsänderung der L-Proteine in der viralen Hülle (Grgacic et al., 2000).

Das Nukleokapsid wird im Zytoplasma wahrscheinlich unter Mitwirken des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Funk et al., 2004) zum Zellkern transportiert. In der Kernpore öffnet sich bzw. zerfällt das Kapsid und das virale Genom gelangt in den Zellkern, wo es erst vier Stunden nach Infektionsbeginn nachgewiesen werden kann (Qiao et al., 1999).

Im Zellkern wird die virale rcDNA in episomale, kovalent geschlossene, zirkuläre DNA (engl.: covalently closed circular DNA, cccDNA) umgewandelt. Das umfasst die Reparatur der Lücke im Genom, die Entfernung der 5'-terminalen Strukturen (Oligoribonukleotid und Polymerase) und die kovalente Ligation der Stränge; Vorgänge, die wahrscheinlich von der Wirtszellmaschinerie ausgeführt werden (Köck and Schlicht, 1993).

Die cccDNA stellt die Matrize für die Transkription des viralen Genoms durch die zelluläre RNA-Polymerase II dar. Die viralen RNAs werden in das Zytoplasma transportiert und translatiert. Die viralen Hüllproteine werden direkt an der Membran des endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und dort insertiert. Dabei orientiert sich der preS-Teil der L-Proteine zytoplasmatisch. Die Translation der pgRNA resultiert in Kapsidproteinen, die spontan zu Nukleokapsiden assemblieren können. Die ebenfalls von der pgRNA translatierte Polymerase interagiert spezifisch und Chaperon-vermittelt mit der Stamm-Ring Struktur 5'-ε-Region der pgRNA, um sie herum wird das Nukleokapsid assembliert. Für die Einkapselung der viralen RNA ist neben der 5'-ε-Region bei DHBV eine weitere über 1 kb strangabwärts gelegene RNA-Sequenz notwendig; sie wird Region II genannt (Calvert and Summers, 1994). Die 3'-ε-Region ist nicht funktionell (Hirsch et al., 1991). Die reverse Transkription (Abbildung 6) erfolgt innerhalb des Nukleokapsids und ist bei DHBV spezifisch mit einer kompletten Dephosphorylierung der Kapsidproteine verbunden (Perlman et al., 2005).

Von der 5'-gelegenen ε-Region wird zunächst ein kurzes DNA-Oligonukleotid revers transkribiert. Dieses ist kovalent mit der Polymerase verbunden, weil das P-Protein selbst als Primer dient und wird dann mit ihr zusammen zum 3'-proximalen direkten Repeat-Element (DR1) transloziert. Dies wird als erster Matrizenwechsel bezeichnet.

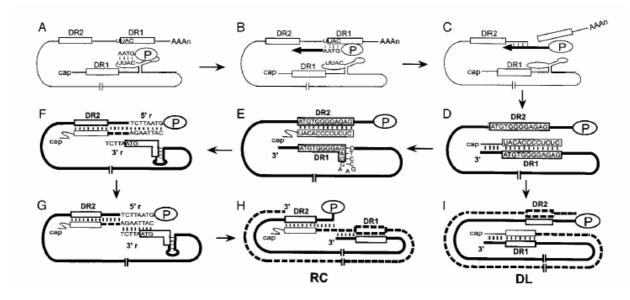


Abbildung 6: Modell für die reverse Transkription bei DHBV

(A) Die pgRNA (dünne Linie) ist die Matrize für die (-)-Strang-DNA-Synthese. Die 12-Nukleotid-Wiederholungssequenzen DR1 und DR2 sind durch offene Kästchen symbolisiert, mit zwei Kopien von DR1 auf der pgRNA. Vier Nukleotide werden innerhalb der & Region nahe dem 5'-Ende durch das P-Protein synthetisiert (Ellipse mit P). (B) Minus-Strang-Matrizen-Wechsel: die entstehende (-)-Strang-DNA wechselt zu einer Akzeptor-Stelle, die mit der 3'-Kopie des DR1 überlappt. (C) und (D) Die (-)-Strang-DNA-Synthese wird fortgesetzt, bis eine ein Genom lange (-)-Strang-DNA (fette Linie) synthetisiert ist. Durch die Degradation der pgRNA durch die RNase H-Aktivität des P-Proteins wird der 18-Nukleotid-RNA-Primer für die (+)-Strang DNA-Synthese generiert. Das 3'-Ende des Primers ist komplementär zu DR1. (E) Primer Translokation: der (+)-Strang-Primer wechselt die Matrize von DR1 zu DR2 nahe dem 5'-Ende des DNA-(-)-Stranges. Eine kleine Haarnadelstruktur, die mit DR1 überlappt, verhindert den Transkriptionsstart von DR1. (F) Die (+)-Strang-DNA-Synthese wird von DR2 aus initiiert. Dem Transkript fehlen die jeweils letzten 7 oder 8 Nukleotide (5' r und 3' r). (G) Zirkularisierung: der entstehende (+)-Strang wechselt vom 5' r zum 3° r. Durch diesen Matrizenwechsel wird das Genom zirkularisiert. (H) die Verlängerung des (+)-Stranges nach der Zirkularisierung führt zum rcDNA-Genom. (I) "In situ Priming": eine kleine Fraktion der (+)-Strang-Primer kann die Blockade von DR1 durch die kleine Haarnadelstruktur bei Schritt (E) überwinden und die Transkription von DR1 initialisieren. Dies führt zur dl-Form des Genoms (doppelsträngig-linear). Quelle: Liu et al., 2003.

Als nächstes wird die DNA bis zum 5'-Ende der pgRNA verlängert, es entsteht eine komplette (-)-Strang-DNA mit einem kurzen terminalen Überhang. Parallel zur (-)-Strang-Synthese wird die RNA-Matrize durch die RNAse H-Aktivität der Polymerase degradiert, bis auf ein kurzes 5'-terminales Oligonukleotid, dessen 3'-Ende die Kopie des 5'-DR1 ist. Für die (+)-Strang-Synthese wird nun dieses RNA-Oligonukleotid zur zweiten Kopie der DR-Sequenz, dem DR2, transferiert, die sich unmittelbar strangaufwärts von DR1 befindet (zweiter Matrizenwechsel). Dort fungiert es als Primer für die (+)-Strang-Synthese, welche bis zum 5'-Ende der (-)-Strang-DNA voranschreitet. Das 3'-Ende des umgebildeten

(+)-Stranges ist komplementär zum 3'-Ende des (-)-Stranges. Hierdurch ist ein weiterer Matrizenwechsel möglich, der zur Zirkularisierung des Genoms führt und die Verlängerung des (+)-Stranges erlaubt. Manchmal entstehen auch doppelsträngige lineare Genome (dl DNA). Dies ist dann der Fall, wenn das nicht von der RNaseH verdaute Oligoribonukleotid des Prägenoms nicht transloziert, sondern die virale DNA aus der 5'-proximalen Position heraus verlängert wird.

Reife Kapside, d.h. solche, die das DNA-Genom enthalten, können entweder mit der Membran des ER und den daraus hervorragenden preS-Domänen der großen viralen Hüllproteine interagieren, durch die anschließende Umhüllung als Virionen ins ER gelangen (Bruss, 2004) und gemeinsam mit dem ca. 1000-fachen Überschuss an SVPs die Zelle über noch nicht bekannte Transportwege verlassen oder zurück zum Zellkern gelangen, wo mit ihrer Hilfe in jeder infizierten Zelle einige 10 bis 100 Kopien cccDNA etabliert werden (Tuttleman et al., 1986). Dieser Vorgang wird als "cccDNA-Amplifikation" bezeichnet. Das Gleichgewicht zwischen Rücktransport zum Zellkern und Sekretion in Form von umhüllten Virionen wird über die Verfügbarkeit von L-Proteinen in der ER-Membran reguliert (Summers et al., 1990). Extrazelluläre DHBV-DNA kann im Überstand infizierter PDHs etwa von Tag 4 nach der Infektion an nachgewiesen werden (Qiao et al., 1999).

2.3.4 Struktur und Funktion des DHBV-Kapsidproteins

Das DHBV-Kapsidprotein (DHBc) besteht aus 262 Aminosäuren. Es ist das einzige Protein aus dem die Struktur des viralen Kapsids besteht. Daher muss es gleichzeitig mehrere verschiedene Funktionen erfüllen. Die Eigenschaft zur Zusammenlagerung wohnt der N-terminalen Domäne, auch Core-Domäne genannt, inne (von Weizsacker et al., 1995), während die C-terminale, argininreiche Region, die sogenannte Protamin-Domäne, die Eigenschaft hat, Nukleinsäuren zu binden (Nassal, 1992). Diese Bifunktionalität ist ein Merkmal aller hepadnaviralen Kapsidproteine. Eine weitere wichtige Funktion ist die Transportfähigkeit innerhalb des Zytoplasmas zum Zellkern, zu den und durch die Kernporen. Hierfür trägt das DHBc eine Kernlokalisierungssequenz (NLS – aa 214-218), die im Gegensatz zum HBc monopartit ist und nicht mit den Phosphorylierungsstellen im C-Terminus überlappt (Mabit et al., 2001). Eine der wichtigsten Funktionen von hepadnaviralen Nukleokapsiden ist die Assistenz bei der Genomreifung – der reversen Transkription. Es ist unumstritten, dass mit der Synthese von Doppelstrang-DNA innerhalb des Nukleokapsids ein "Reife-Signal" auf der Kapsidoberfläche induziert wird, welches

erst die Umhüllung der Partikel und im Anschluss deren Sekretion als Virionen erlaubt (Gerelsaikhan et al., 1996; Perlman and Hu, 2003; Wei et al., 1996). Der Mechanismus ist bislang noch nicht geklärt, doch notwendig hierfür könnte die Dephosphorylierung des Kapsidproteins sein, wodurch eine veränderte Interaktion des DNA-RNA-Hybrids mit dem Kapsid entstehen könnte und eine freiwerdende DHBc-Domäne auf der Kapsidoberfläche exponiert werden könnte.

Das Nukleokapsid selbst hat ikosaedrische Symmetrie. HBV und DHBV gemeinsam sind dabei die Bildung stabiler, symmetrischer, T-förmiger Dimere, deren Querbalken von den C-terminalen Enden der Proteine gebildet werden und deren Stamm aus dem Kapsid herausragt. Dies bedingt für die Nukleokapside beider Viren eine sehr ähnliche Architektur, mit dem Unterschied, dass die Spitzen bei DHBV entsprechend dem größeren Kapsidprotein viel größer sind und von anscheinend sechs und nicht nur vier Helices gebildet werden (Schultz et al., 2004). Selbst ein auf 229 Aminosäuren C-terminal verkürztes DHBc ist noch zur Assemblierung befähigt (Schlicht et al., 1989; Yang et al., 1994). N-terminale Extensionen dagegen verhindern die Kapsidbildung (Köck et al., 1998).

2.3.5 Phosphorylierung und Dephosphorylierung des DHBV-Kapsidproteins

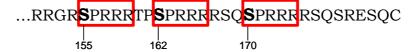
Ein Kennzeichen aller hepadnaviraler Kapside ist, dass sie gegensätzliche Funktionen ausüben müssen. Kapside müssen assemblieren und zerfallen, in den Zellkern oder zum ER transportiert werden, sie müssen umhüllt werden oder ihre Hülle verlieren, Nukleinsäuren müssen gebunden und freigelassen werden. Neben der quartären Struktur wird die Modifikation durch reversible Phosphorylierung als der Hauptregulator dieser verschiedenen Prozesse im Infektionszyklus angesehen.

DHBc besitzt sechs bekannte Phosphorylierungsstellen: S230, S232 (Perlman et al., 2005), T239, S245, S257 und S259 (Yu and Summers, 1994b), von denen die vier letzten ein Prolin in C-terminaler Position besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proline die Phosphorylierung der jeweils stromaufwärts liegenden Aminosäure beeinflussen, womit SP bzw. TP als essentielle Phosphorylierungsmotive in Frage kommen (Yu and Summers, 1994b). Jede der sechs Aminosäuren S230, S232, T239, S245, S257 und S259 kann in unreifen Kapsiden phosphoryliert sein, während das reife Kapsid keine Phosphorylierung an diesen Stellen aufzeigt (Perlman et al., 2005). Die Phosphatreste des unreifen Kapsids sind vermutlich nach außen gerichtet, denn sie können durch Phosphatase-Behandlung *in vitro* entfernt werden (Mabit and Schaller, 2000). Zumindest bei den Aminosäuren 246-262 und damit den Phosphorylierungsstellen S257 und S259 handelt es sich um eine

antigene Region, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Oberfläche des Kapsids exponiert ist (Thermet et al., 2004).

Aufgrund der Beobachtung, dass intrazelluläres DHBc partiell phosphoryliert vorliegt, während extrazelluläres DHBc keine Phosphorylierung aufweist, wurde schon lange vermutet, dass die Dephosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Virusreifung spielt (Pugh et al., 1989). Seitdem wurde die Frage ob und welchen Einfluss eine bestimmte Phosphorylierung/Dephosphorylierung auf den Lebenszyklus des Virus hat, ausschließlich mithilfe von Punkt- und Deletionsmutanten untersucht. Vor allem für HBV wurden eine Vielzahl z.T. widersprüchlicher Daten erhoben. Aus diesen Ergebnissen eine Parallele zu den Einflüssen von Phosphorylierungen zwischen HBV und DHBV zu ziehen, ist aus verschiedenen Gründen nur beschränkt möglich. So zeigen die C-Termini der Kapsidproteine beider Viren keine Sequenzübereinstimmungen, die Phosphorylierungsmotive sind unterschiedlich und die Anzahl der Phosphorylierungsstellen differiert ebenfalls (siehe Abbildung 7).

• C-terminale Sequenz von HBc:



• C-terminale Sequenz von DHBc:



Abbildung 7: Phosphorylierungsmotive von HBc und DHBc im Vergleich

Dargestellt sind die Sequenzen der C-Termini der Kapsidproteine von HBV und DHBV. Die Zahlen markieren die Nummer der phosphorylierten Aminosäure im Protein (bei HBV entsprechen sie dem Subtyp ayw). Phosphorylierte Aminosäuren wurden fett dargestellt, mögliche Motive wurden rot markiert.

Des weiteren enthalten reife HBV-Virionen im Gegensatz zu DHBV-Virionen phosphoryliertes Kapsidprotein (Machida et al., 1991), was auf eine unterschiedliche Regulation und möglicherweise auch Funktion der Phosphorylierung im Lebenszyklus hinweist. Trotzdem ist die Funktionalität der C-Termini verschiedener Hepadnaviren derart konserviert, dass der Austausch des DHBc-C-Terminus mit dem HBc-C-Terminus mit der viralen DNA-Replikation vereinbar ist (von Weizsacker et al., 1995).

Nach Infektion einer Zelle durch Hepadnaviren wird das virale Genom innerhalb des Nukleokapsids zur Kernmembran transportiert. An dieser Stelle konnte für HBV gezeigt werden, dass Bindung und Eintritt des Kapsids durch die Kernpore nur dann erfolgte, wenn die Kapsidproteine eine Phosphorylierung aufwiesen (Kann et al., 1999; Rabe et al., 2003). Durch die Phosphorylierung würde die NLS exponiert und den Importin-vermittelten Eintritt in den Kern ermöglichen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die HBc-Phosphorylierung mit der Nukleinsäurebindeaktivität des Proteins interferiert (Kann and Gerlich, 1994). Ob die entscheidende Phosphorylierung schon existiert, bevor das Virus eine Zelle betritt oder ob das Kapsid auf seinem Weg zum Zytoplasma de novo phosphoryliert wird, ist nicht bekannt. Es wurde jedoch postuliert, dass sich die benötigte Kinase im Innern des Kapsids befindet (Rabe et al., 2003). Dieser Mechanismus müsste ebenfalls für den Reimport von Nukleokapsiden und damit für die Amplifikation der cccDNA gelten. Für DHBV liegen für diesen Schritt noch keine Daten vor. Die NLS des DHBc ist jedoch im Gegensatz zu HBc nicht überlappend den Phosphorylierungsstellen angeordnet, sondern befindet sich weiter N-terminal. Genau wie HBc gelangt DHBc aber auch in den Kern und wird dort in ausgeprägten "nuclear core bodies" gefunden (Mabit et al., 2003).

Die umfangreichste Studie zum Einfluss von Punktmutationen des DHBc, welche die Phosphorylierung (S/T zu D Austausch) oder Dephosphorylierung (S/T zu A Austausch) simulieren sollten, wurde von Yu und Summers durchgeführt (Yu and Summers, 1994a). Sie gibt Anlass zu der Vermutung, dass der Phosphorylierungsstatus der einzelnen Serine unterschiedliche Schritte bei der viralen Replikation beeinflusst, während die T239-Phosphorylierung keinen erkennbaren Einfluss zeigte. Eine Zusammenfassung der publizierten Daten findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Phosphorylierungsbedingungen für den DHBV-Lebenszyklus nach: Yu and Summers, 1994a.

Funktion	Bevorzugter Phosphorylierungsstatus
unreife Kapside	
RNA-Verpackung	keine spezifische Bedingung
Negativ-Strang-DNA	Serin 259 – phosphoryliert
Plus-Strang-DNA	Serin 245 – phosphoryliert
reife Kapside	
cccDNA-Amplifikation	Serin 257 – nicht-phosphoryliert
Virus-Assemblierung	Serin 259 – nicht-phosphoryliert
	Serin 257 – nicht-phosphoryliert
Virale Penetration der Zelle	Serin 259 – phosphoryliert

Die Mutante S245A zeigte einen spezifischen Defekt bei der Synthese der (+)-Strang-DNA und der cccDNA. Diese Mutante konnte keine reife virale DNA synthetisieren und produzierte keine umhüllten Virionen. S245D, S257D und S259D produzierten ebenfalls eine geringere Menge cccDNA und zeigten eine spezifische Reduktion der Produktion umhüllter Virionen. S259A reduzierte die rcDNA-Synthese und auch die Virusproduktion war 3- bis 5-fach reduziert. Die Nachkommenviren waren zudem nicht infektiös.

Eine Phosphorylierung an den Serinen 245 und 259 sollte demnach die rcDNA-Synthese innerhalb der Kapside stimulieren. Dephosphoryliertes Serin 257 trüge zu einer effektiven cccDNA-Synthese bei und die Dephosphorylierung von Serin 259 würde die Virusproduktion verstärken. Phosphoryliertes Serin 259 wiederum wäre für die Initiation der Infektion erforderlich. Zusammengefasst schienen phosphorylierte Serine die Virusfunktionen des unreifen Kapsids zu unterstützen, während sie die Funktionen des reifen Kapsids in der Mehrzahl behinderten.

Da sowohl Phosphorylierungs- als auch Dephosphorylierungsmimikry am als Haupt-Phosphorylierungsstelle angesehenen Serin 245 einen negativen Effekt auf die Virusreplikation zeigte (Köck et al., 2003), könnte innerhalb des Replikationszyklus des DHBV sowohl Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung an derselben Stelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Rolle spielen.

Die Ausbildung des Nukleokapsids und die Verpackung von pgRNA, jedoch nicht die reverse Transkription, können noch stattfinden, wenn die letzten 36 Aminosäuren des DHBc und damit alle bekannten Phosphorylierungsstellen deletiert wurden. Fehlen nur die letzten 12 Aminosäuren und damit die letzten zwei Phosphorylierungsstellen, findet die rcDNA-Synthese statt, jedoch sind die Viren nicht infektiös (Schlicht et al., 1989).

Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Interpretation der durch Mutationen erhaltenen Daten schwierig. Es ist nicht klar, wie gut die Aminosäuresubstitutionen phosphorylierte oder nicht-phosphorylierte Serine oder Threonine nachahmen, da die strukturellen Details der Ladungsverteilung und Wasserstoffbrückenbindungen nicht identisch mit denen bei authentischen Phosphorylierungen sind. Auch können die Effekte sequentieller Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen durch Mutationsmimikry nicht ausreichend gut simuliert werden.

2.3.6 Die viralen Hüllproteine L und S

Beide DHBV Hüllproteine werden von einem offenen Leserahmen kodiert, der in Form von zwei mRNAs transkribiert wird. Das S-Protein umfasst 167 Aminosäuren und hat ein

Molekulargewicht von 17 kDa. Die C-terminale Sequenz des L-Proteins ist identisch mit der des S-Proteins. N-terminal besitzt das L-Protein jedoch zusätzliche 161 Aminosäuren, die die preS-Region bilden (Pugh et al., 1987). Es besitzt ein N-terminales Myristylierungssignal, soweit bekannt in allen Hepadnaviren konserviert ist. Das erwartete Molekulargewicht von L liegt bei 35,7 kDa. In der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erscheint das Protein als Doppelbande von 35 bis 37 kDa, wobei die langsamer migrierende Spezies durch Phosphorylierung an Serin 118 (S118) entsteht (Borel et al., 1998; Grgacic and Anderson, 1994; Rothmann et al., 1998). Gewöhnlich wird intrazellulär noch eine andere L-Spezies von 28 kDa gefunden. Dabei handelt es sich um ein proteolytisches Produkt von L, welches ebenfalls die Phosphorylierung an S118 tragen kann (Fernholz et al., 1993). Weitere minore L-Spezies bei 30 kDa und 33 kDa treten in der Regel auf und entsprechen sowohl Degradationsprodukten als auch L-Proteinen, welche an Startkodons innerhalb der preS-Region beginnen (Fernholz et al., 1993).

Die Hüllproteine von DHBV werden nicht glykosyliert, obwohl sie Signalsequenzen für Glykosylierung aufweisen (Pugh et al., 1987). Sie werden am rauen ER synthetisiert und enthalten mehrere membrandurchspannende Regionen. Eine hydrophobe Region wird kotranslational in die Membran des ER insertiert. Sie wird als Transmembranregionen 2 (TM2) bezeichnet. TM1 wird posttranslational in Abhängigkeit von der Anwesenheit von S in die Membran inseriert (Grgacic et al., 2000; Swameye and Schaller, 1997). Die hydrophile Sequenz zwischen TM1 und TM2 durchläuft die ER-Membran zweimal (Grgacic et al., 2000). Die preS-Domäne ist ursprünglich auf der zytoplasmatischen Seite des ER lokalisiert und wird posttranslational bei 50% der L-Proteine ins Lumen des ER transloziert (Guo and Pugh, 1997; Swameye and Schaller, 1997). Großes und kleines Hüllprotein werden im Verhältnis 1:4 synthetisiert (Ganem and Varmus, 1987; Grgacic and Anderson, 2005; Schultz et al., 2004). Das S-Protein ist die strukturelle Hauptkomponente der Hülle; es bestimmt die Form, treibt das "Budding" und die Sekretion von viralen Partikeln. Das L-Protein spielt eine Rolle bei der Bindung des reifen Nukleokapsids an die ER-Membran und ist in der Lage, das als zellulären Rezeptor postulierte Protein gp180 zu binden (Urban et al., 2000).

Eine weiter minore Variante des S-Proteins, S_t, wurde in der Hülle von DHBV identifiziert (Grgacic and Anderson, 2005). Sie entsteht durch proteolytische Prozessierung von S und hat eine Größe von 10 kDa. Für sie wird eine Funktion bei der posttranslationalen Translokation von L vermutet, da ihr Anteil an der Hüllbildung von 50% der L-Proteine dem Anteil translozierter preS-Domänen entspricht.

2.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Mindestens ein Drittel aller humanen Proteine enthalten kovalent gebundenes Phosphat. Die reversible Phosphorylierung greift in fast alle Aspekte des Lebens regulierend ein, von klassischen metabolischen Signalwegen über Gedächtnis bis zum Zelltod. Phosphorylierung und Dephosphorylierung können Enzymaktivitäten steigern oder mindern, ein Protein für den Abbau markieren, die intrazelluläre Lokalisierung eines Proteins regulieren oder Proteine zur Interaktion mit oder Dissoziation von anderen Proteinen, RNA oder DNA befähigen. Viele Proteine tragen multiple Phosphorylierungsstellen, an denen Kinasen und Phosphatasen voneinander abhängig und hierarchisch agieren können. In den meisten Fällen ist nur sehr wenig oder nichts über das Zusammenspiel multipler Phosphorylierungsstellen innerhalb eines Proteins bekannt (Klumpp and Krieglstein, 2002).

Die für die Modulation der Phosphorylierung verantwortlichen Enzyme sind Proteinkinasen (fügen Phosphatgruppen hinzu) und Proteinphosphatasen (spalten Phosphatgruppen ab). Sie sind in vielen Fällen selbst betroffen von multipler und reversibler Phosphorylierung. Anhand von Sequenzerhebungen wird die Zahl der humanen Kinasen auf ca. 600 geschätzt. Ihnen gegenüber stehen geschätzte 200 kodierte Phosphatasen. Da eine Phosphatase aber mit verschiedenen regulatorischen und Steueruntereinheiten assoziieren kann, wird eine ähnlich hohe Anzahl an funktionell verschiedenen Phosphatase-Holoenzymen wie an Kinasen vermutet.

Eukaryotische Proteinphosphatasen werden unterteilt in die biochemisch unterschiedlichen Serin/Threonin-Phosphatasefamilien PPP (Phosphoproteinphosphatasen) und PPM (Mg²⁺abhängige Proteinphosphatasen) und die Tyrosin-Phosphatasefamilie PTP. Aufgrund von Substratspezifität und Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren werden Typ I-Phosphatasen (durch Inhibitor 1 zu hemmen) und Typ II-Phosphatasen (durch Inhibitor 2 zu hemmen) unterschieden. Gut charakterisierte Vertreter der PPP-Familie sind Proteinphosphatase 1 (PP1), Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die Ca²⁺-abhängige Protein-(PP2B)¹, während die PPM-Familie Mg²⁺-abhängige die phosphatase 2BProteinphosphatase 2C (PP2C) und die mitochondriale Pyruvatdehydrogenase zu ihren Mitgliedern zählt. Die PTP-Familie umfasst nach einigen Autoren auch die "dual specificity" (DSP)-Phosphatasen, die sowohl Serin- und Threonin-, als auch Tyrosinreste dephosphorylieren können.

¹ Nach neuerer Nomenklatur wird PP2A als Phosphoproteinphosphatase 2 (PPP2) und Calcineurin als Phosphoproteinphosphatase 3 (PPP3) bezeichnet.

2.4.1 Serin-/Threonin-Phosphatasen der PPP-Familie

Fast alle PPP-Familienmitglieder enthalten drei konservierte Sequenzmotive, die gemeinsam als "Phosphoesterasemotiv" bezeichnet werden (Rusnak and Mertz, 2000). Innerhalb des aktiven Zentrums sind PP1 und PP2A zu 49% homolog, PP1 und PP2B zu 39% (Rusnak and Mertz, 2000). PP2C teilt keinerlei Sequenzhomologie mit den anderen PPP-Familienmitgliedern und wird deshalb als eine separate Superfamilie angesehen (Bork et al., 1996).

Serin-/Threonin-Phosphatasen sind Metalloenzyme mit zwei divalenten Kationen (Mn²⁺ und Fe³⁺ bei PP1 bzw. Zn²⁺ und Fe³⁺ bei PP2B) im katalytischen Zentrum. Ein metallatomgebundenes Wassermolekül fungiert als Nukleophil, um das Phosphoratom der Phosphatgruppe zu attackieren und schließlich das Orthophosphat als Brücke zwischen die beiden Metallatome zu übertragen. Die Freisetzung des Phosphats regeneriert das Enzym für eine weitere Runde der Dephosphorylierung (Rusnak and Mertz, 2000).

Neben PP1, PP2A und PP2B wurden weitere gering und gewebs- oder entwicklungsspezifisch exprimierte PPP-Familienmitglieder identifiziert: SIT4, PP5, PPQ, PPV, PPX, PPY und PPZ.

2.4.1.1 Calcineurin

Calcineurin ist eine der wichtigsten Determinanten von Ca²⁺-abhängigen eukaryotischen Signalkaskaden. Sie spielt u.a. eine anerkannte Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems, dem Lernen, der Erinnerung, der Apoptose und der hormonellen Kontrolle.

Calcineurin (CN) ist eine dimere Phosphatase. Sie besteht aus einer ca. 60 kDa katalytischen Untereinheit CNA, die in der Gegenwart einer Ca²⁺-Konzentration von weniger als 10⁻⁷ M fest mit seiner regulatorischen 19 kDa Untereinheit CNB verbunden, jedoch inaktiv ist (Klee et al., 1988).

CN wird in vielen Geweben exprimiert. Seine höchste Expression erreicht es im Gehirn, wo es mehr als 1% des Gesamtproteins ausmacht (Yakel, 1997). Weiterhin beschrieben wurde CN unter anderem in B- und T-Lymphozyten (Kincaid et al., 1987), Osteoklasten (Awumey et al., 1999), dem Rückenmark (Strack et al., 1996), den Nieren (Tumlin, 1997), der Leber (Hanley et al., 1987), dem Pankreas (Gagliardino et al., 1991), in Muskeln (Ingebritsen et al., 1983), der Retina (Cooper et al., 1985), in den Hoden (Moriya et al., 1995) und in der Plazenta (Pallen et al., 1985). Intrazellulär findet man CN hauptsächlich

im Zytoplasma. Es wurde jedoch auch nukleär (Bosser et al., 1993; Shibasaki et al., 1996) und mit dem Zytoskelett assoziiert (Ferreira et al., 1993) beschrieben.

Die Untereinheiten

Monomeres CNA ist inaktiv, während andere Phosphatasen mit verwandten katalytischen Zentren als Monomer aktiv sind. Der Mechanismus der Aktivierung von CN durch CNB ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch scheint die konformationelle Faltung von CNA durch CNB für die allosterische Aktivierung essentiell zu sein (Milan et al., 1994).

Drei Isoformen von CNA (α , β , γ) wurden identifiziert. CNA α und CNA β werden ubiquitär, die γ -Isoform wird testisspezifisch exprimiert (Muramatsu et al., 1992).

Die katalytische Untereinheit (Abbildung 8) besitzt eine globuläre Phosphatase-Domäne (AS 1-346), eine helikale Domäne, die die B-Untereinheit bindet (AS 347-373), eine ungeordnete Region, welche eine Calmodulin-Bindestelle besitzt (390-414), und ein autoinhibitorisches Peptid, welches in das aktive Zentrum der Phosphatase-Domäne hineingreift und deren Aktivität verhindert (AS 469-486). Deletiert man CNA von der Aminosäure 374 an, so erhält man eine unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration, konstitutiv aktive Phosphatase (Clipstone et al., 1994).

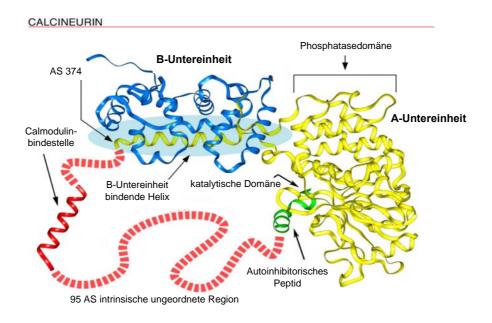


Abbildung 8: Die Domänenstruktur von Calcineurin

Calcineurin A besteht aus der katalytischen Domäne (gelb), daran schließt sich die Binderegion für die B-Untereinheit an, gefolgt von einer Calmodulin-Bindestelle (rot) innerhalb einer intrinsischen, ungeordneten Region und dem autoinhibitorischen Peptid (grün), welches in die katalytische Domäne hineinragt. Calcineurin B ist in blau dargestellt. Ein an der Aminosäure 374 terminiertes CN ist konstitutiv aktiv. Quelle: Oak Ridge National Laboratory (www.ornl.gov).

Die β-Isoform hat eine etwas niedrigere Mobilität in SDS-PAGE entsprechend ihrer höheren molekularen Masse von 59 kDa (CNAα: 57,6 kDa) (Perrino et al., 2002).

Der Hauptanteil der Phosphataseaktivität in Herz, Hirn, Leber, Nieren und Bauchspeicheldrüse kann CNAα zugeschrieben werden, da sie hier den Hauptanteil an CNA stellt. In ihrer Aktivität jedoch unterscheiden sich CNAα und CNAβ nicht (Kung et al., 2001). Gewebe- und zelltypspezifische Variationen in der Menge und Ratio der beiden Isoformen wurden aber festgestellt (Jiang et al., 1997; Rusnak and Mertz, 2000). Beide Isoformen werden in der Leber exprimiert. Die Gesamtaktivität von CN ist jedoch im Vergleich zu anderen Geweben sehr gering (Kung et al., 2001).

Von CNB sind zwei Isoformen bekannt, CNB1 und CNB2. CNB1 wird ubiquitär exprimiert und mit CNAα und CNAβ assoziiert gefunden. CNB2 bindet an CNAγ und wird testisspezifisch exprimiert. Strukturell besteht CNB aus zwei globulären Ca²⁺-Bindedomänen. Jede dieser Domänen besteht aus zwei EF-Hand-Motiven, die denen von Calmodulin ähneln (Ke and Huai, 2003). Eine hoch konserviert N-terminale Myristylierung fungiert als stabilisierendes strukturelles Element (Kennedy et al., 1996) und koordiniert die Bindung von CN an phospholipidhaltige Vesikel (Kennedy et al., 1997).

Die Regulation

Die klassische Aktivierung von Calcineurin erfolgt über einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wie sie durch Stimulation der T-Zellrezeptoren bei Lymphozyten auftritt. Ca²⁺-beladenes Calmodulin bindet die A-Untereinheit von CN und verändert dabei reversibel die Enzymstruktur. Die autoinhibitorische Domäne entfernt sich aus dem aktiven Zentrum, wodurch die Basalaktivität von Calcineurin um ein Vielfaches steigt. Ca²⁺-Bindung an die hochaffinen Bindestellen von CNB spielt eher eine strukturelle Rolle, während die Ca²⁺-Bindung an die niedrigaffinen Bindestellen des CNB für die Calmodulin-Aktivierung verantwortlich ist (Stemmer and Klee, 1994).

Die *in vivo*-Stimulation von CN gelingt durch die Behandlung von z.B. T-Zellen mit PMA (Phorbol-12-myristat Acetat) und Kalzium-Ionophoren (wie Ionomycin). Die Aktivität von Calcineurin kann jedoch auch durch Phospholipide (Politino and King, 1987) und Oxidantien wie H₂O₂ beeinflusst sein (Reiter et al., 1999).

Die Spezifität

Die bekanntesten Substrate von CN sind die Mitglieder 1-4 der NFAT-Proteinfamilie (engl.: nuclear factor of activated T-cells). Weitere Substrate sind z.B. Inhibitor 1,

Neurogranin, Phosphorylase Kinase, NO-Synthase, Dynamin, Elk-1, Hsp25, Tau und Bcl-2.

Die Spezifität von Calcineurin wird anders als bei anderen Phosphatasen nicht durch eine Konsensus-Sequenz, sondern durch eine Reihe primär- und höher geordneter, struktureller Eigenschaften der Substrate bestimmt (Donella-Deana et al., 1994). Andererseits wurde eine in der Calcipressin-Proteinfamilie konservierte Sequenz FLISPPxSPP als Phosphorylierungs- und Bindestelle identifiziert (Gorlach et al., 2000). Die Mitglieder der NFAT-Familie tragen eine andere Erkennungssequenz: PxIxIT (Aramburu et al., 1998). Das daraus abgeleitete VIVIT-Peptid ist ein durch Kompetition hoch affiner CN-Inhibitor (Aramburu et al., 1999).

Die Inhibitoren

Cyclosporin A (CsA) ist ein neutrales, lipophiles, zyklisches Peptid aus 11 Aminosäuren und wurde aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isoliert (Borel et al., 1976). Es komplexiert mit dem zytoplasmatischen Rezeptor Cyclophilin A (CypA). Gemeinsam binden sie nicht-kompetitiv CN und inhibieren dessen Aktivität. Sowohl CNAα als auch CNAβ sind sensitiv gegenüber CsA (Kung et al., 2001). Die Wirkung von CsA in der Leber *in vivo* hält mindestens 24 Stunden an und reduziert die Aktivität von CN in Gewebehomogenaten um bis zu 94% bei einer Konzentration von 1000 ng / ml mit einem IC₅₀ Wert von 20 ng / ml (Kung et al., 2001). Die maximale Inhibition setzt innerhalb der ersten 20 min der Behandlung ein (Fruman et al., 1996). Auf die Replikation von HBV *in vitro* zeigt CsA inhibitorische Wirkung (Wu et al., 2003).

Ein ähnlicher Mechanismus wie für die CN-Inaktivierung durch CsA gilt auch für FK506 (unter dem Namen Tacrolimus bekannt), ein Lakton aus der Fermentation des *Streptomyces tsukubaensis* (Kino et al., 1987), welches das zytoplasmatische FKBP12 (engl.: FK506 binding protein 12) bindet. Der FK506-FKBP12-Komplex inhibiert CN aber durch Bindung an einer anderen Position als der CsA-CypA-Komplex. Die Inhibition der CN-Aktivität *in vitro* ist bei 100-fach geringerer Konzentration als mit CsA zu erreichen (Kino et al., 1987). CNAα ist jedoch sensitiver gegenüber FK506 als CNAβ, so dass substratspezifische Unterschiede in der Sensitivität in einzelnen Geweben zu erwarten sind (Perrino et al., 2002). Für die Interaktion von CN mit Medikamenten/Immunophilin-Komplexen sind sowohl die B-Untereinheit, als auch eine CNA-Region innerhalb der katalytischen Domäne (AS 32-99) nötig (Clipstone et al., 1994).

Als endogene Inhibitoren von CN sind das 79 kDa-Proteinkinase A-Ankerprotein (AKAP79) (Coghlan et al., 1995) und das Calcineurin-Homologprotein (CHP) (Lin and

Barber, 1996) bekannt. Des Weiteren wurden CAIN/CABIN1 (Lai et al., 1998) und Calcipressin (Gorlach et al., 2000) als CN-bindende und -inhibierende Proteine identifiziert. Auch ein viral kodierter CN-Inhibitor ist bekannt. Es handelt sich dabei um A238L des Afrikanischen Schweinefiebervirus (ASFV), von dem vermutet wird, dass es das Virus befähigt, die Immunabwehr des Wirts zu unterwandern (Miskin et al., 1998).

2.4.1.2 Proteinphosphatase 2A

PP2A kontrolliert die Aktivität mehrerer wichtiger Proteinkinasefamilien wie Proteinkinase B (PKB/AKT), Proteinkinase C (PKC) und MAP-Kinasen. Sie ist bei der Regulation des Metabolismus, der Transkription, dem RNA-Splicen, der Translation, Differenzierung, dem Zellzyklus, onkogener Transformation, Apoptose und der Signaltransduktion beteiligt. PP2A ist essentiell für das Überleben einer Zelle und wird darum auf translationellem und post-translationellem Niveau durch Modifikation und Protein-Protein-Interaktion strikt reguliert (Lechward et al., 2001). Für die Aktivität von PP2A ist zudem ein Phosphotyrosyl-Phosphatase-Aktivator (PTPA) erforderlich (Fellner et al., 2003).

PP2A ist ein trimeres Protein (siehe Abbildung 9). Die 36 kDa große, katalytische Untereinheit (PP2Ac) bildet einen stabilen Komplex mit der 65 kDa großen, strukturellen Untereinheit PR65/A. Die Hauptaufgabe der A-Untereinheit besteht in der Assoziation mit einer weiteren regulatorischen B-Untereinheit, um das trimere Holoenzym zu bilden.

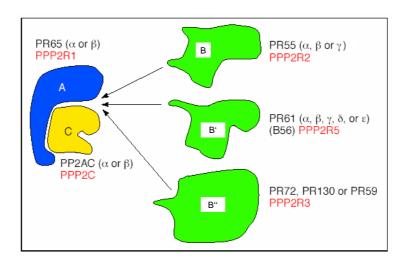


Abbildung 9: Aufbau der trimeren Proteinphosphatase 2A

Die katalytische Untereinheit C ist konstitutiv mit einer strukturellen Untereinheit A bzw. PR65 verbunden. Dieses Heterodimer kann weiterhin eine dritte regulatorische Untereinheit B binden. Die regulatorischen Untereinheiten werden in drei Subgruppen gegliedert, B, B' und B'', die jeweils mehrere Proteine und/oder deren Splicevarianten beinhalten. Die Gene der humanen PP2A-Untereinheiten sind rot gekennzeichnet. Nach: Millward et al., 1999

Von PP2Ac und PR65/A existieren jeweils zwei Isoformen, α und β. Durch Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit (an Y307) und Methylierung des Cterminalen L309 kann die Aktivität von PP2Ac moduliert werden.

Die variablen B-Untereinheiten werden in vier Familien klassifiziert: PR55/B, PR56/61/B', PR48/59/72/130/B" und PR93/PR110/B". Viele der B-Untereinheiten werden entwicklungsspezifisch oder gewebsspezifisch exprimiert. Damit beeinflusst die regulatorische Untereinheit die Substratspezifität und die subzelluläre Lokalisation des Holoenzyms. Insgesamt sind neben den Isoformen der A- und C-Untereinheiten über 20 verschiedene B-Untereinheiten identifiziert, womit theoretisch mehr als 50 verschiedene Holoenzyme gebildet werden können (Millward et al., 1999).

Da PP2A ein essentieller Regulator von Phosphorylierungskaskaden ist, ist sie auch ein ideales Ziel für die Intervention durch Viren, um ein für deren Überleben und Reproduktion geeignetes Umfeld zu schaffen (Millward et al., 1999). Es gibt einige virale Proteine, von denen bekannt ist, dass sie anstelle einer B-Untereinheit das Heteromer PP2A-C/PR65 binden, wie das *small*-t-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) und die *small*-und *middle*-t-Antigene des Polyomavirus (Pallas et al., 1990). Andere virale Proteine wie E4/orf4 des Adenovirus (Kleinberger and Shenk, 1993) oder NCp7 zusammen mit Vpr des HIV (Tung et al., 1997) binden das Holoenzym und beeinflussen dessen Aktivität.

PP2A wird von eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiert (Lechward et al., 2001). Auf translationeller Ebene unterliegt PP2Ac einem wirksamen autoregulatorischen Mechanismus, der die Proteinmenge auf einem konstanten Wert hält (Baharians and Schonthal, 1998). Abhängig vom Zelltyp macht die katalytische Untereinheit 0,3-1% des Gesamtzellproteins aus (Virshup, 2000). Die subzelluläre Lokalisation ist primär zytoplasmatisch, doch gibt es Berichte sowohl über nukleäre Lokalisation (Turowski et al., 1995) als auch einer Assoziation mit Mikrotubuli (Sontag et al., 1995) sowie Neurofilamenten im Zytoplasma (Saito et al., 1995).

Effiziente Inhibitoren von PP2A sind Okadainsäure (OA), Cantharidinsäure (Cant), Calyculin-A und Tautomycin. Alle PP2A-Inhibitoren inhibieren auch PP1 und andere PPPs, wie PP4 und PP5, jeweils mit leicht unterschiedlichen ICs.

Die IC₅₀ für die Inhibition von PP2A durch OA liegt bei ungefähr 1 nM. Im Vergleich dazu hat OA für PP1 eine IC₅₀ von 300 nM und die IC₅₀ von OA für CN liegt bei 4 μ M (Bialojan and Takai, 1988).

Gängige IC-Angaben beziehen sich jedoch auf Zellextrakte. Die Membrangängigkeit der einzelnen Inhibitoren ist eher schlecht untersucht. So wird in MCF7-Zellextrakten PP2A

bereits mit 3 nM OA innerhalb von 15 min inhibiert, intakte MCF7-Zellen dagegen benötigen beim Einsatz von 10 nM OA >48 Stunden für die PP2A-Inhibition (Favre et al., 1997).

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Tiere und primäre Zellen

Kaninchen (Chinchilla-Bastarde) für die Immunisierung lieferte Charles River.

Pekingenteneier für die Isolierung primärer Entenleberzellen wurden von GEPRO GmbH, Molbergen-Ermke bezogen.

Eine kleine Kolonie DHBV-positiver Enten (zwei Weibchen, ein Männchen) wurde durch Injektion von DHBV-positivem Entenserum (Isolat DHBV3) in die Beinvenen von 2 Tage alten Entenküken herangezogen. Die DHBV-Trägertiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE) gehalten.

3.1.2 Eukaryotische Zelllinien

LMH D2	Hühner-Hepatomzelllinie (Kawaguchi et al., 1987) Zelllinie, die durch stabile Transfektion von LMH-Zellen mit einem Überlängengenom von DHBV16 mit Start im präC unter CMV- Promotorkontrolle erzeugt wurde und infektöse DHBV-Virionen produziert (Condreay et al., 1990)
Hep G2	Humane Hepatoblastomzelllinie (Aden et al., 1979)
Hep G2.2.15	Zelllinie, die durch stabile Transfektion von HepG2-Zellen mit klonierter HBV-DNA erzeugt wurde und infektiöse HBV-Virionen produziert (Acs et al., 1987; Sells et al., 1987)
HuH7 HEK-293	Humane Hepatoblastomzelllinie (Nakabayashi et al., 1982) eine durch Transformation von primären humanen embryonalen Nierenzellen mit DNA des Adenovirus Typ 5 (Ad 5) entstandene Zellline (Graham et al., 1977)

3.1.3 Plasmide

pDHBV16	ein DHBV-Expressionsplasmid mit einem Überlängenkonstrukt
	von DHBV16 (Mandart et al., 1984), beginnend im präC bei
	nt 2519, Ende bei nt 2815, für die Produktion infektiöser Virionen,
	freundlichst zur Verfügung gestellt von Eberhardt Hildt,
	Universitätsklinikum Freiburg
pUC119-DHBV	ein DHBV-Expressionsplasmid mit einem Überlängenkonstrukt
	von DHBV16 (Mandart et al., 1984), beginnend im präC bei
	nt 2526, Ende bei nt 3021, in pUC119 (Summers et al., 1991)
pMa-D26	Doris Fernholz, 1992 – ein vollständiges DHBV26-Genom (EcoRI-
	EcoRI-Fragment) (Sprengel et al., 1991) in der EcoRI-Schnittstelle
	von pMa 5-8 (Stanssens et al., 1989)

über EcoRI in den Vektor pSP62-PL (Melton et al., 1984) pDHBV-3t kloniertes Dimer gleichsinnig orientierter Fragmente von DHBV3 (Sprengel et al., 1985; Sprengel et al., 1987) Expressionsplasmid für das DHBV3-Kapsidprotein (Shau-Feng prk5-DHBc Chang), der DHBc-Leserahmen (Isolat 3) wurde durch PCR amplifiziert und über die Restriktionsstellen NruI-NotI in den Vektor prk5 eingefügt ein Expressionsplasmid auf der Basis von pBR322 mit SRalphapBJ5 Promotor (Takebe et al., 1988) Expressionsplasmid für Calcineurin A - ein PCR-Fragment der pBJ5-CNA kodierenden Region der alpha-Isoform von CNA der Maus (Kincaid et al., 1990) wurde mit glatten Enden in die EcoRI-Stelle von pBJ5 kloniert, die kodierende Region ist N-terminal fusioniert mit einer HA-Sequenz (Clipstone et al., 1994) Expressionsplasmid für Calcineurin B - ein PCR-Fragment des pBJ5-CNB murinen CNB (Muramatsu et al., 1992) wurde mit glatten Enden in die EcoRI-Stelle von pBJ5 kloniert (Clipstone et al., 1994) Expressionsplasmid für eine konstitutiv aktive Mutante von pBJ5-CNmut Calcineurin A – ein PCR-Fragment des murinen CNA alpha 4 (Ende bei AS 395) wurde über XhoI – EcoRI in pBJ5 mit Nterminal fusionierter HA-Sequenz kloniert (Clipstone and Crabtree, 1993) pNFATc1 Expressionsplasmid für NFATc1 - ein PCR-Fragment des humanen NFATc1 Isoform A mit N-terminal fusionierter HA-Sequenz wurde über EcoRI - BamHI in den retroviralen Expressionsvektor pEGZ kloniert (Chuvpilo et al., 2002) Expressionsplasmid für NFATc2 ein PCR-Fragment des murinen pNFATc2 NFATc2 mit N-terminal fusionierter HA-Sequenz wurde über EcoRI - BamHI in den retroviralen Expressionsvektor pEGZ kloniert (Chuvpilo et al., 2002) Expressionsplasmid für grün fluoreszierendes NFAT - die **GFP-NFAT** kodierende Sequenz von humanem NFATc (Gene Bank Nr. U08015) wurde über BamHI - XbaI in den Vektor pS65T-C1 (Clontech) eingefügt, in dem das GFP-Fragment durch das SGFP-TYG-Fragment (synthetisches GFP) aus dem Vektor blue-SGFP-TYG-nosKS (J. Sheen, Harvard Medical School, Boston, MA) ersetzt worden war (Kehlenbach et al., 1998) Expressionsplasmid für Proteinphosphatase 2A - die cDNA von pBJ5-PP2Awt humaner PP2A alpha-Isoform mit N-terminal fusionierter HA-Sequenz aus pDE3-Cα HA2 (Evans et al., 1999) wurde über PSPOMI - EcoRI in die Restriktionsstellen NotI - EcoRI von pBJ5 Expressionsplasmid für dominant negative PP2A - die cDNA mit pBJ5-PP2Adn N-terminal fusionierter HA-Sequenz aus pDE3-2512 HA2 L199P (Evans et al., 1999) wurde über PSPOMI - EcoRI in die Restriktionsstellen NotI - EcoRI von pBJ5 kloniert pDsRed pSumo-GFP Expressionsvektor für ein Fusionsprotein aus Sumo-1 und GFP (Gostissa et al., 1999)

3.1.4 Oligonukleotide

DHBV-Primer: synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe

DHBV/CCCP1+

5' – GCG CTT TCC AAG ATA CTG GAG CCC AA – 3'

DHBV/CCCP2-

5' - CTG GAT GGG CCG TCA GCA GGA TTA TA - 3'

DHBV/CCCP3-

5' - CCC TGT GTA GTC TGC CAG AAG TCT TC - 3'

Primer für Phosphatasen, Intron-überspannend: synthetisiert von MWG, Ebersberg

PP2CB fw

5' - GAT AGT TTG CCT CTT GCT GCA C - 3'

PP3CB rev

5' - GAA GGG AAC CCT GTA GTT TGA C - 3'

PP3CA fw

5' – GCT GGA TAT TGA TGC GCC AGT C – 3'

PP3CA rev

5' - CTC TGG AGA CAA ACC ACC ATG C - 3'

PP2CA fw

5' – GCA TCA TGG ACG AGA AGG TGT TC – 3'

PP2CA rev

5' - CCC TCG AAG AAT GGT GAT GCG - 3'

weitere Primer: synthetisiert von MWG, Ebersberg

GAPDH fw

5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'

GAPDH rev

5' - TCCACCACCTGTTGCTGTA - 3'

3.1.5 Peptide

Die Phosphopeptide wurden von Dr. Jochen Heukeshofen am Heinrich-Pette-Institut (HPI) mit N-terminalem Cytein für die Kopplung synthetisiert.

Fra1 (S230): Cys – GRRRsKSRER

Fra2 (S232): Cys – GRRRSKsRER

Fra3 (T239): Cys – ERRAPtPQRA

Fra4 (S245): Cys – PQRAGsPLPRS

Fra5 (S257): Cys – SHHRsPSPRK

Fra6 (S259): Cys – SHHRSPsPRK

s = phosphoryliertes Serin

t = phosphoryliertes Threonin

Peptide ohne Phosphorylierung wurden im Labor von Dr. Peter Henklein in der Medizinischen Fakultät am Institut für Biochemie der Humboldt-Universität Berlin synthetisiert. Diese trugen ebenfalls ein N-terminales Cystein und eine C-terminale Histidin-Markierung.

HPI-3 (S230 und S232): Cys – GRRRSKSRERHHHHHHH HPI-4 (T239): Cys – ERRAPTPQRAHHHHHHH HPI-5 (S245): Cys – PQRAGSPLPRSHHHHHHH HPI-6 (S257 und S259): Cys – SHHRSPSPRKHHHHHHH

3.1.6 Enzyme

Benzonase Sigma-Aldrich, Deisenhofen

CIP – Kälberdarm Phosphatase NEB, Schwalbach

DNase I Sigma-Aldrich, Deisenhofen Kollagenase Sigma-Aldrich, Deisenhofen PfuTurbo DNA Polymerase Stratagene, La Jolla, USA Proteinase K Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Restriktionsendonukleasen NEB, Schwalbach T4-DNA-Ligase Roche, Mannheim

Taq DNA Polymerase MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.7 Antikörper

Erstantikörper

anti-DHBc (Kaninchen, polyklonal)

Antiserum gegen ein
Fusionsprotein aus N-

terminalen Sequenzen der Polymerase des Phagen MS2 und dem Kapsidprotein von DHBV3 ab der Nukleotid-

position 2989 entsprechend den

Aminosäuren 114-251 (Schneider et al., 1991)

anti-DHBc-ATG (Kaninchen, polyklonal)

Antiserum gegen die Gesamtsequenz von DHBc (Schneider

et al., 1991)

anti-DHBc (Kaninchen, polyklonal) freundlichst zur Verfügung

gestellt von Lucyna Cova, INSERM, Lyon, Frankreich Antiserum gegen die preS-

Region des großen Hüllprotein von DHBV, Doris Fernholz,

1993

anti-NFATc1 (K-18, Ziege, polyklonal) Santa Cruz, Santa Cruz, USA

ABR, Golden, USA

Sigma-Aldrich, Deisenhofen Chemicon, Hampshire, UK Santa Cruz, Santa Cruz, USA Chemicon, Hampshire, UK Abcam, Cambridgeshire, UK

Upstate, Lake Placid, USA

anti-NFAT1 (Maus, polyklonal) anti-NFAT1 (Maus, polyklonal) anti-Calcineurin (Kaninchen, polyklonal) anti-Calcineurin-Aα (C-20, Ziege, polyklonal) anti-Calcineurin PAN A (Kaninchen, polyklonal) anti-Calcineurin-B (Kaninchen, polyklonal)

anti-DHBpreS/KpnI (Kaninchen, polyklonal)

anti-PP2A (Kaninchen, polyklonal)

anti-Hsp70/Hsc70 (Kaninchen, polyklonal)

anti-GFP (Kaninchen, polyklonal)

anti-HA (Maus, monoklonal)

anti-β-Aktin (Maus, monoklonal)

anti-Cam5.2 (Maus, monoklonal)

Zweitantikörper

Esel-anti-Ziege Alexa Fluor 488 Esel-anti-Ziege Alexa Fluor 594

Esel-anti-Ziege-HRPO

Hoechst 33342

Kaninchen-anti-Maus-HRPO

Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 594

Ziege-anti-Kaninchen-HRPO Ziege-anti-Maus Alexa 488

Ziege-anti-Maus Alexa 594

Stressgen, Heidelberg

Santa Cruz, Santa Cruz, USA

Roche, Mannheim

Sigma-Aldrich, Deisenhofen Becton Dickinson, Heidelberg

Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Dianova, Hamburg Invitrogen, Karlsruhe Pierce, Rockford, USA Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Pierce, Rockford, USA Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe

3.1.8 Kits und fertige Lösungen

BigDye-Reagenz Bradford-Reagenz

cDNA Cycle Kit

DNA-Sondenmarkierung

System, dNTPs ECL

Duration Eosin

Filmentwicklerchemikalien

Freund'sches Adjuvans Complete Freund'sches Adjuvans Incomplete Glutathion Sepharose 4 FastFlow

Hämalaun

Kaiser's Gelatine

OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride)

Pansorbin Cells PCR Mastermix (2,5x)

Phosphoprotein-Aufreinigungs-Kit Plasmid Purification Maxi Kit

Proteinase-Inhibitor

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiashredder Columns RNeasy Mini Kit

Tissue-Tek O.C.T. TM Compound

Applied Biosystems, Darmstadt

Biorad, München Invitrogen, Karlsruhe

Readyprime Random Prime Labeling

Amersham Pharmacia, Freiburg

Promega, Madison, USA

Super Signal Dura West, Extended

Substrate, Pierce, Rockford, USA Sigma-Aldrich, Deisenhofen

PMA Bode, Hamburg

Sigma-Aldrich, Deisenhofen Sigma-Aldrich, Deisenhofen Amersham Pharmacia, Freiburg Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Merck, Darmstadt Eppendorf, Hamburg Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Invitrogen, Karlsruhe

Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden

Sakura Finetk, Zoeterwoude, NL

Transfektionsreagenzien

FuGENE 6 jetPEI Transpass MATra Boehringer, Mannheim Biomol, Hamburg NEB, Schwalbach IBA, Göttingen

Marker

Prestained Protein Marker Invitrogen, Karlsruhe 10 kDa-Marker Invitrogen, Karlsruhe

Smart Ladder DNA-Marker Eurogentec, Seraing, Frankreich

3.1.9 Chemikalien

Alle Medien und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage RO 35 TS-System von Millipore angesetzt und z.T. autoklaviert.

[α-³²P]dCTP Hartmann Analytic, Braunschweig Aceton Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Acrylamid Serva, Heidelberg
Agar Difco, Detroit, USA

Agarose Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Amidoschwarz Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS) Merck, Darmstadt
Ampicillin Boehringer, Mannheim
Bactotrypton Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau Merck, Darmstadt
BSA Behring, Marburg

Chaps Pierce, Rockford, USA
Chloroform Riedel-de Haën, Seelze
Coumarinsäure Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Cyclosporin A (CsA)

D-Glukose

Diethylether

Dinatriumhydrogenphosphat

Dithiothreitol (DTT)

Sigma, Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Essigsäure Riedel De-Haen, Seelze Ethanol Merck, Darmstadt Ethidiumbromid Roche, Mannheim Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Merck, Darmstadt Ficoll 400 Serva, Heidelberg

Frecht 400
Formaldehyd (37%)
Glutathion (reduziert)
Glycerin (87%)
Glyceringelatine, Kaiser's
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt

Glycin ICN Biochemicals, Aurora, USA Glykogen Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Hefeextrakt

HEPES

Merck, Darmstadt

Isopropanol

Isopropylthio-β-D-Galaktosid (IPTG)

Kaliumacetat

Kaliumchlorid

Difco, Detroit, USA

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid Merck, Darmstadt Kaliumhydroxid Merck, Darmstadt Kalziumchlorid Merck, Darmstadt

Keyhole Limpet Hemocyanin Calbiochem, Darmstadt

Luminol (3-Aminophtalhydrazid) Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Magnesiumchlorid Merck, Darmstadt Manganchlorid Merck. Darmstadt Methanol J.T.Baker, Deventer, NL MG132 Sigma, Deisenhofen **MOPS** Merck, Darmstadt N, N'-Methylen-Bisacrylamid Serva, Heidelberg N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Serva, Heidelberg Nariumdodecylsulfat (SDS) Serva, Heidelberg Natriumacetat Merck, Darmstadt Natriumacid Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Natriumchlorid Natriumdihydrogenphophat Merck, Darmstadt Natriumhydroxid Merck, Darmstadt Natriumkarbonat Merck, Darmstadt Natriumorthovanadat Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Natriumzitrat-Dihydrat Nonidet P-40 Sigma, Deisenhofen Norleucin Merck, Darmstadt N-succinimidyl-6-maleimidocaproate Fluka, Buchs, CH Sigma, Deisenhofen Okadainsäure

Phosphorus-32, [³²P] Hartmann Analytic, Braunschweig

Biomol, Hamburg

Polyethylenimin (PEI) Polysciences, Eppelheim Ponceau S Sigma, Deisenhofen Roche, Mannheim Proteaseinhibitoren (Complete) Rubidiumchlorid Merck, Darmstadt Salzsäure Merck, Darmstadt Silbernitrat Merck, Darmstadt Thiourea Fluka, Buchs, CH Trichloressigsäure Merck, Darmstadt

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) ICN Biochemicals, Aurora, USA

Triton X-100 Serva, Heidelberg
Trockenmilchpulver Bio-Rad, Hercules, USA
Tween 20 Serva, Heidelberg

Tweeli 20Sel Va, HeldelbergUreaFluka, Buchs, CHVelcadeJanssen-Cilag, NeussWasserstoffperoxid (H2O2)Merck, DarmstadtXylenzyanolMerck, DarmstadtZitronensäureMerck, Darmstadtβ-MercaptoethanolMerck, Darmstadt

3.1.10 Kulturmedien und Zellkulturchemikalien

Phenol

Antifect Liquid Schülke und Mayr, Norderstedt

Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma, Deisenhofen

DMEM F12 Mix Gibco BRL Lifetechnologies Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Gibco BRL Lifetechnologies

Fötales Kälberserum (FCS)

Biochrom, Berlin

Glutamin Gibco BRL Lifetechnologies

Heparin-Natrium (10 000 IE/ml) Braun, Melsungen

HEPES Gibco BRL Lifetechnologies

Hydrocortisol Sigma, Deisenhofen Insulin Sigma, Deisenhofen

Penicillin Gibco BRL Lifetechnologies Streptomycin Gibco BRL Lifetechnologies

Trypanblau Sigma, Deisenhofen

Williams' Medium E Gibco BRL Lifetechnologies

3.1.11 Verbrauchsmaterial

3 MM Whatmanpapier Schleicher & Schüll, Dassel

Gewebekulturschalen und Flaschen Becton und Dickinson, Heidelberg

Kanülen (21 G x ½ " Gr. 1) Braun, Melsungen

Kryoröhrchen Nunc, Roskilde, Dänemark Latexhandschuhe Kimberly-Clark, Roswell, USA

Mikroskopische Deckgläser Sigma, Deisenhofen

NICK Column Pharmacia Biotech, Freiburg Nitrozellulose-Membran Hybond N Amersham Pharmacia, Freiburg

Nunc MaxiSorb ELISA-Platten Nunc, Roskilde, Dk Objektträger Sigma, Deisenhofen

Pipettenspitzen, steril Eppendorf, Hamburg Protran-Membran Schleicher & Schüll, Dassel

PVDF-Membran Amersham Biosciences, München

Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg

Röntgenfilm Kodak X-Omat Xar25 Eastman Kodak, Rochester, USA Sephadex-G25-Säulen Amersham Pharmacia, Freiburg

Spritzen (Omnifix – F1ml)
Sterilfilter Nalgene 0,45 μm
Sartorius, Göttingen

Zentrifugenröhrchen Becton und Dickinson, Heidelberg

3.1.12 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern PeqLab Biotechnology, Erlangen Brutgerät Bruja BRUTMASCHINEN-Janeschitz

GmbH, Hammelburg

Digitalkamera (Quantix)

Roper Scientifix Inc., USA

Elektrophorese Stromgeräte Pharmacia Biotec, Freiburg, Biometra,

Göttingen

ELISA-Gerät MWG-Biotech, Ebersberg Filmentwickler Agfa Curix 60 PMA Bode, Hamburg

Filmentwickler Agfa Curix 60 PMA Bode, Hamburg Fluoreszenzmikroskop Zeiss, Jena

Fluor-S Multiimager Biorad, Hercules, USA

Glaswaren Schott, Mainz

Gradientenmischer H. Hölzel, Dorfen

Guldner Vario Perpex II Werner Meyer Luzern, Zürich Hybridisierungsofen (Hybrid 2000) Reutlinger, Reutlingen

Kulturenschüttler Innova 4230 New Brunswick Scientific, USA

Magnetrührer Ikamag Reo, Japan

Mikroskope Olympus, Japan

Neubauer Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025mm² Marienfeld, Lauda-Königshofen

Objektive Nikon, Japan

Phosphoimager (Bas 2500) Raytest, Straubenhardt

Materialien und Methoden

Photometer 3.000 pro

Photosystem für Agarosegelaufnahmen

Pipetten Pipettierhilfe Präzisionswaage

RoboCycler Gradient 40

Scanner

SDS-PAGE-Apparatur Semi-Dry-Transfer-Apparatur

Slot-Blot-Apparatur Thermo-Mixer Tisch-Zentrifugen Ultraschallgerät

Ultraschallgerat

Ultrazentrifuge

UV-Photometer Ultraspec 3000 pro Vakuumsaugsystem (BVC21, Zellkultur)

Vertikalelektrophorese System

Vortexer

Waage Wasserbad Pharmacia, Freiburg BioSciTec, Frankfurt/Main

Eppendorf, Hamburg Greiner, Frickenhausen Sartorius, Göttingen Stratagene, La Jolla, USA

Stratagene, La Jolla, USA Epson, Meerbusch Amersham, Freiburg Biorad, Hercules, USA Schleicher & Schüll, Dassel

Eppendorf, Hamburg Eppendorf Hamburg

Dr. Hielscher GmbH, Stuttgard

Beckmann, Hamburg

Amersham Pharmacia, Freiburg Greifenberger Antriebstechnik GmbH Bethesda Research, Gaithersburg, MD,

USA

Ika-Works, Wilmington, USA

Sartorius, Göttingen GFL, Burgwedel

3.1.13 Computerprogramme

Adobe Acrobat Adobe, USA

Bas Read Isotopengeräte GmbH, D

EndNote Thomson ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA

Office Microsoft, USA
Open Lab Improvision, GB
pDraw32 www.acaclone.com
Vector NTI 9 Invitrogen, Karlsruhe
Gelscan V5.1 BioSciTec, Frankfurt/Main

Adobe Photoshop 7.1 Adobe, USA

Tina 2.09d Isotopengeräte GmbH, D

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterien und Plasmide

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde der Bakterienstamm E.coli DH5α verwendet,

Genotyp: E.coli F O- recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+), Δ (lacZYA-argF) U169F80d

lacZDM15 supE44 thi-1 gyrA96 relA1

Hersteller: Life Technologies

3.2.1.1 Glycerin-Kulturen

Zu einer Kultur von Bakterien wurde 1 Vol. 60% Glycerin in Wasser (sterilfiltriert) zugefügt und gut vermischt. Die Glycerin-Kulturen wurden bei -80°C eingefroren und gelagert.

3.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Ein Aliquot *E.coli* DH5α oder BL21 aus einer Glycerinkultur wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Übernachtkultur in 3 ml LB-Medium gezogen. Am nächsten Tag wurden 500 ml LB-Medium mit 0,02 M MgSO₄ und 0,01 M KCl versetzt und mit 1 ml der Übernachtkultur angeimpft. Dann wurde die Kultur so lange unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis eine OD von 0,6-0,8 bei 600 nm Wellenlänge erreicht war. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und dann 5 min bei 5000 rpm und 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml kaltem TFB I resuspendiert, mit 140 ml TFB I aufgefüllt und 20 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien wieder 5 min bei 3000 rpm und 4°C pelletiert und das Bakterienpellet in 20 ml kaltem TFB II resuspendiert. Aliquots hiervon wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Lösungen:

	TFB I –	TFB II –
	pH 5,8 mit Essigsäure	pH 6,5 mit KOH
RbCl ₂	100 mM	10 mM
MnCl ₂	50 mM	-
CaCl ₂	10 mM	75 mM
MOPS	-	10 mM
KOAc	30 mM	-
Glycerin 86%	15%	15%

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert.

3.2.1.3 Transformation

Chemisch kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Jeweils 100 µl der Bakterienkultur wurden dann mit einem Aliquot einer Ligation (3.2.5.5) oder 10 ng bis 1 µg Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 42°C für 90 sek, der zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien führte, dann erneut eine Inkubation für 5 min auf Eis. Die Transformationsansätze wurden jeweils zu 1 ml LB-Medium zugefügt und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, wobei sich die Resistenz auf der Grundlage inkorporierter Plasmide aufbaut. Anschließend wurden Aliquots der Transformation auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Klone wurden daraufhin für die Mini- oder Maxipräparation herangezogen.

3.2.1.4 DNA-Plasmidpräparation (Miniformat)

Die Minipräparation ist eine schnelle Methode der Anzucht transformierter Bakterien und der Isolation der in ihr vermehrten Plasmid-DNA in kleinem Maßstab. Sie wird benutzt, um schnell Klone mit den gewünschten Eigenschaften aus einer Vielzahl von Kolonien herauszufinden. Für die Minipräparation wurden die Kit-Komponenten des Qiagen Maxi-Kits für Plasmidpräparationen im Midi- oder Maxi-Format mit verändertem Protokoll verwendet.

Je eine Bakterienkolonie transformierter *E.coli* DH5α wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in 2 ml LB-Selektionsmedium in ein Reagenzröhrchen übertragen. Die Anzucht erfolgte bei 37°C im Schüttler über Nacht. Dann wurden 1,5 ml der Kultur in jeweils ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien 5 min bei 13 000 rpm pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 μl P1 resuspendiert, 200 μl Lysepuffer P2 zugefügt und durch Schwenken gemischt. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 μl Neutralisierungspuffer P3 zugefügt, gemischt und der Ansatz für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde er 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der geklärte Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde mit 1 ml absolutem Ethanol für 10 min bei -80°C gefällt, 15 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 50 μl destillierten Wassers aufgenommen und konnte dann durch Restriktionsverdau (3.2.5.2) weiter analysiert werden.

3.2.1.5 DNA-Plasmidpräparation (Maxiformat)

Die Maxipräparation diente der Isolierung von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad aus Bakterienkulturen, wie sie für Transfektionen benötigt wurden. Es wurde das Maxi-Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA an Anionen-Austauscher-Säulen, von denen sie durch Hochsalzpuffer eluiert und anschließend durch Isopropanolfällung gereinigt und konzentriert wird.

300 ml selektives LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde in 15 min bei 6000 g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml P1 resuspendiert. Dann wurden 10 ml Lysepuffer P2 zugegeben und 5 min geschwenkt, bis die Flüssigkeit aufklarte. Daraufhin wurden 10 ml Neutralisierungspuffer P3 zugegeben, durch Schwenken gemischt und der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Das weiße Präzipitat aus genomischer DNA, Proteinen und Zelldebris wurde bei 20 000 g für 30 min pelletiert. Bei Bedarf wurde die Zentrifugation wiederholt. Eine Qiagen-tip 500-Säule wurde mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert, dann die Säule mit dem klaren Überstand aus der Zentrifugation befüllt. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zweimal mit jeweils 30 ml Waschpuffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmidfraktion erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Das Eluat wurde zur Präzipitation der DNA mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und sofort für 30 min bei 15 000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde noch zwei Mal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 300 bis 600 µl destillierten Wassers aufgenommen. Anhand der photometrischen Vermessung der DNA-Konzentration wurde ein Wert von circa 1 µg/µl eingestellt.

Medien: alle Medien für die Bakterienkultur wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

- LB-Medium: 1% Bactotrypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl (w/v)
- Selektionsmedium: 50 µg Ampicillin/ml LB-Medium
- LB-Agar für Selektionsplatten: 1,5% Agar in LB-Medium, Zugabe von 50 μg Ampicillin/ml direkt vor dem Gießen von Platten

3.2.2 Zellkulturtechniken

3.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden an einer Sterilbank der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in sterilen Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂.

3.2.2.2 Die Haltung eukaryotischer Zelllinien

Die humanen Hepatomzelllinien HuH7, HepG2 und HepG2.2.15 sowie die humane Nierenzelllinie HEK-293 wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin gehalten.

Die Haltung der Hühnerhepatomzelllinien LMH und D2 erfolgte in DMEM-F12 Mix mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin. Die Zellen für die Stammhaltung wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 geteilt. Hierfür wurde der Zellrasen für maximal 5 min mit Trypsin-Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend durch Klopfen von der Kulturflasche gelöst. Die Zellen wurden durch Pipettieren in dem entsprechenden Wachstumsmedium suspendiert und auf neue Flaschen verteilt.

Für Transfektionsexperimente wurde eine definierte Zellzahl ausgesät. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde ein Aliquot der suspendierten Zellen mit Trypanblau vermischt. Trypanblau dringt nur in tote Zellen ein. Anschließend konnte in einer Neubauer-Zählkammer die Zahl lebender Zellen bestimmt und ein der gewünschten Zellzahl entsprechendes Volumen ausgesät werden.

Die Formel zur Bestimmung der Zellzahl in der verwendeten Neubauer-Kammer lautet:

 $Zellen/ml = Zellzahl \times 10^4 \times Verdünnungsfaktor$

Zur längerfristigen Lagerung wurden Zelllinien in Stickstoff eingefroren. Hierfür wurde der dicht gewachsene Zellrasen einer 75 ml-Flasche trypsiniert und die Zellen durch niedrigtourige Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und sofort in Kryoröhrchen eingefroren. Nach 3 h bei -20°C wurden die Zellen in -70°C und einen Tag darauf in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium:

0,5% FCS, 1% DMSO in DMEM bzw. DMEM-F12 Mix

Das Auftauen von in Stickstoff gefrorenen Zellen erfolgte schnell bei 37°C, woraufhin sie sofort in 5 ml Medium suspendiert, durch niedrigtourige Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) pelletiert und mit frischem Medium in Flaschen ausgesät wurden.

3.2.2.3 Die Präparation und Kultur primärer Leberzellkulturen der fötalen Ente Herkunft und Bebrütung der Eier

Befruchtete Pekingenteneier wurden von der Firma GEPRO GmbH – Geflügelzucht – in Molbergen-Ermke bezogen. Nach Ankunft der unbebrüteten Eier wurden diese noch für maximal weitere 3 Wochen bei 4°C unter Luftabschluss bis zur Verwendung gelagert. Zur Bebrütung wurden die Eier in einen Brutschrank mit 37°C und konstanter Luftfeuchtigkeit von 60% überführt und dort für 21 Tage inkubiert. Mithilfe einer speziellen Lampe konnten ab dem 10. Bebrütungstag durch sogenanntes "Schieren" erste Blutgefäße sichtbar gemacht und Eier, in denen sich keine Kücken entwickelten, aussortiert werden.

Die Eier der eigenen DHBV-positiven Enten wurden genau wie die von GEPRO bezogenen behandelt, jedoch speziell gekennzeichnet.

Präparation der Entenlebern

Generell wurden Präparation und Infektion von PDLCs nach Angaben von J. Köck (Köck and Schlicht, 1993) und M. Bruns (Bruns et al., 1998) durchgeführt.

Bebrütete Enteneier wurden mit Ethanol von außen desinfiziert und die Schale mit einer kleinen Schere etwa 2 cm unterhalb des stumpfen Endes durchstochen. Anschließend konnte ein Deckel abgeschnitten werden, der das Ei weit genug öffnete, um den Entenfötus mithilfe einer Pinzette herauszuheben. Der Fetus wurde in eine sterile Petrischale verbracht und sofort dekapitiert. Austretendes Blut wurde für einen Serumtest auf DHBV-Infektion (siehe unten) eingesammelt. Dieser war notwendig, da DHBV in allen Entenpopulationen verbreitet ist und sich auch unter den von GEPRO bezogenen Eiern kongenital infizierte befanden. Dann wurden die Federn der Bauchseite entfernt und ein kleiner horizontaler Schnitt oberhalb der Kloake durch die Bauchdecke geführt. Von dieser Öffnung aus wurden zwei weitere V-förmige Schnitte rechts und links des Abdomens gesetzt, die das Hochklappen der gesamten Bauchdecke ermöglichten und die inneren Organe freilegten. Die Leberlappen wurden herausgeschnitten und in einer separaten Petrischale mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Die Leber wurde darauf hin sofort in Kollagenaselösung (0,5% Kollagenase in Williams' Medium E, steril filtriert) verbracht und darin bei 30°C für 1 h mit gelegentlichem Schütteln verdaut.

Um Kontaminationen und Infektionen während der Präparation zu vermeiden, wurde jedes Ei auf einer neuen, sauberen Unterlage geöffnet, für jeden Fötus und dessen Leber eine neue, sterile Petrischale verwendet und das Sezierbesteck nach jeder Sektion durch Abflammen mit Ethanol desinfiziert.

Aufarbeitung der Entenleberzellen für die Zellkultur

Nach dem Kollagenaseverdau wurden die Leberzellen durch niedrigtourige Zentrifugation von 800 rpm in 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit jeweils 5 ml Williams' Medium E (WE) gewaschen und anschließend in WE-komplett (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 mM Glutamin, 1 nM Insulin, 10 µM Hydrocortison, 15 mM Hepes [pH 7,2], 1,5% DMSO) aufgenommen. In der Regel wurde an diesem Punkt das Ergebnis des Serumtests abgewartet, bevor negative und positive Entenzellen mehrerer Lebern jeweils gemischt und ausgesät wurden. Auf diese Weise wurden Kulturen primärer Entenleberzellen (engl.: primary duck liver cells, PDLCs) erhalten. Da der auf 1 h beschränkte Kollagenaseverdau keine für die mikroskopische Auszählung ausreichende Vereinzelung der Zellen verursacht, ein längerer Verdau jedoch die Infektion verhindert, wurde die erforderliche Dichte der Zellaussaat anhand einer einmaligen Beispielzählung geschätzt. Wurden die Zellen einer Entenleber je nach Größe auf zwei bis drei 6-Loch-Platten verteilt, so wurde von einer Zellzahl von circa 1x106 pro Loch ausgegangen. In eine 75 cm²-Zellkulturflasche wurde 2/3 einer Leber ausgesät.

Markierung von LSECs mit acetyliertem LDL

Acetyliertes Lipoprotein niedriger Dichte (engl.: acetylated low density lipoprotein, acLDL) wird spezifisch von LSECs und etwas schwächer von Makrophagen aufgenommen. Um LSECs in der Entenleberzellkultur sichtbar zu machen, wurden pro Loch einer 12-Loch-Platte 2 μl fluoreszenzmarkiertes acLDL direkt in das Medium gemischt. Die Zellen wurden dann 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen gewaschen, und markierte Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden. Die Signale der acLDL-Markierung waren auch nach einer anschließenden Immunzytochemie noch sichtbar.

Einfrieren von Entenlebern und Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die Kryokonservierung wurden die herauspräparierten Leberlappen einer fötalen Ente kurz in PBS gespült und dann in Tissue-Tek OCT-Compound eingebettet. Die

eingebetteten Lebern wurden langsam in flüssigem Stickstoff getaucht, bis das Einbettmedium vollständig weiß war, und dann bei -80°C gelagert.

Die Anfertigung der Gefrierschnitte für die Immunhistochemie erfolgte mithilfe eines Kryotoms von Leica. Die eingebetteten Lebern wurden auf eine Temperatur von -20°C erwärmt und auf dem Sockel des Kryotoms mit Tissue-Tek befestigt. Bei einer Kammertemperatur von -18°C und einer Objekttemperatur von -12°C wurden Dünnschnitte von 5 μm oder 10 μm angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden kurz luftgetrocknet und dann kurz in Aceton anfixiert. Bis zur Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

3.2.2.4 Ernte von Zellen

Sollten Zellen als Pellet geerntet werden, wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers in etwas PBS von der Kulturschale gelöst, vereinzelt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch niedrigtourige Zentrifugation bei 3000 rpm wurden die Zellen pelletiert und nochmals mit PBS gewaschen, wobei die Zellzahl eines Lochs auf mehrere Aliquots aufgeteilt werden konnte. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen entweder sofort in dem gewünschten Puffer lysiert oder bei -20°C gelagert.

3.2.2.5 Transfektion

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen diente der Einbringung und Expression von Transgenen in Form von Plasmid-DNA.

Lipofektion

Die Lipofektion ist eine Transfektionsmethode, bei der negativ geladene DNA-Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkung an kationische Lipide binden. Es bildet sich ein DNA-Liposomen-Komplex, welcher mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran fusioniert. Die DNA gelangt so ins Zellinnere und schließlich in den Zellkern, wo sie transkribiert wird. Mit dieser Methode erreicht man für viele Zelllinien eine höhere Transfektionseffizienz als mit der Kalziumphosphatpräzipitation.

Zum Einsatz kam FuGENE 6, eine Mischung aus verschiedenen Lipiden. Nach den Angaben des Herstellers wurden FuGENE 6 und die Plasmid-DNA im Verhältnis 3:1 in serumfreiem Medium gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte 16 h später.

Transfektion mithilfe kationischer Polymere

Eine Klasse von Polymertransfektionsreagenzien stellen Polyethylenimin (PEI) und seine Konjugate, lineares PEI oder auch Chitosan dar. Sie haben eine hohe, einheitliche, positive Ladungsdichte und sind fähig, die DNA zu kondensieren und in eine Vielzahl von Zellen einzubringen. Im Gegensatz zu kationischen Lipiden können gewisse synthetische Polymere die DNA im Zytoplasma schützen und sind bekannt dafür, den Eintritt in den Kern zu fördern. Als Transfektionsreagenz kam jetPEI, ein lineares Polyethylenimin, zum Einsatz. Es wurde beobachtet, dass mit diesem Reagenz vor allem bei HuH7-Zellen die Transfektionseffizienz höher war als mit kationischen Lipiden. JetPEI kompaktiert DNA in positiv geladene Partikel, die mit den anionischen Proteoglykanen der Zelloberfläche interagieren und durch Endozytose in die Zelle gelangen. Zugleich puffert jetPEI den endosomalen pH-Wert und schützt die DNA damit vor Degradation. Ein kontinuierlicher Protoneneinstrom führt schließlich zum Platzen der Endosomen und zur Freisetzung der DNA-Partikel.

Nach den Angaben des Herstellers wurden die zu transfizierenden Zellen am Vortag so angesetzt, dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50-60% erreicht war. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. DNA und jetPEI wurden im vom Hersteller empfohlenen Verhältnis N/P = 5 separat in 150 mM NaCl verdünnt. Das N/P-Verhältnis beschreibt die Anzahl an Stickstoff-Resten des jetPEI pro DNA-Phosphat nach der folgenden Formel.

$$\mu l \ jetPEI = \frac{(\mu g \ DNA \times 3) \times N / P - Verhältnis}{7,5}$$

Die jetPEI-Lösung wurde zur DNA-Lösung gegeben, kräftig gemischt und der Ansatz 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken im Medium verteilt. 16 h nach der Transfektion erfolgte wieder ein Mediumwechsel.

Es stellte sich heraus, dass die Transfektion von HuH7-Zellen mit Plasmid-DNA in einer Lösung mit linearem Polyethylenimine (PEI) allein fast ebenso effektiv ist, wie die Transfektion mit jetPEI. Hierfür wurde 1 mg/ml PEI in heißem Wasser gelöst und steril filtriert. DNA und PEI-Lösung wurden in einem Verhältnis von 1μg zu 6 μl in serumfreiem Medium gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte 16 h nach der Transfektion.

Produktion von Viruspartikeln durch Transfektion von HuH7-Zellen

Die Transfektion von HuH7-Zellen für die Produktion von Viruspartikeln erfolgte mit jetPEI bzw. PEI einen Tag nach der Zellaussaat. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt. Am darauf folgenden Tag wurde ein zweiter Mediumwechsel durchgeführt. Dieses Medium enthielt Glutamin, Penicillin und Streptomycin, wie das Komplettmedium, aber kein FCS. Die Zellen wurden weitere 3 Tage in diesem Medium kultiviert, bevor sowohl das Medium als auch die Zellen für weitere Analysen geerntet wurden.

Andere Transfektionsreagenzien im Einsatz

Um die Transfektionseffizienz auf primären Leberzellen der fötalen Ente zu optimieren, kamen noch folgende andere Transfektionsreagenzien nach den Angaben der Hersteller zur Anwendung: MATra-A Reagenz (Magnettransfektion), TransPass (Lipofektion) und jetPEI Gal, Man und RGD (Polymere).

3.2.2.6 Radioaktive Markierung von Zellen

Die Markierung von Zellen mit radioaktivem Phosphor dient dazu, Phosphovarianten von Proteinen (hier DHBc) nach Immunpräzipitation ohne die Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern darstellen zu können.

HuH7-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit phosphatfreiem Medium gewaschen und weiterhin in phosphatfreiem Medium kultiviert, wobei in eine 10 cm-Schale jeweils 3 mCi radioaktive Phosphorsäure (Phosphorus-32) zugegeben wurde. Nach einer Über-Nacht-Inkubation, während der der Einbau des radioaktiven Phosphats in die Phosphoproteine erfolgt, wurden die Zellen gewaschen, durch Abschaben geerntet und für die Immunpräzipitation lysiert.

3.2.3 Ultrazentrifugation

Für die Pelletierung von DHBV wurden durch niedrigtourige Zentrifugation von Zelldebris befreite Zellmedien von DHBV-positiven PDLCs, D2-Zellen oder transfizierten HuH7-Zellen verwendet. Je nach Volumen der Medien kamen verschiedene Rotoren zum Einsatz. Die entsprechenden Zentrifugenröhrchen wurden gefüllt und genau austariert, bevor der Rotor beladen und die Zentrifugation gestartet wurde.

Die Ultrazentrifugation erfolgte:

im SW55 (r = 10,73 cm) 50 000 rpm ~ 300 000 g für 1 h,

im SW41 (r = 15,31 cm) 38 000 rpm ~ 250 000 g für 1 h,

im SW 28 (r = 17,13 cm) 25 000 rpm ~ 120 000 g für mindestens 4 h.

Die Berechnung der g-Zahl erfolgte dabei wie folgt.

Die Zentrifugalbeschleunigung b_z (in cm / sek²) beträgt:

$$b_z = \omega^2 r = \frac{4 \cdot \pi^2}{60^2} N^2 r$$

Die Erdbeschleunigung be beträgt:

 $b_e = 981 \text{ cm/sek}^2$

Daher:

$$g = b_z/b_e = \frac{4\pi^2}{60^2 \cdot 981} N^2 r = 11,18 \cdot 10^{-6} N^2 r$$

wobei:

N in Umdrehungen / min,

r in cm bis zum am weitesten außen liegenden Punkt der Becher.

Die g-Zahl gibt an, um wieviel die Zentrifugalbeschleunigung im Becher eines Rotors bei gegebener Drehzahl größer ist als die Erdbeschleunigung.

3.2.4 RNA-Techniken

3.2.4.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Die Extraktion zellulärer Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen nach dem Herstellerprotokoll. Es wurden 1x10⁷ Zellen in 600 μl Puffer RTL lysiert und dieses Lysat durch zweiminütige Zentrifugation in einer Qiashredder-Säule homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit einem Volumen 70%igem Ethanol versetzt und auf eine RNeasy Mini Spin Säule aufgegeben. Die Bindung der RNA erfolgt durch kurze Zentrifugation bei 8000 g. Dann wurde mit 700 μl Puffer RW1 durch kurze Zentrifugation bei 8000 g vorgewaschen. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 700 μl Puffer RPE durch kurze Zentrifugation bei 8000 g gewaschen und die RNA mit 50 μl RNase-freiem ddH₂O durch Zentrifugation von 1 min bei 8000 g eluiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

3.2.4.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA eukaryotischer Zellen kam der cDNA Cycle® Kit von Invitrogen unter Verwendung von Random-Primern (einem Gemisch aus Hexanukleotiden unterschiedlicher Sequenz) zum Einsatz. Nach den Angaben des Herstellers wurden 2 μg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 11,5 μl RNasefreiem ddH₂O mit 1 μl Primern versetzt. Um Sekundärstrukturen der RNA zu entfernen, wurde der Ansatz für 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 1 μl RNase-Inhibitor, 4 μl 5x Reaktionspuffer, 1 μl 100 mM dNPTs, 1 μl 80 mM Natriumpyrophosphat und 0,5 μl AMV reverse Transkriptase zugefügt. Die Reaktion wurde für 1 h bei 42°C inkubiert und anschließend für 2 min auf 95°C erhitzt, um RNA-cDNA-Hybride zu denaturieren. Danach wurde die cDNA nach Anweisung des Herstellers mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Anschließend wurden die Proben bis zur PCR bei -80°C gelagert.

3.2.5 DNA-Techniken

3.2.5.1 Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA- oder RNA-haltigen Lösungen erfolgte in einem UV-Photometer bei der Wellenlänge von 260 nm. Zusätzlich wurden die Proben auch bei 280 nm vermessen, um die Reinheit zu bestimmen. Während Nukleinsäuren vorwiegend bei 260 nm adsorbieren, adsorbieren Proteine hauptsächlich bei 280 nm. Ein Faktor von $A_{260/280} = 1,7-2,0$ zeigt reine Nukleinsäureaufbereitungen an.

Für die Berechnung der Konzentration wird für DNA ein Umrechnungsfaktor (UF) von 50 angesetzt und für RNA ein UF von 40:

Konzentration ($\mu g/\mu l$) = Adsorption (OD₂₆₀) x UF x Verdünnungsfaktor

3.2.5.2 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Mittels Restriktionsendonukleaseverdaus kann DNA spezifisch gespalten werden. Es werden Enzyme eingesetzt, die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und die DNA-Doppelhelix an vorhersagbaren Stellen schneiden.

Der Ansatz eines Verdaus beinhaltete gewöhnlich 1-5 µg DNA, Restriktionsenzyme bis zu einem Höchstanteil von 10% und einen geeigneten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20-50 µl. Die Reaktionen wurden 1-2 h bei 37°C inkubiert und die erhaltenen Fragmente anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Verdau von pMAD-26 zur Herstellung von viraler Marker-DNA für den Southern Blot

Bei pMAD-26 handelt es sich um ein Plasmid, welches ein Monomer des DHBV-Genoms (Subtyp 26) enthält. Der Verdau mit EcoRI liefert ein Gesamt-DHBV-Genom von 3024 bp und den Vektor pMA. Der Verdau mit HindIII liefert DHBV-Genomfragmente der Größen 1713 bp, 1079 bp und 244 bp. Je 2 μg Plasmid-DNA wurde einzeln für 1 h bei 37°C mit jeweils EcoRI oder HindIII verdaut. Anschließend wurden die Enzyme für 10 min bei 65°C inaktiviert. Für eine gleichmäßige Verteilung der Bandenintensitäten wurden die Produkte im Verhältnis 1:2 gemischt. Der fertige Virusmarker wurde bei -20°C gelagert.

3.2.5.3 Agarosegel-Elektrophorese

In Agarosegelen kann man DNA ihrer Größe nach auftrennen. Die negativ geladene DNA wandert dabei zur Anode.

Es wurden 1%ige Agarosegele mit TAE-Puffer und Ethidiumbromid verwendet. Während der Wanderung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld interkaliert Ethidiumbromid aus dem Gel in die doppelsträngige DNA. So können Nukleinsäuren ab einer bestimmten Menge im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für die Größenbestimmung wurde ein DNA-Marker (Smart Ladder) parallel aufgetragen. Dieser enthielt DNA-Fragmente von 200 bp bis 10 000 bp.

TAE-Puffer: 50 mM Tris, 20 mM NaAc, 18 mM NaCl₂, 2 mM EDTA, pH 8,0

3.2.5.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Restriktionsverdau

Der erste Schritt für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Restriktionsverdau war eine Agarosegel-Elektrophorese. Die gewünschten Fragmente wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten. Sie wurden mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach den Angaben des Herstellers aus der Agarose eluiert. Hierfür wurde das Gelstück mit dem dreifachen Volumen an Puffer QG bei 50°C für 10 min unter häufigem Schütteln inkubiert, bis das Gel geschmolzen war. Anschließen wurde 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde dann auf eine QIAquick-Säule pipettiert und für 1 min zentrifugiert. Salze und Verunreinigungen wurden durch einmaliges Waschen mit 750 μl Puffer PE entfernt und die DNA mit 50 μl ddH₂O eluiert. Die gereinigte DNA wurde in Ligationen eingesetzt.

3.2.5.5 Ligation

Eine beliebige lineare DNA kann mit einem zweiten DNA-Fragment ligiert werden, wenn je zwei zu verbindende Enden mit dem gleichen Restriktionsenzym für überhängende Enden oder glatt geschnitten bzw. entsprechend präpariert worden sind.

Für die Ligation von DNA bei der Klonierung von Plasmiden kam die T4-DNA-Ligase zum Einsatz. Nach den Angaben des Herstellers wurden die DNA-Fragmente im Verhältnis Vektor/Insert = 1/5 mit 1 U T4-DNA-Ligase, Ligationspuffer und Wasser zu einem 30 μl Ansatz vereinigt und bei 16°C über Nacht inkubiert. Ein Teil der Ligationsreaktionen wurde direkt für die Transformation von Bakterien eingesetzt (Kap. 3.2.1.3.).

3.2.5.6 Isolierung von viraler DNA aus dem Zytoplasma

Die Hälfte der Zellen eines Lochs einer 6-Loch-Zellkulturschale wurden in 500 μl NP40-Lyse-Puffer (50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% NP40) lysiert. Dabei blieben die Zellkerne intakt und konnten mit weiterem unlöslichen Zelldebris in 5 min bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert werden. Dem Überstand wurden 200 μg/ml DNaseI und 20 mM MgCl₂ zugefügt. Dann wurde er für 30 min bei 37°C inkubiert, um Input-DNA aus der vorangegangenen Transfektion zu zerstören. Die DNaseI wurde anschließend durch Zugabe von 50 mM EDTA inhibiert. Dann wurden 200 μg/ml Proteinase K sowie 1,4% SDS zugegeben und die Lysate für 2 h bei 56°C verdaut, um virale DNA aus Nukleokapsiden frei zu setzen.

Die Extraktion der DNA erfolgte mit Phenol-Chloroform. Dazu wurden die verdauten Lysate mit 1 Volumen Phenol versetzt, kräftig geschüttelt und kurz abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 1 Volumen Phenol:Chloroform (1:1) versetzt, kräftig geschüttelt und kurz abzentrifugiert. Dann wurde die obere wässrige Phase mit 1 Volumen Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und kurz abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 μl Glykogen versetzt und mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol aufgefüllt. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht. Die Präzipitate konnten daraufhin in 30 min bei 13 000 rpm und 4°C pelletiert werden. Die luftgetrockneten Pellets wurden in 15 μl TE aufgenommen und für die Auftrennung im Agarosegel mit 3 μl Stop-Puffer versetzt.

Lösungen:

Stop-Puffer: 4 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Xylenzyanol, 250 mg/ml Ficoll 400

TE: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

3.2.5.7 Isolierung viraler DNA von Virionen aus Zellüberständen

Aus 4 ml der Überstände transfizierter HuH7-Zellen wurden durch Ultrazentrifugation virale Partikel konzentriert und in 500 μl 50 mM Tris pH 8,0 aufgenommen. Um bei Transfektionen vermehrt entstehende nicht umhüllte, jedoch z.T. DNA-haltige Nukleokapside zu entfernen, wurden die Proben mit 20 mM MgCl₂ versetzt und mit jeweils 200 μg/ml Proteinase K und DNaseI ohne Zusatz von Detergenzien für 2 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die DNaseI durch Zugabe von EDTA (50 mM Endkonzentration) inhibiert, SDS bis zu einer Endkonzentration von 1,4% zugegeben und der Proteinase K-Verdau für 2 h bei 56°C fortgesetzt, um nun die DNA aus Virionen freizusetzen. Dann wurde die Virionen-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung wie in 3.2.5.6 beschrieben isoliert.

3.2.5.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle Methode zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Sequenzen. Man benutzt eine thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase und ein Gemisch aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs), um komplementäre einzelsträngige DNA mithilfe von zwei Oligonukleotiden (Primer) herzustellen. Nach der initialen Denaturierung einer Einzel- oder Doppelstrang-DNA-Matrize, an die die Primer hybridisieren, durchlaufen die Proben die Zyklen von Denaturierung, Primer-Anlagerung und Verlängerung (Extension) ungefähr 30-mal, bis eine in einem Agarosegel sichtbare oder für die entsprechende Anwendung ausreichende Menge Produkt amplifiziert wurde. Darauf folgt eine einzelne längere Extensionsphase, um unvollständige Produkte zu verlängern und letztlich die Abkühlung auf 4°C.

Vorbereitung von Mediumproben für die PCR

Von den Medienüberständen infizierter PDLCs wurden 50 μl mit 150 μl Schlicht-Köck-Puffer versetzt. Detergenzien im Puffer zerstören dabei die viralen Hüllen. Dann wurde 0,1 mg/ml Proteinase K zugeben und sowohl Serumproteine als auch Nukleokapside für 2 h bei 56°C verdaut. Die Proteinase K wurde anschließend für 10 min bei 95°C inaktiviert. Von derart vorbereiteten Proben wurden je 5 μl in die PCR eingesetzt.

Schlicht-Köck-Puffer:

50 mM KCl, 0,45% Tween 20, 0,45% NP-40, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3)

Amplifikation von DHBV-DNA

Hierzu wurden 5 μl für die PCR vorbereitete Mediumproben in einem 50 μl Ansatz mit 20 μl Eppendorf-Master-Mix und je 200 nM Primer versetzt. Anschließend wurde ein Tropfen Mineralöl auf den Ansatz gegeben und die DNA in einem RoboCycler Gradient 40 in 30 Zyklen nach folgendem Programm amplifiziert.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	45 sek	
Primer-Anlagerung	60°C	45 sek	30
Extension	72°C	2 min	
Extension	72°C	4 min	1
Kühlen	4°C	∞	1

Amplifikation von PPP2 und PPP3

Für die PCR zur Amplifikation von Calcineurin- und PP2A-cDNA-Sequenzen wurden je 200 ng cDNA eingesetzt. Die Ansätze von 50 µl enthielten ebenfalls 20 µl Eppendorf-Master-Mix und je 200 nM der jeweiligen Primer. Die Reaktion erfolgte in einem RoboCycler Gradient 40 nach folgendem Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	45 sek	
Primer-Anlagerung	55°C	45 sek	30
Extension	72°C	1 min	
Extension	72°C	5 min	1
Kühlen	4°C	∞	1

3.2.5.9 DNA-Dot-Blot

Der DNA-Dot-Blot ist eine einfache und schnelle Methode für die Quantifizierung viraler DNA im Medium oder Serum.

Eine trockene N-Hybond-Membran wurde auf die benötigte Größe zugeschnitten und mithilfe eines Rasters markiert. Darauf erfolgte der Auftrag von 1-2 μl Probe je "Dot". Die Proben bestanden aus Zellüberständen, welche mit DNaseI verdaut worden waren, sofern im Vorfeld der Versuche eine Transfektion erfolgt war. Eine Verdünnungsreihe eines DHBV-Plasmids diente als Standard für die Quantifizierung. Die Membran wurde nach dem Probenauftrag 30 min an der Luft getrocknet. Dann wurde ein Whatman-Papier von Membrangröße mit Soak I getränkt. Die Membran wurde vorsichtig mit der Auftragsseite nach oben darauf gelegt und 5 min inkubiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Dann

wurde ein Whatman-Papier von Membrangröße mit Soak II getränkt und die Membran mit der Auftragsseite nach oben darauf 10 min inkubiert. Auch dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurde die Membran mit UV-Licht von 80 000 µJ bestrahlt, wobei die DNA kovalent an die Membran gebunden wird. Die Membran wurde dann entweder sofort zum Nachweis der Virus-DNA der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde unterzogen (siehe 3.2.5.11) oder bis zur Hybridisierung trocken gelagert.

Soak I: 0,5 M NaOH, 1 M NaCl

Soak II: 0,5 M Tris (pH 7,4), 3 M NaCl

3.2.5.10 Southern Blot

Southern Blotting ist eine Methode, bei der DNA, die in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt wird und anschließend in einem Hochsalzpuffer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen wird. Diese Membran kann im Anschluss mit einer geeigneten Sonde hybridisiert werden, so dass der Nachweis sehr geringer DNA-Mengen gelingt. Der Southern Blot wurde hier für den Nachweis von DHBV-DNA in Zellen und Überständen verwendet.

Elektrophorese und Vorbehandlung des Gels

In einer großen Elektrophorese-Kammer wurde ein 1,5%iges TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid gegossen. Die DNA-Proben wurden in die Taschen des Gels gefüllt. Außerdem wurden ein DNA-Standard und ein Virus-Marker aufgetragen, die später die Identifizierung der erhaltenen Banden ermöglichten. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 30 V über Nacht. Am folgenden Tag wurde die DNA-Trennung anhand des DNA-Standards unter UV-Licht kontrolliert und fotografiert. Alles überflüssige Gelmaterial wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und das Gel mit destilliertem Wasser gespült. Dann wurde es 10 min in 0,125 M HCl bei leichtem Schütteln depuriniert, anschließend 30 min in Denaturierungspuffer denaturiert und 30 min in Neutralisierungspuffer neutralisiert. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde das Gel jeweils mit destilliertem Wasser gespült.

Transfer

Eine große Schale wurde mit 20 x SSC, dem Transferpuffer, gefüllt. In dieser wurde mithilfe einer kleineren Schale eine Plattform gebaut, über die drei Whatman-Papiere gelegt wurden, die an jeweils zwei gegenüberliegenden Seiten in den Transferpuffer reichten. Die Papiere wurden vollständig benetzt und Luftblasen herausgerollt. Darauf

wurde das Gel mit den Taschen nach unten platziert. Um die Kanten des Gels wurden Streifen von Parafilm gelegt, um sicher zu gehen, dass der Puffer nicht außerhalb des Gels hochgesaugt wird. Auf das Gel wurde eine zugeschnittene trockene Hybond-N-Membran gelegt und drei weitere mit Transferpuffer benetzte Whatman-Papiere von der Größe des Gels. Obenauf folgte ein 10 cm hoher Stapel von trockenen Papiertüchern, die auf die Größe des Gels zugeschnitten waren. Den Abschluss bildete eine Glasplatte, die mit einem Gewicht von 1 kg beschwert wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Während des Transfers wird der Puffer durch das Gel in die Papiertücher gesaugt und nimmt die DNA aus dem Gel mit, die auf ihrem Weg nach oben aber durch den Nylonfilter zurückgehalten wird, und daran haften bleibt. Nach dem Transfer, der durch Begutachtung des Gels unter UV-Licht bestätigt wurde, wurde die Membran zur kovalenten Bindung der DNA mit UV-Licht von 80 000 µJ bestrahlt. Die Membran wurde dann entweder sofort zum Nachweis der Virus-DNA der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde unterzogen (siehe 3.2.5.11) oder bis zur Hybridisierung trocken gelagert.

Lösungen:

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer: 1,5 M NaCl, 1 M Tris (pH 7,5)

Transferpuffer (20x SSC): 300 mM Natriumcitrat, 3 M NaCl (pH 7-8)

3.2.5.11 Hybridisierung von DNA-Dot-Blots und Southern Blots

Bei der DNA-DNA-Hybridisierung kommt es zur Bindung von zu einer bestimmten DNA-Sequenz komplementären DNA-Sonde mit der einzelsträngigen DNA auf Membranen aus DNA-Dot-Blots oder Southern Blots. Eine erhöhte Temperatur, ein Hochsalzpuffer bei der Reaktion und anschließende Waschschritte sorgen für die nötige Stringenz. Zum Einsatz kamen radioaktiv markierte Sonden (siehe 3.2.5.12), aber auch biochemische Markierungen sind möglich. Die Bindung der Sonde auf der Membran markiert die Stelle, wo sich komplementäre DNA befindet. Der Nachweis der Signale erfolgte mithilfe eines Phosphoimagers, der im Vergleich zu Röntgenfilmen eine höhere Sensitivität besitzt und auch die Möglichkeit zur Quantifizierung der Signale bietet.

Die Membran wurde für mindestens 2 h in Church-Puffer bei 68°C prähybridisiert. DHBV-DNA wurde, wie in 3.2.5.12 beschrieben, radioaktiv markiert und direkt in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht.

Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal jeweils für 30 min bei 50°C und einmal 30 min bei 65°C in Church-Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit ihr eine Phosphoimager-Platte in einer bleiummantelten Kassette bestrahlt.

Der Nachweis der Signale erfolgte in einem BAS-2500 Phosphoimager.

Lösungen:

Church-Mix: 0,5 M Na₂HPO₄ (pH 7,2), 7% SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)

Church-Waschpuffer: 40 mM Na₂HPO₄, 1% SDS

3.2.5.12 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Die Markierung von DHBV-DNA als Sonde erfolgte mit dem Rediprime II- Kit von Amersham nach den Angaben des Herstellers. Der Reaktionsansatz enthält eine Mischung aus willkürlichen Hexanukleotiden (random primer), die dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I die Replikation an vielen Stellen der zugegebenen denaturierten Matrize ermöglichen. Radioaktiv markierte Nukleotide, die der Reaktion beigegeben werden, führen dazu, dass die neu synthetisierte DNA radioaktiv ist und als DNA-Sonde für Filterapplikationen eingesetzt werden kann.

Es wurde eine Verdünnung von Plasmid-DNA auf 24 ng / 45 µl in TE vorgenommen. Die DNA wurde bei 95°C für 5 min denaturiert, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Dann wurde sie ohne zu mischen zu einem Rediprime II-Reaktionsansatz gegeben. Es wurden 5 μ l [α - 32 P] dCTP (1,85 MBq) zufügt und 12 x pipettierend gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EDTA und Denaturierung bei 95°C für 5 min terminiert. Die Sonde wurde noch 5 min auf Eis gekühlt, bevor sie über eine spezielle Säule von nicht inkorporierten Nukleotiden getrennt wurde. Verwendet wurden NICK-Säulen von Pharmacia Biotech auf der Basis von Sephadex G-50. Die Vorbereitung einer solchen Säule erfolgte durch einmaliges Spülen des Reservoirs über der Säule mit Äquilibrierungspuffer. Dann wurde das Reservoir erneut mit Äquilibrierungspuffer gefüllt und dieser durch die Säule ablaufen gelassen. Anschließend konnte die vorbereitete Sonde auf die Säule gegeben werden. Es wurde gewartet, bis sie vollständig in das Säulenbett eingelaufen war, dann wurden 400 µl Äquilibrierungspuffer zugegeben und das gesamte auslaufende Volumen verworfen. Ein zweites Mal wurden 400 ul Äquilibrierungspuffer zugegeben und der nun erhaltene Durchlauf als gereinigte Sonde aufgefangen. Diese wurde direkt in die Prähybridisierungslösung zu einer Membran gegeben.

Lösungen:

Äquilibrierungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA

3.2.6 Proteintechniken

3.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird standardmäßig zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS auf 95°C erhitzt, und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, β-Mercaptoethanol oder DTT aufgespalten. Dadurch wird gewährleistet, dass in der Regel nur die molare Masse des Proteins als Trennkriterium wirkt. Dieses Laufverhalten kann jedoch durch Modifikationen der Proteine, wie Glykosylierung und Phosphorylierung, sowie durch besondere Konformationen bestimmter Proteinbereiche verändert sein. Als Trägermatrix für das Gel wird Polyacrylamid verwendet, als vernetzende Substanz wird Bisacrylamid eingesetzt. Die Porengröße wird durch die Gesamtacrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad definiert. Die Vernetzung der beiden Monomere wird durch die Katalysatoren TEMED und APS unter Luftabschluss ausgelöst. Die Elektrophorese erfolgte in einem diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel, pH 6,8, überschichtet ein engmaschigeres Trenngel, pH 8,8, wodurch eine Bandenschärfung durch Auflaufen und Verdichten der Proteine an der Grenze von Sammel- zu Trenngel erfolgt. Gradientengele geben einen breiteren Trennbereich und deutlich schärfere Banden als Gele einfacher Prozentigkeit. Sie sind daher besonders geeignet zur Darstellung unterschiedlich großer Proteine auf demselben Gel.

Herstellung von Proben für Immunblots

Die für Immunblots zu erntenden Zellen wurden in der Zellkulturschale dreimal mit PBS gewaschen und anschließend sofort mit 2 x Laemmli-Puffer lysiert. Alternativ wurde das zu lysierende Zellpellet mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt und sofort vermischt. Die Lysate wurden in Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 99°C gekocht. Ungelöstes Material wurde durch anschließende 5-minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm pelletiert und die Überstände entweder sofort für die PAGE eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Sollten Zellüberstände für das Immunblotten verwendet werden, wurden diese mit 1 Volumen 2x Laemmli-Puffer versetzt und weiter wie oben verfahren. Viruspellets wurden ebenso mit einem geeigneten Volumen an 2x Laemmli-Puffer lysiert und anschließend gekocht.

Herstellung von SDS-Gradientengelen und Elektrophorese

Zwischen zwei unterschiedlich hohe Glasplatten wurden Abstandhalter platziert und die Gussform mit Klammern gesichert und abgedichtet. Zunächst wurden Lösungen für 5%ige und 20%ige Gele angesetzt und die Auslaufsäule eines Gradientenmischers mit der hochprozentigen Lösung befüllt. Ein kurzes Öffnen des Hahns zwischen den beiden Säulen verhinderte Lufteinschluss im Durchlauf. Dann wurde die hintere Säule mit der niedrig konzentrierten Lösung befüllt, der Rührer in der Auslaufsäule in Gang gesetzt und der Durchlauf geöffnet. Über eine Pumpe wurde die Lösung aus der Auslaufsäule in die Glasgussform abgeführt. Die aus der hinteren Säule nachlaufende Lösung verdünnte die hochprozentige Lösung graduell, so dass ein kontinuierlicher Gradient entstand. Bevor es zur Polymerisierung des Gels in den Ventilen oder Schläuchen kam, konnten bis zu drei Trenngele gegossen werden. Die Gele wurden mit Butanol-gesättigtem Wasser überschichtet und waren innerhalb von 1 h auspolymerisiert. Dann wurde das Wasser abgegossen und das Trenngel mit der Lösung für das Sammelgel überschichtet. Gleichzeitig wurden die Kämme eingesetzt. Auch das Sammelgel wurde 1 h für die Polymerisation inkubiert, bevor die Gele in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit Proben beladen wurden, die in ungefähr 18 h bei 80 V der Größe nach aufgetrennt wurden.

Lösungen:

2x Laemmli-Puffer: 0,05 M Tris-HCl (pH 7,0), 4% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (30%): 28,5% Acrylamid, 1,5% Bisacrylamid

Ansatzschema für 2 große Gele:

Lösung	20%iges Gel	5%iges Gel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid	21,2 ml	5,3 ml	6 ml
Wasser	4,8 ml	20,7 ml	16 ml
3 M Tris, pH 8,8	4 ml	4 ml	-
0,5 M Tris, pH 6,8	-	-	8 ml
APS (65,7 mM, frisch)	2 ml	2 ml	2 ml
TEMED	20 μl	20 μ1	20 μ1

PAGE-Laufpuffer: 0,025 M Tris (pH 8,3), 0,192 M Glycin, 0,1% SDS

Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Im Anschluss an die Elektrophorese oder das Blotten können Proteinbanden im Gel mittels Farbstoffen, die Proteine binden, sichtbar gemacht werden. Dafür kommt in der Regel Coomassie Blau zum Einsatz. Die zu färbenden Gele wurden für mindestens 30 min in einer Lösung aus 0,1% Coomassie Brilliant Blau, 15% Essigsäure und 45% Ethanol inkubiert und anschließend in 20% Ethanol, 3,5% Eisessig so lange geschüttelt, bis der Hintergrund entfärbt war und die Proteinbanden hervortraten.

3.2.6.2 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode der Sichtbarmachung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Silbernitrat bildet nicht-stöchiometrische Komplexe mit den Proteinen im Gel und wird anschließend reduziert, wobei braune bis schwarze Banden sichtbar werden. Zunächst wurden die Gele für 30 min in 40% Methanol, 10% Essigsäure fixiert, anschließend zweimal 30 min in H₂O gewaschen und für 30 min mit 5 μg/μl DTT in H₂O reduziert. Dann folgte die Einlagerung von Silbernitrat durch Inkubation in 0,1% Silbernitrat (AgNO₃) in H₂O für 30 min. Die Gele wurden kurz in H₂O gewaschen und zunächst 1 min mit 50-100 ml einer frisch angesetzten 3%igen Na₂CO₃- und 0,017% Formaldehyd-Lösung gespült und dann in 200 ml dieser Lösung so lange unter leichtem Schwenken inkubiert, bis die gewünschte Färbung erreicht war. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Löffels Zitronensäure direkt in die Färbelösung gestoppt.

Die Gele wurden anschließend getrocknet und dokumentiert.

3.2.6.3 Immunblot

Beim Immunblot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran aus Nitrozellulose, Nylon oder PVDF transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur. Die Proteine können dadurch von Antikörpern erkannt werden. Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen. Für den Transfer wurde das Semidry-Blot-System gewählt, es hat den Vorteil, dass der Transfer gleichmäßig über das ganze Gel erfolgt und nur geringe Mengen an Puffer benötigt werden.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran müssen zuerst die noch freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden, da sich sonst die Antikörper auch an diese Bindungsstellen heften und ein spezifischer Nachweis von Antigenen nicht möglich wäre. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. Dafür eignen sich sowohl BSA (engl.: bovine serum albumin), als auch Milchpulver, Myoglobin oder Hämoglobin.

Um die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, wird ein Spezies-spezifischer sekundärer Antikörper verwendet, der kovalent mit Enzymen wie z.B. HRPO (engl.: horseradish peroxidase) gekoppelt ist. HRPO kann verschiedene Substrate umsetzen, darunter das Chemilumineszenzsubstrat Luminol, wodurch Licht emittiert wird. Die Lichtemission kann mithilfe von Röntgenfilmen oder einer CCD-Kamera festgehalten werden, wobei für gleiche Signalintensitäten die Expositionszeit für eine Kameraaufnahme ca. 10-mal länger ist als die für einen Röntgenfilm.

Semidry-Transfer-Verfahren nach Schleicher & Schüll

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs wurden die Gele von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde bis zum Gebrauch in Puffer 3 inkubiert. Zwei passend zugeschnittene dicke Whatman-Papiere (GB 004) wurden mit Puffer 1 getränkt und auf die untere Elektrode (Anode) aufgelegt. Es folgte ein in Puffer 2 getränktes Whatman-Papier. Darauf wurde eine in Methanol aktivierte und mit Puffer 2 getränkte PVDF-Membran platziert. PVDF hat eine besonders hohe Proteinbindekapazität und den Vorteil, dass sie so engmaschig ist, dass kleinere Proteine auch nach ausgedehntem Transfer nicht durch sie hindurchwandern können. Zudem ist sie mechanisch stärker beanspruchbar als Nitrozellulose oder Nylon und daher für den Nachweis mehrerer Antigene nacheinander gut geeignet. Auf die Membran wurde das Gel gelegt und mit drei in Puffer 3 getränkten Whatman-Papieren abgeschlossen. Nach jeder Lage wurde mit einem Glasröhrchen eventuell zwischen den Lagen verfangene Luft weggerollt. Sollten zwei Gele gleichzeitig transferiert werden, wurde über das erste Gel nur ein Whatman-Papier mit Puffer 3 gelegt. Darauf folgte eine Dialyse-Membran, die in Puffer 2 getränkt worden war. Dann wieder ein Whatman-Papier in Puffer 2, die zweite Membran, das Gel und als Abschluss 3 in Puffer 3 getränkte Whatman-Papiere. Der Deckel (Kathode) wurde oben aufgelegt und der Transfer erfolgte zunächst für 10 min mit 12 V, danach weitere 1,5 h bei 20 V.

Immunologischer Nachweis der Antigene

Die Membran aus dem Semidry-Transfer wurde für mindestens 2 h bei 4°C in 5%iger Trockenmilchlösung in ddH₂O geblockt. Dann wurde die Membran in einer 3%igen

Milchlösung in TBS mit einer Verdünnung des ersten Antikörpers nach Angaben des Herstellers oder eigenen Maßgaben für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde mit drei Waschschritten von je 10 min in TBS-T entfernt. Dann wurde die Membran mit einer Verdünnung des zweiten HRPO-markierten Antikörpers (10 ng/ml) in 3%iger Milchlösung in TBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde die Membran 3-mal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Der Nachweis des gebundenen HRPO-markierten Zweitantikörpers erfolgte mit dem SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate nach den Angaben des Herstellers. Ein der Blotgröße angemessenes Volumen an Lösungen wurde im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min auf der Membran inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde ablaufen gelassen und die Membran auf einer Glasplatte mit Frischhaltefolie eingeschlagen. Zur Dokumentation der Signale wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und eine entsprechende Zeit exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einer automatischen Entwicklermaschine der Firma Agfa.

War der Nachweis abgeschlossen, wurden weitere Antikörperbehandlungen durchgeführt, bis alle gewünschten Antigene nachgewiesen waren. Dabei wurden die verschiedenen Erstantikörper in der Reihenfolge ihrer zu erwartenden Signalstärke, beginnend mit dem schwächsten, verwendet. So konnte auf das "Strippen" der Membran zwischen den einzelnen Behandlungen verzichtet werden. Die Erstantikörperlösungen wurden mit 0,2% Natriumazid versetzt, um eine längere Lagerfähigkeit zu ermöglichen. War der Immunnachweis abgeschlossen, wurde die Membran für 5 min mit Amidoschwarz gefärbt, in Entfärbelösung gewaschen und getrocknet. Die Proteinbanden und auch die Banden des Molekulargewichtsmarkers konnten so sichtbar gemacht werden.

Lösungen:

Puffer 1: 300 mM Tris/HCl (pH 10,4) Puffer 2: 25 mM Tris/HCl (pH 10,4)

Puffer 3: 40 mM Norleucin / 5 mM Tris (pH 9,4)

Amidoschwarz: 0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Eisessig

Entfärbelösung: 20% Ethanol, 3,5% Eisessig

TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,6)

TBS-T: 0.1% Tween 20 in TBS

3.2.6.4 2D-Elektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese ist eine weit verbreitete Methode, komplexe Proteingemische nacheinander nach zwei unabhängigen Parametern aufzutrennen. Dadurch erhält man eine wesentlich bessere Auflösung, als es die eindimensionale Auftrennung ermöglicht. Die erste Dimension ist eine isoelektrische Fokussierung (IEF) und trennt Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt. Der isoelektrische Punkt ist der pH-Wert, an dem sich die positiven und negativen Ladungen eines Proteins aufheben und die Nettoladung Null beträgt. Dem folgt in der zweiten Dimension eine SDS-PAGE, welche die Proteine anhand ihres Molekulargewichts trennt.

IEF und anschließende PAGE wurden in Kooperation mit Dr. Heukeshofen am Heinrich-Pette-Institut durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Die Zellen einer 6-Loch-Platte wurden gewaschen, pelletiert und in 500 μl 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol lysiert. Mit 50 μl 0,5 M MgCl₂ wurde die MgCl₂-Konzentration auf 50 mM eingestellt. Dann wurde 1 μl Benzonase zugegeben und das Lysat 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 14 000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde auf eine Konzentration von 15% TCA, 15 % Isopropanol gebracht und 30 min auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde 1 min bei 14 000 rpm pelletiert, einmal mit 15% TCA, 15 % Isopropanol nachgewaschen und mit Ultraschall gut gelöst. Dann wurde es erneut 1 min bei 14 000 rpm pelletiert und 3 x mit Ether gewaschen. Das Pellet wurde kurz trocknen gelassen und in 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% Chaps, 0,5% DTT und 40 mM Tris pH 7,0 aufgenommen und bei RT unter gelegentlichem Mischen mindestens 1 h oder so lange, bis es sich vollständig gelöst hatte, stehen gelassen.

IEF:

Die IEF erfolgte auf IPG-Streifen der Firma Amersham Pharmacia Biotech mit linearem pH-Gradienten von 7 bis 10. Die Proben wurden nach der Rehydrierung der Streifen über einen "Proben-Cup" am pH 7-Ende der Streifen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 65 kVh.

PAGE:

Nach der IEF wurden die IPG-Streifen in SDS-Puffer äquilibriert und auf ein 12%iges PAA-Gel montiert.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele geblottet und DHBc immunologisch nachgewiesen wie in 3.2.6.3 beschrieben.

3.2.6.5 Serumtest auf DHBV-Infektion von Entenföten

Blutproben der präparierten Entenföten wurden in einer Mikrofuge für 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert, um das Serum von den Blutzellen abzutrennen. Von den Serumproben wurden dann Verdünnungen von 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 in PBS angesetzt. Jeweils 10 µl dieser Verdünnungen wurden mithilfe einer Slot-Blot-Apparatur auf die stumpfe Seite einer mit Wasser befeuchteten Protran-Membran aufgebracht. Als Positivkontrolle diente eine Serumprobe von kongenital infizierten Enten. Die Membran wurde 30 min in 5%iger Milchlösung in Wasser geblockt, 30 min mit einem Antikörper gegen das große Hüllprotein L von DHBV (anti-DHBVpreS) in 3%iger Milchlösung in TBS inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen. Dann folgten eine 30-minütige Inkubation mit einem HRPO-markierten Zweitantikörper in 3%iger Milchlösung in TBS, drei weitere Waschschritte mit TBS-T und schließlich der Nachweis mit einer selbst hergestellten ECL-Lösung. Die typische Expositionszeit auf Röntgenfilm betrug 10 min. DHBV-positive Seren konnten anhand von Schwärzungen der Slots identifiziert werden.

"Hausgemachte" ECL-Lösung

Das Einsetzen einer hausgemachten ECL-Lösung kommt für sehr starke Signale und bekannte Expositionszeiten in Frage, da die Lichtemission viel schneller nachlässt und insgesamt schwächer ist als mit dem verstärkten ECL-System von Pierce.

Lösung A und Lösung B wurden frisch angesetzt und im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membran wurde darin für 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Signale mit Röntgenfilm nachgewiesen.

Lösungen:

Coumarin-Säure: 14,8 mg/ml in DMSO

Luminol (3-Aminophtalhydrazide): 44,3 mg/ml in DMSO

Lösung A: 5 ml Tris/HCl 100 mM (pH 8,5), 25 µl Coumarin-Säure, 50 µl Luminol

Lösung B: 5 ml Tris/HCl 100 mM (pH 8,5), 3 μl H₂O₂

3.2.6.6 Immunzytochemie

Die Darstellung von Proteinen im zellulären Kontext erfolgte mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung. Dafür wurden Zellkulturen auf sterilen Deckgläschen angelegt. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden geerntet und fixiert, indem sie zweimal in der Zellkulturschale mit PBS gewaschen wurden und anschließend für 5 min mit eiskaltem Methanol (-20°C) bedeckt wurden. Dann wurden die Deckgläschen einzeln für

einige Sekunden in eiskaltes Aceton (-20°C) getaucht und auf einem Whatman-Papier an der Luft trocknen gelassen. Die Aufbewahrung erfolgte unter Luftabschluss bei -20°C.

Die Antikörperbehandlung erfolgte in einer feuchten Kammer, um die benötigten Volumina gering zu halten und ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die fixierten Zellen wurden durch 5-minütige Inkubation in PBS-T rehydriert und danach für 10 min mit 1% BSA in PBS-T geblockt. Nach dem Blocken wurde zweimal mit PBS-T gespült und der erste Antikörper in PBS-T-BSA auf die Zellen gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde dreimal für jeweils 5 min mit TBS-T-BSA gewaschen und daraufhin ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper in PBS-T-BSA auf die Zellen gegeben. Diese Antikörperlösung enthielt außerdem den Hoechst-Farbstoff 33342, der sich an DNA anlagert und damit bei entsprechender Anregungswellenlänge die Zellkerne sichtbar werden lässt. Nach einer einstündigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde wieder dreimal mit TBS-T-BSA gewaschen und im Anschluss mit PBS gespült. Die Deckgläschen wurden mit Kaiser's Gelatine auf Objektträgern aufgebracht, trocknen gelassen und dunkel bei 4°C gelagert.

Lösungen:

PBS: 140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4)

PBS-T: PBS, 0,1% Tween 20 PBS-T-BSA: PBS-T + 0,1% BSA

Verwendete Antikörperverdünnungen:

anti-DHBpreS 1:1 in Glycerin: 1:800 anti-DHBcore 1:1 in Glycerin: 1:100 anti-NFATc1 1:40 anti-PP2A 1:100 anti-PAN-CN 1:100 anti-HA 1:100 Alexa 488/596 1:250 Hoechst 33342: 1:1000 Anti-Cam5.2 1:5

CR73, CR74, CR75, CR76, CR77, CR78 1:100 8589, CR80, CR81, CR82, CR83, CR84 1:500

3.2.6.7 Immunhistochemie

Die Gefrierdünnschnitte von fötaler Entenleber wurden langsam unter Luftabschluss auf Raumtemperatur erwärmt. Die endgültige Fixierung der Schnitte erfolgte durch zweimalige 10-minütige Inkubation in Aceton auf Eis. Die Schnitte wurden dann durch Inkubation in PBS für zweimal 10 min rehydriert. Um die Integrität des Gewebes und die

Haftung der Schnitte auf den Objektträgern nicht zu gefährden, mussten alle wässrigen Schritte ohne Detergenzien durchgeführt werden. Der erste Antikörper in PBS wurde für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Dann wurde dreimal jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper und Hoechst 33342 wurden in PBS für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Die Antikörperverdünnungen waren dabei dieselben wie bei der Immunzytochemie. Nach drei letzten Waschschritten wurden die Schnitte mit einem Deckgläschen unter Kaiser's Gelatine eingebettet und dunkel bei 4°C gelagert.

3.2.6.8 KLH-Kopplung von Phosphopeptiden

Kurze Peptidsequenzen allein stimulieren das Immunsystem nicht stark genug für die Produktion von guten Antikörpern. Daher wurden die synthetisierten Phosphopeptide kovalent an KLH (engl.: keyhole lipet hemocyanin) gekoppelt. KLH ist ein Protein aus der Hämolymphe der Schlüssellochschnecke mit besonders hohem Molekulargewicht von 8-32 Millionen Dalton und hoher Antigenität.

6 mg KLH wurden in 102 μl DMSO gelöst und anschließend mit 173 μl 0,05 M Natriumphosphat-Puffer pH 6,5 versetzt. 2 mg Kopplungsreagenz (N-succinimidyl-6-maleimido-caproate) in 25 μl DMSO wurden zugegeben und der Ansatz 1 h bei RT geschwenkt. Dann wurde eine Sephadex G25-Säule 2x mit je 1,8 ml Wasser und 1x mit 1,8 ml 0,05 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5) äquilibriert. Die Kopplungsreaktion wurde auf die Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde mit 1,5 ml 0,05 M Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5) gespült und gekoppeltes KLH mit 2,5 ml 0,05 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) eluiert. Das Eluat wurde mit 6 mg Peptid versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Volumen in 6 Teile aliquotiert (je 1 mg Peptid) und vakuumgetrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

3.2.6.9 Herstellung von phosphospezifischen Antikörpern

Die Herstellung von Antikörpern erfolgte in Kaninchen, die im Tierstall des UKE gehalten wurden. Die erste Immunisierung wurde mit 1 mg Peptid in 500 μl PBS und 500 μl Freud'schen Adjuvans Complete durchgeführt. Dazu wurde das Peptid in PBS gelöst und durch kurze Ultraschallbehandlung von 2x 5 sek mit dem Freund'schen Adjuvans gut vermischt. Die Suspension wurde in 1 ml-Spritzen aufgezogen und kurz darauf den Kaninchen unter die Haut injiziert. Mit jedem Peptid wurden je zwei Kaninchen immunisiert. Im Abstand von vier Wochen folgten weitere zwei Immunisierungen, welche mit 50% Freund'schem Adjuvans Incomplete angesetzt wurden.

3.2.6.10 Phosphatase-Behandlung

Für die *in vitro*-Dephosphorylierung von DHBc wurde die alkalische Phosphatase CIP (engl.: calf intestine phosphatase, CIP) verwendet.

CIP-Behandlung von Zelllysaten

Die Zellen eines Lochs einer 6-Loch-Platte wurden in 400 μ l Lysepuffer suspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Mit 20 μ l diesen Lysats wurde ein Verdau zusammen mit 2,5 μ l Puffer 3 (NEB), 1,5 μ l H₂O und 1 μ l CIP angesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Lösungen:

Lysepuffer: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,45% Tween, 0,45% NP-40

CIP-Behandlung von Immunblots

Um die Phosphospezifität von Antikörpern zu testen, kann man Proteine auf einem Immunblot durch Phosphatase-Behandlung dephosphorylieren und die Bindung des Antikörpers mit der an einen kontrollbehandelten Blot vergleichen.

Immunblots wurden direkt nach dem Transfer zweimal für 5 min in TBS-T gewaschen und anschließend in Puffer 3 von NEB gegeben. Die Blots wurden parallel entweder mit 100 U CIP / ml oder ohne Phosphatase bei 37°C über Nacht inkubiert. Darauf folgend wurden die Blots mit 5%iger Milchlösung geblockt und jeweils CIP-behandelte und kontrollbehandelte Blots mit phosphospezifischen anti-DHBc-Antikörpern oder dem nichtphosphospezifischen anti-DHBc-Serum inkubiert. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte mit einem HRPO-markierten Zweitantikörper und ECL (vergleiche 3.2.6.3).

3.2.6.11 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion, die auf sedimentierbaren Trägersubstanzen in Lösung stattfinden kann, wenn einer der Partner daran gekoppelt ist. Bei der hier verwendeten Substanz handelte es sich um Pansorbin-Zellen (PanZ), hitzeinaktivierte und Formalin-fixierte Bakterien der Spezies *Staphylococcus aureus*. Diese tragen auf ihrer Oberfläche von Natur aus Protein A, welches sehr spezifisch und hochaffin an die Fc-Region verschiedener Immunglobuline vieler Spezies bindet. Aus diesem Grund können die PanZ mit einem Antikörper beladen werden.

Die PanZ wurden gut aufgeschüttelt und die benötigte Menge 2x mit je 1 ml PBS gewaschen. Das Pelletieren der PanZ erfolgte jeweils für 1 min bei 13 000 rpm.

Anschließend wurden die PanZ im Ausgangsvolumen an PBS aufgenommen. Für die Beladung mit Antikörpern wurden 20 µl PanZ mit 2-2,5 µl Antikörperlösung in 500 µl PBS, 0,03% BSA 1 h bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Die Sedimentation der PanZ erfolgte bei 3000 rpm für 5 min.

Ein Pellet eukaryotischer Zellen wurde in einem geeigneten Volumen an NP40-Lysepuffer zur Isolation replikativer Intermediate (3.2.5.6) unter Zusatz von Protease-Inhibitoren lysiert und das Lysat durch Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm von nicht löslichen Zellbestandteilen inklusive dem Zellkern geklärt. Die benötigte Menge an Zelllysat und 20 μl Antikörper-gekoppelte PanZ wurden in einem Volumen von 1 ml Lysepuffer 2 h bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die PanZ 5 min bei 3000 rpm pelletiert und 3 x mit Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das PanZ-Pellet in Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min auf 99°C erhitzt. Dabei kommt es zur Lösung der Antigen-Antikörperbindungen und nach erneuter Pelletierung der PanZ befinden sich alle präzipitierten Proteine im Überstand. Die erhaltenen Überstände wurden für Immunblots eingesetzt.

3.2.6.12 ELISA

Der enzymgekoppelte Immunassay (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) wird benutzt, um eine Antigen-Antikörperreaktion mittels einer enzymatischen Farbreaktion quantitativ nachzuweisen. Dafür wird in der Regel das Antigen (z.B. in Serum, Blut, Zelllysaten oder Zellkulturüberständen) in verschiedenen Verdünnungen an eine feste Phase, eine speziell beschichtete Mikrotiterplatte, gebunden. Nach der Absättigung freier Bindestellen wird die Platte mit dem in Frage kommenden Antikörper inkubiert. Darauf folgt die Bindung eines Enzym-gekoppelten Zweitantikörpers. Dem Enzym wird sein Substrat zugeführt und dessen Umsetzung führt zu einer Farbreaktion, die durch Messung der optischen Dichte der Probe quantifiziert werden kann.

In dieser Arbeit sollte die Reaktion der DHBc-Peptidantikörper mit Phospho- und Nicht-Phosphopeptiden verglichen werden. Dafür wurde eine Nunc-MaxiSorb-Mikrotiterplatte in Doppelansätzen mit jeweils 10 µg Peptid in 100 µl EPBS beschichtet. Für jedes Antiserum wurde das für die Immunisierung verwendete, nicht-KLH-gekoppelte Phosphopeptid, ein Nicht-Phosphopeptid derselben Sequenz und ein Kontrollpeptid anderer Sequenz verwendet. Die Adsorption der Antigene erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Platten ausgeklopft und 200 µl hT-EPBS zum Blocken freier Bindestellen eingefüllt. Das Blocken erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden von allen Seren Verdünnungen von 1:1000 bis 1: 1 000 000 angesetzt und in die

vorbereitete Mikrotiterplatte gefüllt. Jeweils zwei Löcher wurden zur Kontrolle nur mit hT-EPBS befüllt. Die Inkubation mit den Erstantikörpern erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Ungebundenes Serum wurde dann durch 5-maliges Waschen mit je 200 μl hT-PBS entfernt. Anschließend wurde ein HRPO-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper zu 0,27 μg/ml in hT-EPBS angesetzt und jeweils 100 μl in jedes Loch gegeben. Dieser wurde ebenfalls 1 h bei Raumtemperatur auf der Platte belassen. Dann wurde erneut gewaschen. Ein letzter Waschschritt wurde mit EPBS ausgeführt. Für die Substratlösung wurde eine OPD-Tablette in 20,6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ gelöst. Dann wurden 19,4 ml 0,1 M Zitronensäure zugegeben und 20 μl H₂O₂ und durch vortexen gemischt. 100 μl dieser Lösung wurden in jedes Loch gefüllt und 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl 2 M HCl gestoppt und die optische Dichte der Proben bei 490 nm Wellenlänge vermessen. Parallel zu den Immunseren wurden ebenfalls die entsprechenden Präimmunseren getestet.

Lösungen:

EPBS: 9,8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 165 mM NaCl, 3,2 mM KCl, pH7,4

hT-EPBS (high Tween20-EPBS): 1x EPBS, 5% Tween 20

3.2.7 Hämatoxilin-Eosin-Färbung von Lebergefrierschnitten

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung diente der Darstellung des Entenlebergewebes der Kryoschnitte. Hämalaun ist ein natürlicher, basischer Farbstoff, der über Aluminiumionen an die Phosphatgruppen von DNA und RNA bindet und auf diese Weise den Zellkern dunkelblau färbt. Eosin, ein saurer Farbstoff, färbt Proteine und Kollagene rot und dient als Gegenfärbung. Vier μm-dünne Gefrierschnitte wurden 10 min in Aceton fixiert und anschließend in PBS rehydriert. Die Schnitte wurden 10 min in Hämatoxilinlösung nach Meyer gefärbt und dann 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Spülen in ddH₂O wurden sie für 3 min in 1:10 verdünntem Eosin gegengefärbt. Der Farbüberschuss wurde in ddH₂O ausgewaschen. Dann durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Ethanolreihe (je 1 min 80%, 2x 96%, 2x 100% und 2x Xylol). Anschließend wurden sie luftgetrocknet und mit Eukitt unter einem Objektgläschen eingebettet.

3.2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Prinzip, dass einige Moleküle einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren Strahlung wieder abgeben und so durch ihr Eigenleuchten beobachtet werden können. Im Fluoreszenzmikroskop wird aus dem weißen Licht einer Xenon- oder Quecksilberdampf-Lampe durch einen

Materialien und Methoden

Anregungsfilter die für die Anregung des Fluorochroms geeignete Wellenlänge herausgefiltert.

Ein dichroischer Spiegel lenkt im Innern des Mikroskops dieses Licht auf das Präparat. Dichroische Spiegel haben eine kritische Wellenlänge: Licht mit kleineren Wellenlängen wird reflektiert, Licht mit größeren Wellenlängen durchgelassen. Der Spiegel wird so gewählt, dass die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt. So wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während das langwelligere Fluoreszenzlicht den Spiegel passiert und durch das Okular zum Auge bzw. zur Kamera gelangt.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe kamen folgende Anregungs-/Emissionswellenlängen zum Einsatz:

Alexa Fluor 488: 495 nm / 519 nm (grün)

Alexa Fluor 594: 590 nm / 617 nm (rot)

Hoechst 33342: 355 nm / 465 nm (blau)

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Phosphorylierung von DHBc auf Replikation und Infektiosität von Virionen

4.1.1 Einflussnahme auf die Calcineurinaktivität mit Cyclosporin A

Unveröffentlichte Vorexperimente (M. Bruns, HPI Hamburg), in denen die Behandlung DHBV-infizierter PDLCs mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) eine starke Hyperphosphorylierung und das Absinken der Infektiosität der Nachkommenviren um das 100-fache verursachte, ließen vermuten, dass Calcineurin an der Dephosphorylierung des DHBc und der viralen Replikation oder Reifung maßgeblich beteiligt ist. Zunächst wurde daher versucht, diese Ergebnisse zu reproduzieren und damit zu bestätigen.

4.1.1.1 Einfluss von CsA auf die Virusproduktion

Eine Hyperphosphorylierung von DHBc ist ursprünglich beobachtet worden, wenn kongenital oder akut DHBV-infizierte PDLCs 6 Tage lang bei täglichem Mediumwechsel unter 1 μM CsA gehalten worden waren. Bei der Wiederholung dieses Experiments sollte zusätzlich geprüft werden, ob die CsA-Behandlung einen Einfluss auf die Menge der sekretierten viralen Partikel von DHBV besitzt, da für HBV beschrieben worden ist, dass die Behandlung von Zellen mit CsA *in vitro* zu einer verminderten Virusreplikation führte (Xia et al., 2005). Es wurden kongenital DHBV-infizierte PDLCs und D2-Zellen (eine Hühnerhepatomzelllinie, stabil transfiziert mit einem Überlängengenom von DHBV16) sechs Tage lang bei täglichem Mediumwechsel mit CsA-Konzentrationen von 0, 0,5, 1 oder 5 μM behandelt. D2-Zellen wurden verwendet, weil die Hoffnung bestand, sie anstelle von oder zusätzlich zu PDLCs als Produzentenzelllinie für CsA-behandeltes Virus für die anschließenden Infektionsexperimente einsetzen zu können, da PDLC-Kulturen den natürlichen Schwankungen von primären Zellen unterliegen, aufwändiger zu kultivieren und schwieriger standardisierbar sind.

Die Zellüberstände wurden täglich geerntet, durch niedrigtourige Zentrifugation von Zelldebris befreit und anschließend durch Ultrazentrifugation virale Partikel sedimentiert. Die Pellets wurden in einem geringen Volumen an PBS gelöst und im DNA-Dot-Blot auf das Vorhandensein von Virionen (DNA-haltigen Viruspartikeln) sowie im Immunblot auf DHBc- und DHBL-Antigene getestet. Nach 6 Behandlungstagen wurden die Zellen in Laemmli-Puffer lysiert und ebenfalls im Immunblot analysiert.

Die Ergebnisse für die CsA-Behandlung der PDLCs sind in Abbildung 10 und Abbildung 11 dargestellt. Die Virionsekretion ins Medium stieg ab dem dritten Behandlungstag mit Ausnahme der 5 μ M-CsA-Behandlung kontinuierlich an, wie durch DNA-Dot-Blotanalyse der Virion-DNA nachgewiesen wurde (Abbildung 10). Die Virionsekretion der Zellen unter 5 μ M CsA jedoch stagnierte auf dem Niveau vom dritten Behandlungstag.

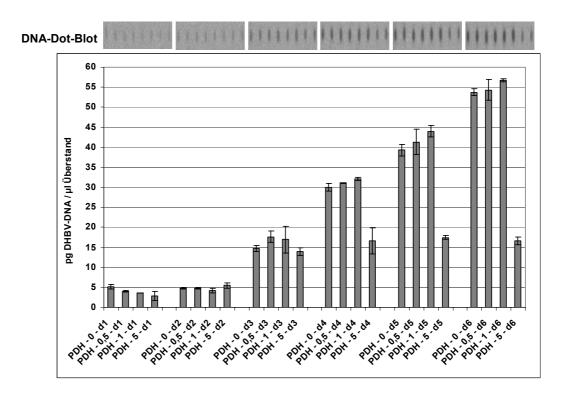


Abbildung 10: Einfluss von CsA auf die Virusproduktion in PDLCs – DNA Dot Blot

Kongenital mit DHBV infizierte PDLCs wurden für 6 Tage bei täglichem Mediumwechsel mit CsA einer Konzentration von 0, 0,5, 1 oder 5 μ M behandelt. Die Medien wurden geerntet, virale Partikel durch Ultrazentrifugation konzentriert und im DNA-Dot-Blot (oben) auf die Menge an Virus-DNA untersucht. Die quantitative Bestimmung der Signalintensität der Doppelwerte aus dem DNA-Dot-Blot wurde im Diagramm darunter ausgewertet.

Legende: PDH – 0 – d1: Überstand von PDHs unter der CsA-Konzentration von 0 μM vom Tag 1

Ein Versuch, die Virionmenge durch Nachweis der Menge an Nukleokapsid zu bestimmen, misslang, da die Menge an produzierten Virionen zu gering war. Der Immunblot mit anti-DHBc-Serum (Abbildung 11a) zeigte aber die Expression von eAg, welches bei den für die Ultrazentrifugation gewählten Bedingungen aus unbekannten Gründen ebenfalls pelletierte. Dem eAg von DHBV3 fehlen wegen der posttranslationalen Prozessierung ab der DHBc-Aminosäureposition 270 36 Aminosäuren vom C-terminalen Ende des DHBc und damit alle bekannten Phosphorylierungsstellen (Schlicht, 1991). Es besitzt jedoch zwei Glykosylierungsstellen und kann daher im Immunblot als drei Banden auftreten [(nicht glykosyliert, einfach glykosyliert und zweifach glykosyliert, (Schlicht et al., 1987)].

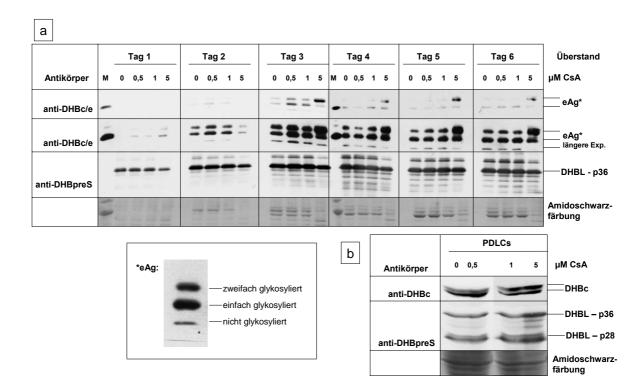


Abbildung 11: Einfluss von CsA auf die Virusproduktion in PDLCs – Immunblots

Kongenital mit DHBV infizierte PDLCs wurden für 6 Tage bei täglichem Mediumwechsel mit einer CsA-Konzentration von 0, 0,5, 1 oder 5 μ M behandelt. [a] Die Zellüberstände wurden geerntet, virale Partikel durch Ultrazentrifugation konzentriert und im Immunblot auf Virusproteine analysiert. [b] Nach der Behandlungsperiode wurden die Zellen lysiert und die Virusproteinexpression im Immunblot mit anti-DHBc/e und anti-DHBpreS Antikörpern analysiert. Als Hinweis auf die Beladung der Spuren mit vergleichbarer Menge an Protein wurden die Blots danach mit Amidoschwarz gefärbt.

Exp. = Exposition, M = Molekulargewichtsmarker (die 30 kDa-Bande reagiert mit dem anti-DHBc-Serum)

DHBe wurde ab dem dritten Behandlungstag bei einer CsA-Konzentration von 5 μ M vermehrt glykosyliert (Abbildung 11a). Dies ging einher mit einer Reduktion der Virionsekretion bis um den Faktor 3,5 am sechsten Behandlungstag im Vergleich zu anderen CsA-Konzentrationen (Abbildung 10). Die Produktion von SVPs, angezeigt durch den Nachweis von DHBL im Immunblot, schien weitgehend unbeeinflusst zu sein. Lediglich bei Behandlung der Zellen mit 5 μ M CsA war ein leichter Rückgang der Menge an DHBL im Medium zu bemerken. Die Amidoschwarzfärbung der Membran zeigte jedoch, dass sich das Bandenmuster für sekretierte Proteine bei 5 μ M CsA im Medium deutlich von dem bei 0, 0,5 und 1 μ M unterschied. Dies und die stagnierende Virionproduktion waren wahrscheinlich auf eine Schädigung der Zellen oder Veränderungen der PDLC-Kultur durch die hohe CsA-Konzentration zurückzuführen.

Abbildung 11b zeigt die Menge der intrazellulären Virusproteine nach 6 Tagen CsA-Behandlung. DHBc schien nach der Behandlung mit 1 und 5 μM CsA geringfügig hyperphosphoryliert zu sein. Diese Beobachtung war jedoch, wie weiter unten gezeigt,

nicht reproduzierbar. Die intrazelluläre DHBL-Menge war leicht erhöht, was gemeinsam mit der reduzierten Menge an SVPs im Medium für eine gewisse Exportbehinderung bei 5 μ M CsA spricht. Auch hier zeigt die Amidoschwarzfärbung des aufgetragenen Zellysats eine verminderte Zellzahl an, vermutlich weil die Konzentration von 5 μ M CsA bereits zytotoxisch war. So kann geschlossen werden, dass die CsA-Behandlung von PDLCs nur unter zytotoxischen Bedingungen zu einer verringerten Viruspartikelsekretion führte.

Dargestellt in Abbildung 12 und Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Virusprotein- und DNA-Produktion von D2-Zellen unter CsA-Behandlung.

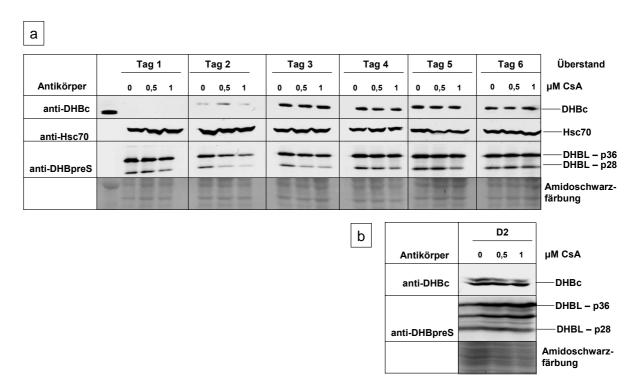


Abbildung 12: Einfluss von CsA auf die Virusproduktion in D2-Zellen - Immunblots

D2-Zellen wurden für 6 Tage bei täglichem Mediumwechsel mit CsA in Konzentrationen von 0, 0,5 oder 1 µM behandelt. [a] Die Zellüberstände wurden geerntet, virale Partikel durch Ultrazentrifugation konzentriert und im Immunblot auf Virusproteine analysiert. [b] Nach der Behandlungsperiode wurden die Zellen lysiert und die Virusproteinexpression im Immunblot analysiert.

Auf diese Zelllinie wirkten 5 μM CsA letal. Deshalb wurden nur die Konzentrationen 0, 0,5 und 1 μM eingesetzt. D2-Zellen produzieren kein eAg, da das stabil transfizierte Überlängenkonstrukt innerhalb der präC-Region beginnt. Aus unbekannten Gründen jedoch werden von jeglichen transfizierten Zellen sogenannte nackte Kapside – z.T. DNA-haltige Nukleokapside ohne Virushülle – sekretiert. Diese tragen zu dem DHBc-Signal im Immunblot extrazellulärer viraler Partikel bei.

Extrazelluläres DHBc erschien, wie für vollständig dephosphoryliertes Kapsidprotein zu erwarten (siehe 2.3.5), nur in Form der dephosphorylierten Bande bei 32 kDa (Abbildung 12). Die Sekretion von SVPs und ein weiteres ins Medium sekretiertes Protein, Hsc70 (Tytell, 2005), waren von der CsA-Behandlung nicht beeinflusst.

Innerhalb des Behandlungszeitraumes war ein leichter Anstieg der Sekretion DNA-haltiger Viruspartikel zu beobachten (Abbildung 13), der auf die Zunahme der Zellzahl zurückgeführt werden kann. Im Vergleich zur Kontrolle ohne CsA war bei D2-Zellen die Anzahl sekretierter DNA-haltiger Partikel unter 1 µM CsA bereits ab dem ersten Behandlungstag um rund die Hälfte reduziert. Ab dem dritten Behandlungstag war auch die Sekretion DNA-haltiger Partikel unter 0,5 µM CsA auf rund die Hälfte reduziert. Jedoch kann dieser relativ geringe Effekt möglicherweise auf eine leichte Zytotoxizität der CsA-Behandlung zurückzuführen sein, da gleiche Mengen an Zelllysaten am letzten Behandlungstag bei behandelten Zellen weniger Protein zeigten (Amidoschwarzfärbung in Abbildung 12b).

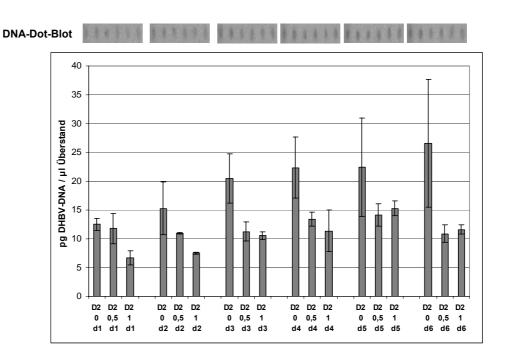


Abbildung 13: Einfluss von CsA auf die Virusproduktion in D2-Zellen - DNA-Dot-Blot

D2-Zellen wurden für 6 Tage bei täglichem Mediumwechsel mit CsA in Konzentrationen von 0, 0.5 oder 1 μ M behandelt. Die Zellüberstände wurden gesammelt, virale Partikel durch Ultrazentrifugation konzentriert und im DNA-Dot-Blot (oben) auf die Menge an Virus-DNA untersucht. Die quantitative Bestimmung der Signalintensität der Doppelwerte aus dem DNA-Dot-Blot wurde im Diagramm darunter ausgewertet.

Legende: D2 – 0 – d1: Überstand von D2-Zellen unter der CsA-Konzentration von 0 μM am Tag 1

Die intrazelluläre Menge an DHBc war weitgehend unbeeinflusst von CsA (Abbildung 12b), die von DHBL in D2-Zellen war bereits bei der Behandlung mit 0,5 μM

CsA wie bei PDLCs mit 5 µM CsA leicht erhöht. Da hier keine verringerte Menge an DHBL in den Überständen ersichtlich war und auch keine intrazelluläre Akkumulation von DHBc, handelte es sich möglicherweise um eine vermehrte intrazelluläre Expression von DHBL ohne Veränderung der Sekretionsmenge. So konnte auch bei D2-Zellen kein eindeutiger Effekt von CsA auf die Sekretion viraler Partikel beobachtet werden. Darüberhinaus konnte auch keine Hyperphosphorylierung von DHBc nach sechstägiger Behandlung mit CsA nachgewiesen werden. Die D2-Zelllinie erwies sich demnach nicht als geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der CsA-induzierten Hyperphosphorylierung im Ersatz für infizierte primäre Entenleberzellen.

Insgesamt konnte kein gravierender Einfluss von CsA auf die Virussekretion festgestellt werden. Die beobachtete leicht verringerte Virionmenge im Überstand von CsAbehandelten PDLCs und D2-Zellen ist in beiden Fällen wahrscheinlich auf zytotoxische Effekte der Behandlung zurückzuführen. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass CsA auf DHBV, ähnlich wie auf HBV, einen starken replikationshemmenden Effekt hat, denn dann sollten nur sehr wenige DNA-haltige Partikel sekretiert werden. Die Behandlung von PDLCs mit 1 µM CsA zeigte keinen Einfluss auf die Virionsekretion. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei der Weiterverwendung solcher Überstände für Infektionen von PDLCs eine eventuell auftretende Verringerung der Infektiosität der Überstände von CsA-behandelten Donorkulturen im Gegensatz zu Überständen aus Kontrollkulturen nicht von einer verringerten Menge an Virionen herrührt.

4.1.1.2 Reproduzierbarkeit der Vorexperimente

Nun sollte geprüft werden, ob die CsA-Behandlung von PDLCs reproduzierbar zur Hyperphosphorylierung von DHBc und einer deutlichen Verringerung der Infektiosität der Nachkommenviren führt.

Es wurden PDLC-Kulturen von Entenfeten, die bereits kongenital mit DHBV infiziert waren, angelegt. Vom zweiten Tag nach der Aussaat an wurden diese Zellkulturen unter einer Konzentration von 1 μM CsA bei täglichem Mediumwechsel gehalten. Am achten Tag wurden die Zellen lysiert und im Immunblot auf den Phosphorylierungsstatus von DHBc untersucht (Abbildung 14a). Das unveränderte Verhältnis von DHBc-p32 zu DHBc-p34 zeigt, dass die Behandlung mit CsA nicht zur Hyperphosphorylierung von DHBc führte. Trotzdem wurden die Überstände sowohl kongenital als auch akut infizierter PDLC-Kulturen, die entweder unbehandelt, CsA-behandelt oder Heparin-behandelt worden waren für die Infektion von DHBV-negativen PDLCs eingesetzt (Abbildung 14b und Abbildung 15). Die Heparinbehandlung diente als zweite Negativkontrolle, da bekannt

ist, dass Heparin keinen Einfluss auf die Infektion oder Replikation von DHBV hat (Offensperger et al., 1991). Die Ergebnisse zeigten für alle Infektionen eine vergleichbare Effizienz. Virionen aus CsA-behandelten PDLCs waren nicht signifikant weniger infektiös als die Kontrollvirionen, da im Immunblot ähnliche Mengen an DHBL bei allen infizierten Zellen gefunden wurden (Abbildung 14b).

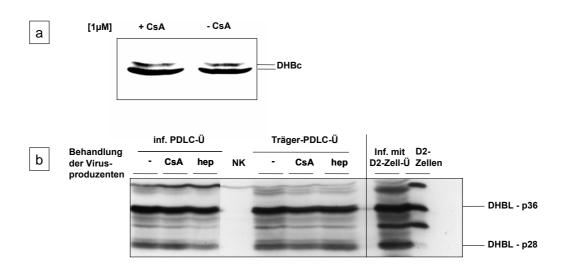


Abbildung 14: Einfluss von CsA auf DHBc-Phosphorylierung und Infektiosität des entstehenden Virus

[a] Kongenital mit DHBV infizierte PDLCs wurden *in vitro* für 7 Tage mit 1 μ M CsA behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Lysat im Immunblot auf DHBc-Expression untersucht. [b] DHBV-negative PDLCs wurden mit Überständen DHBV-infizierter oder kongenital infizierter (Träger) PDLCs, welche für 7 Tage mit 1 μ M CsA oder 10 IE/ml Heparin behandelt worden waren, infiziert und nach weiteren 7 Tagen auf die Menge an intrazellulär exprimiertem DHBL untersucht. Ü – Überstand, inf. – infiziert, hep – Heparin

Die immunzytochemische Färbung des DHBL-Proteins in infizierten PDLCs erfolgte, um zu klären, ob eventuell ein verändertes Infektionsmuster (z.B. mehr infizierte Zellen mit schwächerer Infektion oder vereinzelte infizierte Zellen statt infizierter Zellcluster) auftrat (Abbildung 15). Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollinfektionen gefunden. Somit konnten die Ergebnisse der Vorversuche nicht bestätigt werden.

Diese Befunde schließen jedoch die Beteiligung des Enten-Calcineurins an der Dephosphorylierung von DHBc nicht mit 100%iger Sicherheit aus, denn die negativen Ergebnisse könnten z.B. auf nicht bekannte technische Unterschiede in der Durchführung der Experimente zurückzuführen sein. Des Weiteren ist auch nicht sicher, ob CsA überhaupt das Calcineurin in Hepatozyten und insbesondere das der Ente hemmt.

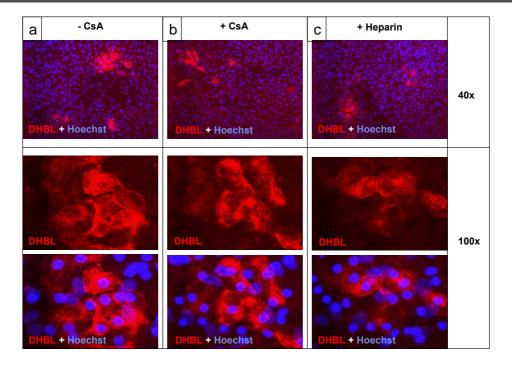


Abbildung 15: Infektion von PDLCs mit Überständen CsA- behandelter PDLCs

Kongenital mit DHBV infizierte PDLCs wurden in vitro für 7 Tage mit 1 μ M CsA oder 10 IE/ml Heparin behandelt. Als Kontrolle dienten parallel gehaltene, unbehandelte PDLCs. Die Überstände der Zellen wurden für die Infektion DHBV-negativer PDLCs verwendet. 7 Tage darauf wurden die infizierten PDLCs auf die Expression von viralen Hüllproteinen durch Immunzytochemie untersucht. [a] Infektion mit Überständen unbehandelter PDLCs, [b] Infektion mit Überständen CsA-behandelter PDLCs, [c] Infektion mit Überständen Heparin-behandelter PDLCs.

Deshalb sollte unabhängig von diesem Ergebnis geprüft werden, ob man durch Überexpression einer Phosphatase, insbesondere von Calcineurin, prinzipiell DHBc hypophosphorylieren und gegebenenfalls den Einfluss auf Virusreplikation und Infektiosität untersuchen kann.

4.1.2 Dephosphorylierung von DHBc durch Calcineurin und PP2A

4.1.2.1 Analyse der Phosphorylierungsmotive in DHBc, HBc und DHBL

Um Anhaltspunkte dafür zu finden, welche Phosphatasen an der Dephosphorylierung von DHBc beteiligt sein könnten, wurden die phosporylierten Motive des Proteins genauer untersucht. In DHBc werden bekanntermaßen fünf Serine (S) und ein Threonin (T) phosphoryliert. Als Phosphatasen für diese kommen daher nur Mitglieder der Serin-/Threonin-Phosphatasen-Familie in Frage. Die am weitesten verbreiteten Serin-/Threonin-Phosphatasen sind PP1, PP2A, PP2B oder Calcineurin und PP2C.

Anders als bei Kinasen scheint es bei Phosphatasen keine speziellen Konsensus-Sequenzen als Determinanten für die Dephosphorylierung durch ein spezielles Enzym zu geben.

Strukturen höherer Ordnung spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung. Trotz allem existieren Studien zu Sequenz-/Motiv-Präferenzen von Phosphatasen gegenüber synthetischen Peptiden, die Hinweise zur Identität an der Dephosphorylierung bestimmter Sequenzen beteiligter Enzyme geben können.

Eine publizierte Studie (Pinna and Donella-Deana, 1994) zeigte auf, dass PP1 und PP2A eine starke Präferenz für die Dephosphorylierung von T gegenüber S zeigen (20-fach bzw. 50-fach) und ein zur Phosphorylierungsstelle C-terminales Prolin (P) sich stark hinderlich auswirkt. Für PP2A gilt jedoch auch, dass mehrere basische Aminosäuren N-terminal von der Phosphorylierungsstelle (Positionen -3 bis -6) die Dephosphorylierung von S und auch T deutlich verbessern und durch bestimmte Proteinstrukturen und Untereinheitenkompositionen das Hindernis eines C-terminalen P überwunden werden kann.

Für die Dephosphorylierung durch Calcineurin ist eine saure Aminosäure C-terminal von der Phosphorylierungsstelle hinderlich. Die Präferenz von T gegenüber S ist nur gering ausgeprägt (3-fach). Basische Aminosäuren in Position -3 verbessern die Aktivität, und möglicherweise ist ein N-terminales β -Faltblatt für die Dephosphorylierung von Bedeutung.

PP2C bevorzugt wiederum T deutlich gegenüber S (30-fach) und N-terminale basische Aminosäuren haben keine deutlich stimulierende Wirkung. Diese Phosphatase ist nicht aktiv gegenüber Phosphatresten an Aminosäuren mit einer C-terminal folgenden sauren Aminosäure, und ein C-terminales P wirkt sich stark hinderlich aus.

Betrachtet man den C-Terminus von DHBc als ein Peptid (siehe Abbildung 16 oben), im Sinne der obigen experimentell gezeigten Phosphataseaktivitätsdeterminanten, so kommt für die Dephosphorylierung von S245, S257 und S259 von den untersuchten Phosphatasen am wahrscheinlichsten PP2B in Frage. Prolin C-terminal zu T239 macht auch hier PP2B wahrscheinlich. Allerdings kann für alle vier Stellen auch PP2A in Frage kommen, wenn man eine eventuell stimulierende Proteinstruktur berücksichtigt. Zieht man die möglicherweise negative Wirkung von Glutamin C-terminal von den beiden Phosphorylierungsstellen S230 und S232 für die Dephosphorylierung durch PP2B oder PP2C in Betracht, wäre PP2A der wahrscheinlichste Kandidat. Für die Anwesenheit eines β-Faltblattes N-terminal von diesen Phosphorylierungsstellen gibt es keine Hinweise.

Zum Vergleich wurde DHBc der phosphorylierte Sequenzabschnitt von HBc gegenüber gestellt (Abbildung 16 Mitte). Anzahl und Motive der Phosphorylierungsstellen in HBc unterscheiden sich deutlich von denen in DHBc. So findet man hier als Phosphorylierungsmotiv die Sequenz "SPRRR". Auch bei den bekannten

Phosphorylierungsstellen im HBc findet sich C-terminal ein P. Die N-terminalen Positionen -3 bis -6 sind durch basische Arginine gekennzeichnet. Daher käme auch hier Calcineurin als verantwortliche Phosphatase für die Dephosphorylierung in Frage. Doch berücksichtigt man möglicherweise stimulierende Proteinstrukturen, wäre genauso wie oben auch PP2A ein Kandidat.

C-terminale Sequenz von DHBc



C-terminale Sequenz von HBc:



Phosphorylierungsstelle von DHBL:



Abbildung 16: Phosphorylierungsmotive in DHBc, HBc und DHBL

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der C-Termini der Kapsidproteine von DHBV und HBV, sowie ein interner Sequenzabschnitt aus DHBL. Die Zahlen und fett gedruckten Buchstaben markieren die phosphorylierte Aminosäuren (wobei die Positionen in HBc subtypspezifisch sind). Mit roten Klammern markiert wurden erkennbare Motive um die Phosphorylierungsstelle. Gelb hinterlegt wurden basische Aminosäuren vor einer Phosphorylierungsstelle, lila hinterlegt wurde eine Prolin, wenn es C-terminal von der Phosphorylierungsstelle steht und grün hinterlegt wurde eine saure Aminosäure stromabwärts von einer Phosphorylierungsstelle.

Eine weitere bekannte Phosphorylierungsstelle von Proteinen des DHBV ist S118 im DHBL (Abbildung 16 unten). Ähnlich wie beim DHBc in den Positionen S245, S257, S259 und T239 findet sich hier ebenfalls ein Prolin in C-terminaler Position. Doch anders als bei den Phosphorylierungsstellen in DHBc und HBc besitzt DHBL-S118 keine N-terminalen basischen Aminosäuren in den Positionen -3 bis -6. Dies könnte eventuell darauf hindeuten, dass für die DHBL-Dephosphorylierung an Position S118 eine andere Phosphatase verantwortlich ist.

4.1.2.2 In vitro-Expression von Calcineurin zur Dephosphorylierung von DHBc

Nun wurde geprüft, ob eventuell eine artifizielle Überexpression von Calcineurin (CN) zur Dephosphorylierung von DHBc in der Lage ist. Unabhängig davon, ob diese Phosphatase DHBc endogen in Hepatozyten dephosphoryliert oder nicht, könnte man bei positivem Ausgang dieses Versuchs den Einfluss der Phosphorylierung von DHBc auf den Lebenszyklus von DHBV experimentell prüfen. Dieser Ansatz hat gegenüber bisherigen Analysen den Vorteil, Auswirkungen der Dephosphorylierung von DHBc auf die Replikation des Virus ohne Mutationen im Virusgenom näher charakterisieren können.

Um zu prüfen, ob DHBc intrazellulär durch CN dephosphoryliert werden kann, sollten CNA und CNB sowie konstitutiv aktives Calcineurin (CNmut) zusammen mit DHBV in verschiedenen Zelllinien koexprimiert werden. Zunächst musste jedoch die Funktionalität der transfizierten Phosphatasen durch Koexpression von NFAT kontrolliert werden. NFAT ist ein im inaktiven Zustand hochphosphoryliertes Protein, das durch CN dephosphoryliert und dadurch aktiviert wird, wobei es in den Zellkern transloziert (Rao et al., 1997). Die Koexpression mit den Phosphatasen führte zu einer Dephosphorylierung von NFAT, wie im Immunblot durch einen Bandenshift nach unten zu erkennen ist (Abbildung 17).

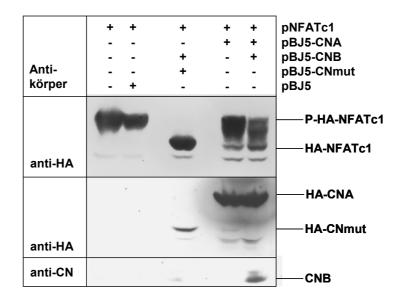


Abbildung 17: Exogen exprimiertes Calcineurin dephosphoryliert NFATc1

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-NFATc1 und Calcineurin A (pBJ5-CNA), Calcineurin B (pBJ5-CNB) und konstitutiv aktives Calcineurin (pBJ5-CNmut) kotransfiziert. Die Zelllysate wurden in einem 5%igen und einem 5-20%igen PAA-Gel elektrophoretisch getrennt und mit den aufgeführten Antikörpern analysiert. Die Koexpression von CNmut führt zur vollständigen Dephosphorylierung von NFATc1, während CNA allein und CNA zusammen mit CNB NFATc1 nur partiell dephosphorylierten.

Dabei erwies sich nur konstitutiv aktives Calcineurin als fähig, eine vollständige Dephosphorylierung herbeizuführen. Die Expression von Calcineurin A allein oder zusammen mit Calcineurin B führten nur zur teilweisen Dephosphorylierung von NFATc1. Weiterhin wurde geprüft, ob NFATc1 (nicht gezeigt) und NFATc2 (Abbildung 18) nach Koexpression mit CNmut als Konsequenz der Dephosphorylierung in den Zellkern translozierten. Die Zellkerntranslokation konnte bestätigt werden.

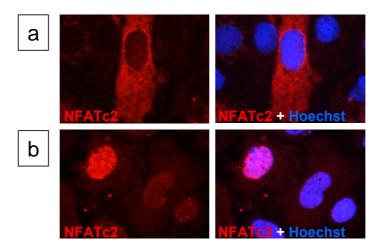


Abbildung 18: Zellkerntranslokation von NFAT durch Dephosphorylierung

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für [a] HA-NFATc2 und [b] HA-NFATc2 und konstitutiv aktives Calcineurin kotransfiziert. Die Immunzytochemie mit anti-HA-Antikörpern zeigt die Translokation von NFATc2 in den Zellkern bei koexprimiertem, konstitutiv aktivem Calcineurin.

Obwohl CNmut auch ohne koexprimiertes CNB aktiv war (siehe Abbildung 20), wurde doch ein gewisser expressionsstabilisierender Effekt von CNB auf CNmut festgestellt, weshalb in folgenden Experimenten pBJ5-CNB mit pBJ5-CNmut kotransfiziert wurde.

Die Dephosphorylierung von DHBc wird evident durch das Verschwinden der oberen Bande, die durch Phosphovarianten von DHBc entsteht. Dies konnte durch Dephosphorylierung von DHBc in Zelllysaten mit alkalischer Phosphatase (CIP) gezeigt werden (siehe Abbildung 19).

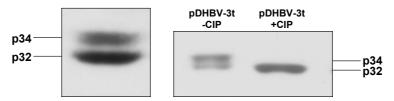


Abbildung 19: Dephosphorylierung von DHBc mit alkalischer Phosphatase

Der linke Teil der Abbildung zeigt das Bandenmuster von DHBc in einem 5-20%igen PAA-Gradientengel. Es können zwei Banden von 32 und 34 kDa unterschieden werden. Rechts wurden Lysate von pDHBV-3t-transfizierten LMH-Zellen über Nacht mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt und in einem 5-20%igen PAA-Gel aufgetrennt. Im Vergleich zur Kontrollbehandlung ohne CIP verliert das phosphatasebehandelte DHBc die obere Bande (p34), während die untere Bande (p32) an Intensität zunimmt.

Als nächstes wurde das Kapsidprotein von DHBV zusammen mit CNmut oder CNA in HuH7-Zellen exprimiert (Abbildung 20). Die Koexpression von CNA erreichte eine deutliche Intensitätsverschiebung der p34- zur p32-Bande; die Koexpression von CNmut führte dagegen zum weitgehenden Verlust der p34-Bande des DHBc. Demzufolge ist Calcineurin eindeutig in der Lage, DHBc außerhalb des viralen Kontexts zu dephosphorylieren.

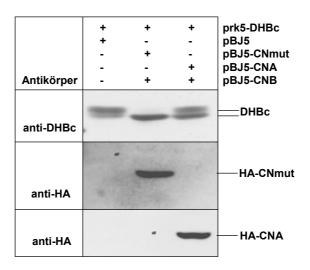


Abbildung 20: Vergleich der Dephosphorylierung von DHBc durch CNA und CNmut

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHBc und Calcineurin A (pBJ5-CNA), Calcineurin B (pBJ5-CNB) und konstitutiv aktives Calcineurin (pBJ5-CNmut) kotransfiziert. Die Zelllysate wurden in einem 5-20%igen PAA-Gel elektrophoretisch getrennt und mit den aufgeführten Antikörpern analysiert. Die Koexpression von CNmut führte zur Dephosphorylierung von DHBc, während CNA zusammen mit CNB DHBc nur geringfügig dephosphorylierte.

Als nächstes war von Interesse herauszufinden, ob die Dephosphorylierung von DHBc durch CNmut auch im viralen Kontext und in verschiedenen Hepatomzelllinien erfolgt. Dazu wurden LMH-, HepG2- und HuH7-Zellen mit verschiedenen DHBV-Expressionsvektoren und pBJ5-CNmut kotransfiziert (Abbildung 21). Für LMH-Zellen wurde ein Plasmid mit einem Genom-Dimer des DHBV-Isolats 3 verwendet. Dieses Plasmid enthält für die Expression von DHBV lediglich virale Promotoren und führte zu schlechter DHBV-Vermehrung in HuH7-Zellen, jedoch guter in LMH-Zellen. In HepG2und HuH7-Zellen zwei verschiedene Expressionsvektoren kamen mit Überlängekonstrukten des DHBV-Isolats 16 zum Einsatz. In beiden Plasmiden wird die Expression des Prägenoms und damit des Kapsidproteins durch CMV-Promotoren getrieben, während die Hüllproteinexpression auch über virale Promotoren getrieben wird. Bei der Expression beider Konstrukte (pDHBV16 und pCMV-DHBV) entsteht kein eAg, da die DHBV-Sequenz innerhalb der DHBpräC-Region beginnt.

In allen drei Zelllinien war mit DHBV koexprimiertes, konstitutiv aktives Calcineurin in der Lage, DHBc zu dephosphorylieren. In allen drei Fällen verschwand bei Koexpression von DHBV und CNmut die obere DHBc-Bande p34. Gleichzeitig kam es häufig zu einer quantitativ variablen, verringerten Transgenexpression, die vermutlich auf geringe Zytotoxizität hoher, konstitutiv aktiver Calcineurinaktivität zurückzuführen ist. Für alle Zelllinien und DHBV-Expressionskonstrukte konnte so jedoch bestätigt werden, dass die Dephosphorylierung von DHBc auch im viralen Kontext erfolgte.

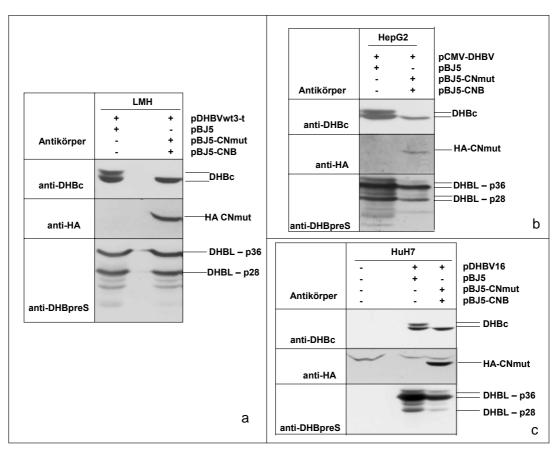


Abbildung 21: CNmut dephosphoryliert DHBc im viralen Kontext und verschiedenen Zelllinien

Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für DHBV und konstitutiv aktives Calcineurin (CNmut) oder dem leeren Kontrollplasmid (pBJ5) kotransfiziert. Zelllysate wurden über ein 5-20%iges PAA-Gel aufgetrennt und Immunblots mit den angegebenen Antikörpern angefertigt. [a] LMH-Zellen, [b] HepG2-Zellen, [c] HuH7-Zellen.

Für nachfolgende Experimente wurde die humane Hepatomzelllinie HuH7 gewählt, um Problemen mit dem schlecht charakterisierten Hühnergenom (LMH-Zellen) und schlechter Transfizierbarkeit (HepG2-Zellen) aus dem Weg zu gehen. Zudem ist seit längerem bekannt, dass auch in HuH7-Zellen produziertes DHBV für Kulturen von primären Entenleberzellen infektiös ist (Pugh et al., 1988).

An dieser Stelle sollte noch erwähnt werden, dass die Untersuchung der Replikation von DHBV bei gleichzeitiger Hypophosphorylierung des DHBc durch eine rekombinante

Phosphatase in PDLCs keine realistische Alternative war, weil die primären Entenhepatozyten mit keiner der getesteten Reagenzien oder Methoden ausreichend gut transfizierbar waren.

Zusätzliche Evidenz für die Funktionalität von CNmut in HuH7-Zellen ist die gleichzeitige Dephosphorylierung von DHBc und NFATc1 wie in Abbildung 22 gezeigt.

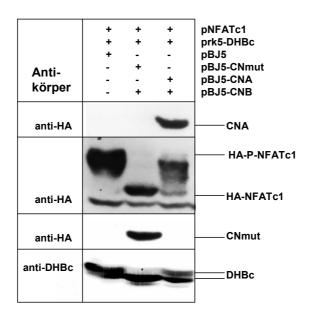


Abbildung 22: Gleichzeitige Dephosphorylierung von DHBc und NFAT durch CNmut

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für NFAT, CNA, CNB und CNmut sowie DHBc kotransfiziert. Zelllysate wurden nach PAGE in einem 5%igen und einem 5-20%igen PAA-Gel im Immunblot mit geeigneten Antikörpern untersucht. CNmut führte zur gleichzeitigen Dephosphorylierung von NFATc1 und DHBc, während mit CNA nur eine partielle Dephosphorylierung erreicht wurde.

Die Spezifität der DHBc-Dephosphorylierung konnte intern des anhand Phosphorylierungsstatuses des viralen Hüllproteins DHBL kontrolliert werden, welches bekanntermaßen an der Position S118 phosphoryliert wird (Abbildung 16). Diese Phosphorylierung bleibt trotz Bandenshifts von p34 nach p32 des DHBc erhalten (siehe Abbildung 21 und ebenfalls Abbildung 44). Vergleicht man die Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft der phosphorylierten Aminosäuren, so findet man, dass S118 im DHBL, wie die phosphorylierten Aminosäuren im DHBc, auch ein C-terminales P aufweist, jedoch keine basischen Aminosäuren in den N-terminalen Positionen -3 bis -6. Man kann daher bei der Dephosphorylierung der DHBc-Motive durch Calcineurin von einer gewissen Spezifität ausgehen.

Falls die Phosphorylierung von DHBc für den Lebenszyklus von DHBV eine Rolle spielt, so wäre eine intrazellulär differenzielle Verteilung von hypo- und hyperphosphoryliertem DHBc denkbar. Da nur reife, hypophosphorylierte Nukleokapside zur Bindung an die ER-Membran und Umhüllung fähig sind (Mabit and Schaller, 2000), würde man annehmen,

dass dephospho- bzw. hypophosphoryliertes DHBc bevorzugt an vesikulären Strukturen bindend anzutreffen ist, während hyperphosphoryliertes DHBc eher diffus im Zytoplasma verteilt vorliegen sollte. Andererseits wurde für HBc berichtet, dass eine Mutante, bei der die phosphorylierten Serine durch Alanine ausgetauscht wurden, konstitutiv im Zellkern lokalisierte (Liao and Ou, 1995). Um die intrazelluläre Verteilung von dephospho-DHBc bei koexprimiertem CNmut zu visualisieren, wurden HuH7-Zellen transfiziert und beide Proteine mithilfe der Immunzytochemie sichtbar gemacht (Abbildung 23).

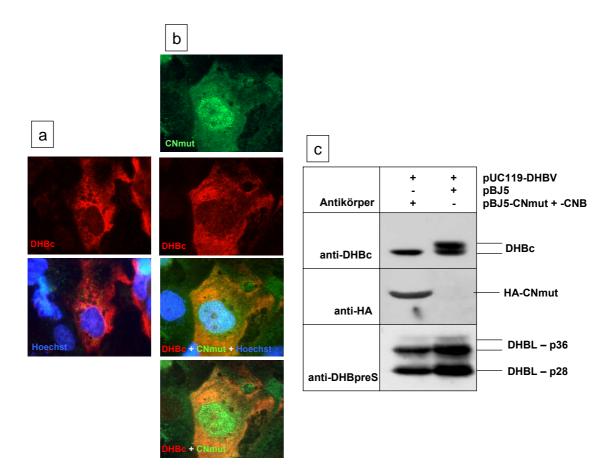


Abbildung 23: Lokalisation von DHBc und CNmut

HuH7-Zellen wurden nur mit pUC19-DHBV und dem Kontrollvektor pBJ5 oder mit pUC19-DHBV und pBJ5-CNmut kotransfiziert und die Lokalisation von DHBc und CNmut mithilfe der Immunzytochemie dargestellt. [a] DHBc lokalisiert primär im Zytoplasma transfizierter Zellen. [b] CNmut, visualisiert mit dem anti-HA-Antikörper, lokalisiert sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma. Koexprimiertes DHBc findet sich primär im Zytoplasma. [c] Immunblot der neben den Glasplättchen gewachsenen Zellen derselben Transfektion. DHBc wurde durch koexprimiertes CNmut dephosphoryliert.

Intrazellulär lokalisiert CNmut diffus im Zytoplasma und, sogar etwas stärker, ebenfalls diffus im Zellkern. Eine teilweise Zellkernlokalisation war auch zu erwarten, da von aktivem Calcineurin bekannt ist, dass es mit seinen Substraten in den Zellkern transportiert werden kann (Bosser et al., 1993; Shibasaki et al., 1996). DHBc wurde jedoch als Folge der Dephosphorylierung nicht vermehrt in den Zellkern transloziert. Bei einer intrazellulär

differenziellen Verteilung von phospho- und dephospho-DHBc wäre zu erwarten gewesen, dass zumindest ein Teil des DHBc-Signals bei Koexpression von CNmut umverteilt wird. DHBc lokalisierte bei Expression von DHBV-Expressionskonstrukten ohne Phosphatase hauptsächlich diffus im Zytoplasma (Abbildung 23a). Bei Koexpression von CNmut erscheint die intrazelluläre Verteilung von DHBc im Zytoplasma nicht weniger diffus (Abbildung 23b). Eine vermehrte Zellkernlokalisation war nicht auszumachen. Dies bestätigt die Daten von Yu und Summers, die zeigten, dass Phosphorylierungsmimiky durch Ersatz von Serinen bzw. Threonin mit Alanin oder Asparaginsäure keinen Einfluss auf die zytoplasmatische Lokalisation von DHBc hatte (Yu and Summers, 1994a). Der Immunblot in Abbildung 23c mit Extrakten von Zellen, die derselben Schale entstammten, wie die für die Immunfluoreszenz benutzten, zeigte eine eindeutige Dephosphorylierung von DHBc. Diese Ergebnisse können dahingehend gedeutet werden, dass die starke Dephosphorylierung von DHBc mit keiner offensichtlichen Umverteilung des Proteins einhergeht. Darüberhinaus stellt es in Frage, dass der Status der Dephosphorylierung von DHBc das Reifesignal von Kapsiden darstellt, welches zur Bindung an zelluläre Membranen benötigt wird, wie auch bereits von anderer Seite veröffentlicht wurde (Mabit and Schaller, 2000).

4.1.2.3 In vitro-Expression von PP2A zur Dephosphorylierung von DHBc

Die Untersuchung der Phosphorylierungsmotive von DHBc rückte noch eine zweite Kandidatenphosphatase, PP2A, ins Blickfeld. Um die Möglichkeit der Dephosphorylierung von DHBc durch PP2A zu untersuchen, wurde ein Konstrukt für die Expression der katalytischen Untereinheit *alpha* eingesetzt. Es ist bekannt, dass die katalytische Untereinheit bei Überexpression funktionell aktiv ist (Wadzinski et al., 1992). Da jedoch PP2A ein trimeres Enzym mit einer Vielzahl an möglichen regulatorischen Untereinheiten ist, war eine erweiterte und eventuell unphysiologische Spezifität durchaus denkbar.

Die Kotransfektion von pDHBV16 bzw. pDHBV-3t mit pBJ5-PP2Awt führte zu einer Dephosphorylierung von DHBc in den untersuchten Zelllinien LMH und HuH7 (siehe Abbildung 24). Die Effizienz der Dephosphorylierung mit PP2Awt war jedoch auch unter optimaler Expression nicht so stark ausgeprägt, wie mit CNmut. Wie bei längerer Exposition des anti-DHBc-Immunblots in Abbildung 24b ersichtlich, blieb stets ein schwacher Rest der p34-Bande, also von phosphoryliertem DHBc, unabhängig von der Zelllinie erhalten (vergleiche Abbildung 50). Zugleich blieb auch bei Dephosphorylierung

mit PP2Awt die Phosphovariante von DHBL erhalten, was wie oben erläutert auf eine gewisse Spezifität der Dephosphorylierung schließen ließ.

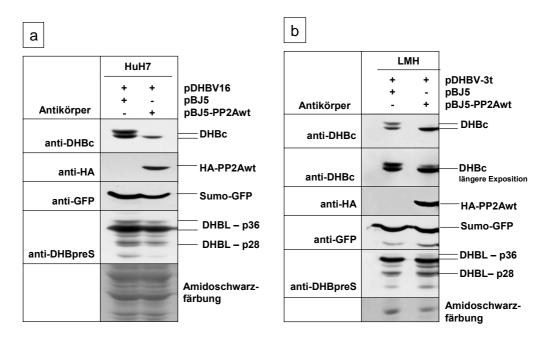


Abbildung 24: Überexpression von PP2A führt zur Dephosphorylierung von DHBc

Zellen wurden mit jeweils einem Expressionsplasmid für DHBV und pBJ5-PP2Awt oder dem Kontrollplasmid (pBJ5) kotransfiziert. Zelllysate wurden über ein 5-20%iges PAA-Gel aufgetrennt und Immunblots mit den aufgeführten Antikörpern angefertigt. [a] HuH7-Zellen, [b] LMH-Zellen.

4.1.2.4 Die endogene Expression von Calcineurin und PP2A

Zelllinien und auch PDLCs bestätigt werden (Abbildung 26).

Bei Berücksichtigung der vorangegangen Ergebnisse kommen Calcineurin und PP2A für die Dephosphorylierung von DHBc *in vivo* in Frage. Vorraussetzung für die Richtigkeit der Hypothese ist jedoch, dass diese Phosphatasen endogen in den verwendeten Zelllinien exprimiert werden.

Da für Calcineurin zunächst mit mehreren kommerziellen Antikörpern kein erfolgreicher Nachweis des Proteins im Immunblot gelang, wurde eine reverse Transkription zellulärer RNA, gefolgt von einer PCR, durchgeführt und so gezeigt, dass in HuH7-Zellen die *alpha*-und *beta*-Isoformen von Calcineurin A, sowie die *alpha*-Isoform der katalytischen Untereinheit von PP2A transkribiert wurden (Abbildung 25). Die mRNA der *beta*-Isoform von Calcineurin A war dabei deutlich stärker vertreten als die mRNA der *alpha*-Isoform. Weiterhin konnte später in Immunblots die Anwesenheit der Phosphatasen Calcineurin A (*alpha*- und *beta*-Isoform gemeinsam mit einem speziellen anti-CN-PAN A-Antikörper) und PP2A (katalytische Untereinheit) für HuH7-Zellen, LMH-Zellen, einige weitere

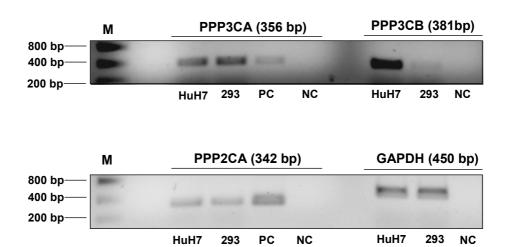


Abbildung 25: RT-PCR für den Nachweis von Calcineurin- und PP2A-mRNA in HuH7-Zellen

Aus HuH7- und Kontrollzellen (Hek-293) wurde Gesamt-RNA extrahiert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Von dieser cDNA und, wo möglich, entsprechender Kontroll-DNA in Form von Plasmiden (PC) erfolgten PCRs für den Nachweis der cDNAs von CNA Isoform α (PPP3CA), CNA Isoform β (PPP3CB) und die katalytische Untereinheit von PP2A Isoform α (PPP2CA). Als Kontrolle für die Qualität und Quantität der eingesetzten cDNAs diente die Amplifikation der GAPDH-cDNA. Es wurde jeweils eine Bande der erwarteten Größe amplifiziert, die im Agarosegel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde. M = Größenstandard, NC = Negativkontrolle (Wasser).

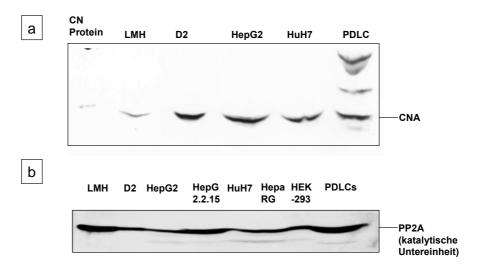


Abbildung 26: Proteinexpression von endogenem Calcineurin A und PP2A

Lysate verschiedener Zellen wurden im Immunblot auf die Expression von [a] Calcineurin A (anti-CN-PAN-Antikörper) und [b] PP2Ac überprüft. In allen Zellen konnte die Expression der Phosphatasen bestätigt werden.

Zusätzlich wurden verschiedene Zelllinien und PDLCs auch auf die Expression von Cyclophilin A und Calcineurin B geprüft, da beide Proteine für die Aktivität von Calcineurin essentiell sind (Abbildung 27). Alle getesteten Zellen exprimierten diese Proteine. Es wurde daraus geschlossen, dass Calcineurin in diesen Zellen aktiv sein kann, also auch durch Eingriffe von außen aktiviert oder inhibiert werden könnte, da alle für die Aktivität von Calcineurin nötigen, bekannten Interaktionspartner vorhanden waren.

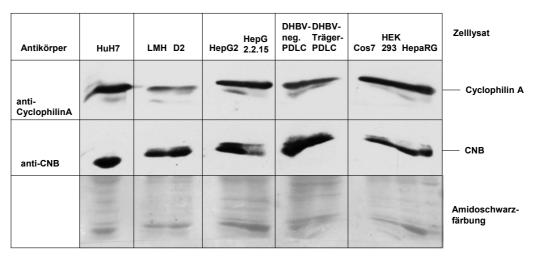


Abbildung 27: Die Expression von Cyclophilin A und Calcineurin B in verschiedenen Zellen

Lysate verschiedener Zellen wurden im Immunblot auf die Expression von Cyclophilin A und CNB überprüft. In allen Zellen konnte die Expression dieser Proteine bestätigt werden.

4.1.2.5 Die Expression von Calcineurin und PP2A in der Entenleber

Nachdem gezeigt worden war, dass die Kulturen primärer Entenleberzellen Calcineurin und PP2A exprimierten, war es von Interesse herauszufinden, welche Zelltypen für diese Expression verantwortlich sind. Die fötale Entenleber besteht nur zu etwa 60% aus Parenchymzellen. Ein nicht unerheblicher Teil der übrigen Zellen sind LSECs. Makrophagen, Gallengangs- und Itozellen fanden sich genau so in der Kultur wie ein Rest an Blutzellen. Zwar erlaubte die angewandte Präparationsmethode eine leichte Anreicherung von Hepatozyten und das verwendete Medium einen gewissen selektiven Vorteil für deren Wachstum, doch bestand bereits makroskopisch sichtbar eine deutliche Inhomogenität der PDLC-Kulturen ab dem dritten Tag nach der Aussaat. Aus diesem Grunde schien es unumgänglich, die PDLC-Kulturen, die bei der verwendeten Präparationsmethode erhalten wurden, in Bezug auf ihre zelluläre Zusammensetzung näher zu charakterisieren. Zum Vergleich wurden Kryodünnschnitte fötaler Entenlebern (Abbildung 28a) herangezogen, um Unterschiede in der Distribution der verschiedenen Zelltypen aufzudecken.

Von acetyliertem LDL (acLDL) ist bekannt, dass es ausschließlich von LSECs und mit etwas geringerer Affinität von Makrophagen aufgenommen wird (Irving et al., 1984; Okaji et al., 2004). Auf der Suche nach einem Antikörper, der LSECs markiert, um diese auch in Leberschnitten darstellen zu können, wurde ein anti-NFATc1-Antikörper identifiziert, dessen Färbemuster mit dem von acLDL identisch war (Abbildung 28b). Die Markierung

von Entenleberdünnschnitten mit anti-NFATc1 ergab das für LSECs typische Muster (Abbildung 28c). Somit konnte der anti-NFATc1 Antikörper für die spezifische Markierung von LSECs unter Berücksichtigung eventuell ebenfalls reagierender Makrophagen Verwendung finden. Die gleichzeitige Darstellung von Kupfferzellen mit Antikörpern gelang leider nicht. Ihre Anwesenheit in PDLC-Kulturen konnte aber mittels Tuschefärbung bestätigt werden (nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigten LSECs in der PDLC-Kultur ein vollkommen anderes Wachstumsmuster als in der Leber. Sie bildeten einen "Monolayer" zusammenhängender Zellen, die von Hepatozyten überwachsen werden konnten. Es entstand so nach einigen Tagen der Kultivierung eine mehrschichtige Zellkultur (nicht gezeigt), während LSECs in der Leber die Sinusoide auskleiden und eine Art Netz bilden (Abbildung 28c).

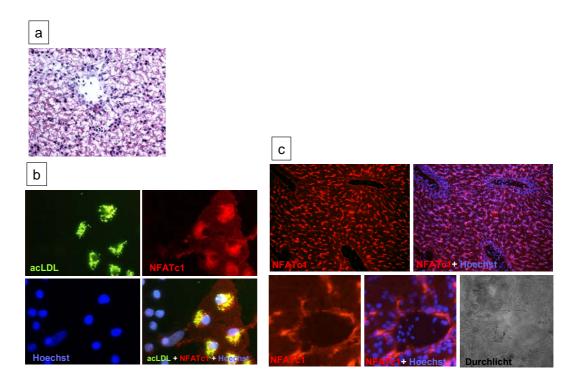


Abbildung 28: Darstellung der LSECs in fetaler Entenleber

[a] HE-Färbung eines Gefrierdünnschnitts fötaler Entenleber zur Kontrolle der Qualität der Schnitte, [b] anti-NFATc1-Antikörper (rot) reagierten in der PDLC-Kultur nur mit Zellen, die acLDL aufnahmen (grün), [c] Kryodünnschnitte von Entenleber wurden mit anti-NFATc1 (rot) markiert. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mit dem Hoechstfarbstoff.

Gallengangszellen von der Ente können mit einem speziellen anti-Zytokeratin-Antikörper (CAM5.2) identifiziert werden (Lee et al., 2001). In Entenleberkryoschnitten werden mit diesem Antikörper einerseits angeschnittenene Gallengänge sichtbar, andererseits einzelne Zellen der Gallekanälchen, die das Parenchym durchziehen (Abbildung 29). Ein völlig anderes Bild sieht man in PDLC-Kulturen. Hier werden größere Gruppen von Zellen

innerhalb der Parenchymzellbereiche angefärbt. Ob es sich bei diesen um die ursprünglichen Gallengangszellen handelte oder um unter den Kulturbedingungen zu Gallengangszellen ausdifferenzierende Hepatozyten konnte nicht eruiert werden.

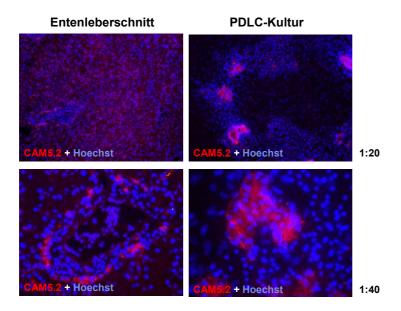


Abbildung 29: Darstellung von Gallengangszellen in Entenleber und PDLC-Kulturen

Kryodünnschnitte fetaler Entenleber und PDLC-Kulturen wurden fixiert und Gallengangszellen mit dem anti-Zytokeratin-Antikörper CAM5.2 (rot) markiert. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mit dem Hoechstfarbstoff.

Parenchymzellen konnten identifiziert werden, indem die PDLC-Kultur mit DHBV infiziert wurde und der Nachweis der viralen Proteine erfolgte. Es wurde allerdings berichtet, dass Hepadnaviren neben Hepatozyten sehr viel schwächer auch Gallengangszellen infizieren können (Lee et al., 2001). Darum wurde immunzytochemisch geprüft, ob die Cam5.2-positiven Zellen der verwendeten PDLC-Kulturen mit DHBV infiziert werden können. Abbildung 30 zeigt, dass in keiner der Zellen, die durch Cam5.2 markiert wurden, DHBVL und somit eine Infektion nachweisbar war. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den mit anti-DHBpreS markierten Zellen mit großer Sicherheit um DHBV-infizierte Hepatozyten handelte.

Für die Identifizierung Calcineurin- und PP2A-exprimierender Zellen wurden zunächst Kryodünnschnitte von fötaler Entenleber untersucht, da sich hier der Zelltyp anhand seines Färbemusters leichter bestimmen ließ. Es zeigte sich, dass Calcineurin B im Parenchym exprimiert wurde (Abbildung 31a). Die Markierungen mit anti-Calcineurin-PAN A und anti-PP2A dagegen ergaben eine Überlagerung mit NFATc1-positiven Zellen (Abbildung

31b und c). Demzufolge sind Calcineurin A und PP2A wahrscheinlich vorwiegend in LSECs der fötalen Entenleber exprimiert.

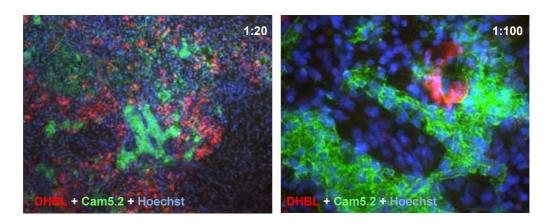


Abbildung 30: Gallengangszellen werden in vitro nicht mit DHBV infiziert

Eine PDLC-Kultur wurde *in vitro* mit DHBV-positivem Entenserum infiziert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen fixiert und infizierte Zellen mit dem anti-DHBpreS-Antikörper gegen DHBL (rot) dargestellt. Gleichzeitig erfolgte die Markierung von Gallengangszellen mit dem Antikörper anti-Cam5.2 (grün).

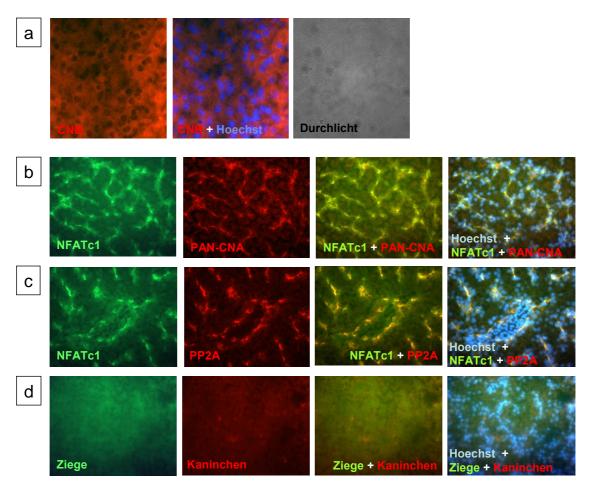


Abbildung 31: Expression von Calcineurin A, Calcineurin B und PP2A in Entenleber

Kryodünnschnitte von Entenleber wurden fixiert und mit verschiedenen Erstantikörpern behandelt, die anschließend durch fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper sichtbar gemacht wurden. [a] anti-CNB (rot), [b] anti-CN-PAN A (rot) und anti-NFATc1 (grün), [c] anti-PP2A (rot) und anti-NFATc1 (grün), [d] Kontrolle nur mit Zweitantikörpern.

Als nächstes wurde das Expressionsmuster der Phosphatasen in *in vitro*-PDLC-Kulturen untersucht (Abbildung 32 und Abbildung 33). Anhand infizierter Hepatozyten in einer PDLC-Kultur konnte die Expression von Calcineurin B den Parenchymzellen zugeordnet werden (Abbildung 32). Die Koimmunfluoreszenz von NFATc1 mit CNA und PP2A weist auch in PDLC-Kulturen die Expression der katalytischen Untereinheiten beider Phosphatasen hauptsächlich den LSECs zu (Abbildung 33).

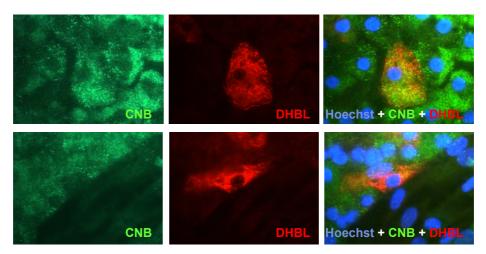


Abbildung 32: Calcineurin B-Expression in Hepatozyten in PDLC-Kulturen

DHBV-infizierte PDLC-Kulturen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen DHBL (rot) und CNB (grün) behandelt, welche anschließend durch fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper sichtbar gemacht wurden. Beide Proteine lokalisierten in denselben Zellen.

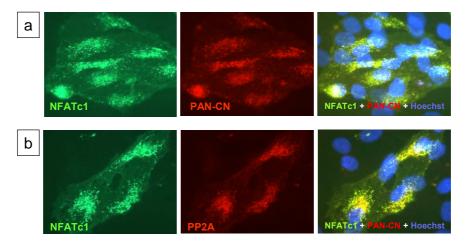


Abbildung 33: Calcineurin A- und PP2A-Expression in LSECs in PDLC-Kulturen

PDLC-Kulturen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen NFATc1 (grün) und [a] PAN-CNA (rot) bzw. [b] PP2A (rot) behandelt, die anschließend durch fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper sichtbar gemacht wurden. Sowohl CNA als auch PP2A lokalisierten in denselben Zellen wie NFATc1.

Diese Ergebnisse schließen nicht aus, dass Calcineurin und PP2A auch in den Hepatozyten der Ente exprimiert werden. Dafür spricht, dass PP2A ein ubiquitäres Enzym ist, welches in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert wird; und andererseits eine

Calcineurinaktivität in der Leber, speziell auch in Hepatozyten der Ratte, messbar ist (Webster et al., 2002). Wahrscheinlicher ist, dass die Expression der Phosphatasen im Vergleich zu LSECs viel niedriger ist und aus diesem Grund in der Immunfluoreszenzfärbung nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist aber auch denkbar, dass die Enzyme der Ente keine Kreuzreaktion mit den verwendeten Antikörpern zeigten und LSECs unspezifisch markiert wurden. Letzteres erscheint jedoch aufgrund der Tatsache, dass im Immunblot von PDLC-Lysaten eine Bande auf derselben Höhe, wie sie für Calcineurin zu erwarten ist, nachgewiesen werden konnte, unwahrscheinlich.

4.1.3 Der Einfluss von Calcineurin- und PP2A-Inhibitoren auf die DHBc-Phosphorylierung in LMH- und HuH7-Zellen

Nachdem belegt war, dass Calcineurin und PP2A endogen in HuH7- und LMH-Zellen exprimiert wurden und ihre Überexpression zur Dephosphorylierung von DHBc führte, sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Anwendung bekannter Inhibitoren beider Phosphatasen in diesen Zelllinien einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von DHBc hat. Als Inhibitor für Calcineurin wurde CsA eingesetzt; PP2A wurde mit Okadainsäure (OA) inhibiert. Darüberhinaus wurde versucht, das endogene Calcineurin durch Kalziumionophoren zu stimulieren und dadurch eine Hypophosphorylierung von DHBc zu induzieren.

4.1.3.1 Einfluss von CsA als Inhibitor und PMA/Ionomycin als Stimulatoren von Calcineurin

Sollte es gelingen, mit der Modulation der Aktivität des endogenen Calcineurin in HuH7-Zellen den Phosphorylierungsstatus von DHBc zu regulieren, würde dies auf die Beteiligung von Calcineurin bei der DHBc-Dephosphorylierung auch unter physiologischen Bedingungen hinweisen.

HuH7-Zellen wurden dafür mit pDHBV16 transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an CsA zur Inhibition von Calcineurin behandelt. In Abbildung 34 wird ersichtlich, dass bei steigender CsA-Konzentration die Expression von DHBc, DHBL und auch die von Sumo-GFP, dem koexprimierten Kontrollprotein, graduell schwächer wurde. Die CsA-Behandlung führte also zu einer generellen Abschwächung der Transgenexpression. Der Nachweis von β-Aktin in den behandelten Zellen zeigte dagegen keine vergleichbare Reduktion der Proteinmenge und die Amidoschwarzfärbung nur eine leichte Reduktion der Proteinmenge in den Lysaten von mit steigender CsA-Konzentration

behandelten Zellen. Eine Hyperphosphorylierung von DHBc, soweit dies anhand der noch vorhandenen p34 und p32-Banden beurteilt werden kann, trat nicht auf.

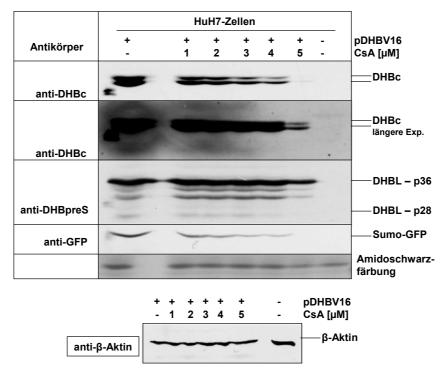


Abbildung 34: Einfluss von CsA auf transfiziertes DHBc in HuH7-Zellen

HuH7-Zellen wurden mit dem DHBV-Expressionsplasmid pDHBV16 und einem Kontrollexpressionsplasmid für Sumo-GFP transfiziert und beginnend nach der Transfektion mit der angegebenen Konzentration CsA für 5 Tage bei täglichem Mediumwechsel behandelt oder nicht behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und im Immunblot auf die Expression der angegebenen Transgene geprüft. Zur Kontrolle, ob vergleichbare Mengen an proteinhaltigen Lysaten aufgetragen wurden, wurde der Blot mit Amidoschwarz gefärbt.

Abbildung 35 zeigt ein ähnliches Ergebnis für pDHBV-3t-transfizierte LMH-Zellen. Hier wurde die Transgenexpression bereits bei einer CsA-Konzentration von 1 μM so schwach, dass DHBc nicht mehr nachweisbar war. Auch die Expression des Kontrollproteins Sumo-GFP war sehr deutlich reduziert. DHBL dagegen wurde nur geringfügig schwächer exprimiert. Aufgrund der nicht nachweisbaren DHBc-Expression konnte für dieses Experiment keine Aussage über den Phosphorylierungsstatus von DHBc nach CsA-Behandlung gemacht werden.

Insgesamt konnte durch CsA-Behandlung die Phosphataseaktivität von endogenem Calcineurin in HuH7-Zellen nicht derart inhibiert werden, dass es zu der erwarteten Hyperphosphorylierung von DHBc kam. Dies könnte bedeuten, dass die Hypophosphorylierung von DHBc durch CNmut unspezifisch erfolgte oder Calcineurin an einem Signalweg beteiligt ist, der durch seine Inhibition nicht gehemmt wird und auch bei Calcineurininhibition zur DHBc-Dephosphorylierung führt. Eine weitere Möglichkeit

wäre, dass hyperphosphoryliertes DHBc sofort durch Proteasomen abgebaut wird und deswegen nicht nachzuweisen ist. Sowohl in HuH7- als auch in LMH-Zellen dagegen wirkte sich die CsA-Behandlung aus unbekannten Gründen auf die Expression der Transgene negativ aus.

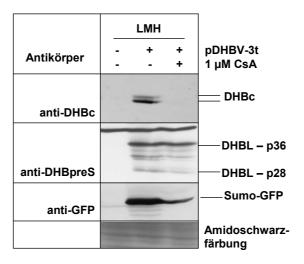


Abbildung 35: Einfluss von CsA auf transfiziertes DHBc in LMH-Zellen

LMH-Zellen wurden mit dem DHBV-Expressionsplasmid DHBV-3t und einem Kontrollexpressionsplasmid für Sumo-GFP transfiziert und beginnend nach der Transfektion mit 1 μ M CsA für fünf Tage bei täglichem Mediumwechsel behandelt oder nicht behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und im Immunblot auf die Expression der angegebenen Transgene geprüft. Zur Kontrolle, ob vergleichbare Mengen an proteinhaltigen Lysaten aufgetragen wurden, wurde der Blot mit Amidoschwarz gefärbt.

Nun wurde als entgegengesetzter Ansatz zur Überexpression der Phosphatase versucht, endogenes Calcineurin durch Behandlung mit Ionomycin und PMA zu stimulieren. Zur Kontrolle der Calcineurinaktivität diente ein Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus GFP und humanem NFATc. Dieses ist ohne Verwendung eines markierten Antikörpers im Fluoreszenz-mikroskop sichtbar. Wie Abbildung 36a zeigt, lokalisiert GFP-NFAT bei koexprimiertem konstitutiv aktivem Calcineurin in einem punktförmigen Muster im Zellkern. Ein ähnliches Bild wäre demnach auch zu erwarten, wenn die Aktivität des endogenen Calcineurins deutlich gesteigert würde.

Der Einfluss der PMA/Ionomycin-Stimulation auf die Lokalisation von exogen in HuH7-Zellen exprimiertem GFP-NFAT ist in Abbildung 36b gezeigt. Der Einsatz von Ionomycin allein oder in Kombination mit PMA führte nicht zu der erwarteten Translokation von GFP-NFAT in den Zellkern. Teilweise wurde neben der diffusen zytoplasmatischen Verteilung auch eine zellmembranständige Lokalisation beobachtet, jedoch niemals ein punktuelles Muster oder eine diffuse Verteilung von GFP-NFAT im Zellkern.

Gründe für das Scheitern der Calcineurin-Stimulation könnten darin liegen, dass die Menge an endogenem Calcineurin zu gering war, um die Masse an überexprimiertem GFP- NFAT zu dephosphorylieren. Möglich ist auch, dass sich Calcineurin in Hepatomzellen durch die üblichen Reagenzien nicht so gut wie jenes in z.B. B-Zellen stimulieren lässt (Lara-Pezzi et al., 1998).

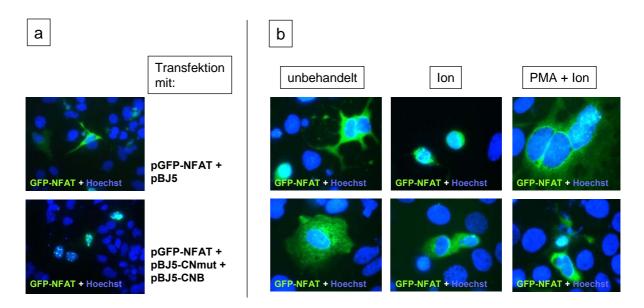


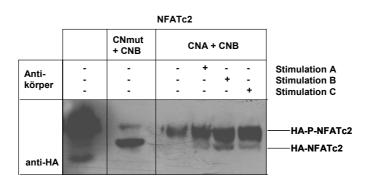
Abbildung 36: Rekombinantes GFP-NFAT wird nach Stimulation endogenen Calcineurins nicht in den Zellkern transloziert

[a] HuH7-Zellen wurden mit pGFP-NFAT transfiziert und dessen Lokalisation nach Stimulation von endogenem Calcineurin durch 40 ng/ml PMA und 1 mM Ionomycin (Ion) durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Vergrößerung 1:100, [b] HuH7-Zellen wurden mit pGFP-NFAT und pBJ5 (oben) oder pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB (unten) kotransfiziert und die Lokalisation von GFP-NFAT nach Markierung der Zellkerne durch Hoechst untersucht. Vergrößerung 1:40

Um die erste Erklärungsvariante zu prüfen, wurde weiterhin im Immunblot untersucht, ob überexprimiertes, rekombinantes Calcineurin A durch Anwendung von PMA und Ionomycin stimuliert werden kann (Abbildung 37). Dafür wurden HuH7-Zellen mit pNFATc2 und pBJ5-CNmut + pBJ5-CNB oder pBJ5-CNA + pBJ5-CNB transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen an Ionomycin und PMA stimuliert. CNmut konnte NFATc2 wie oben gezeigt fast vollständig dephosphorylieren; durch unstimuliertes CNA dagegen fand keine sichtbare NFATc2-Dephosphorylierung statt. Die Anwendung der Stimulatoren von Calcineurin führte trotz Einsatz sehr hoher Konzentrationen nicht zur vollen Aktivität von Calcineurin. Jedenfalls wurde nur ein geringer Teil des NFATc2 dephosphoryliert.

Ein ähnliches Experiment wie in Abbildung 37 ist in Abbildung 38 zu sehen. Hier wurden HuH7-Zellen mit pNFATc1 und den verschiedenen Expressionsvektoren für Calcineurin kotransfiziert. Um die Aktivität von Calcineurin zu unterdrücken, wurden die Zellen mit CsA behandelt; um Calcineurin zu aktivieren, wurden Ionomycin und PMA eingesetzt.

CNmut führte zur fast vollständigen Dephosphorylierung von NFATc1. Seine Aktivität wurde durch CsA nicht blockiert. Dies war auch zu erwarten, da die Funktion von CsA auf der gemeinsamen Bindung mit Calmodulin an Calcineurin beruht und der konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin die Calmodulin-bindende Domäne fehlt.



Stimulation A = 20 ng / ml PMA + 500 nM lonomycin Stimulation B = 40 ng / ml PMA + 1 mM lonomycin Stimulation C = 100 ng / ml PMA + 2 mM lonomycin

Abbildung 37: ektopisch exprimiertes CNA ist durch Stimulatoren nicht vollständig aktivierbar

HuH7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pNFATc2 und pBJ5-CNA bzw. pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen an PMA und Ionomycin behandelt, anschließend lysiert und im Immunblot auf den Phosphorylierungsstatus von NFATc2 hin untersucht.

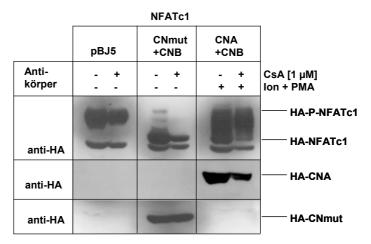


Abbildung 38: CsA unterdrückt die PMA/Ionomycin-Stimulation von CNmut nicht und von CNA nur geringfügig

HuH7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pNFATc1 und pBJ5-CNA bzw. pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen über Nacht mit 40 ng/ml PMA und 1 mM Ionomycin behandelt, anschließend lysiert und im Immunblot auf die Expression von NFATc1, CNA und CNmut untersucht.

Wurden die mit Expressionsvektoren für CNA und CNB transfizierten Zellen mit Ionomycin und PMA behandelt, wurde NFATc1 nur teilweise dephosphoryliert. Die gleichzeitige Anwendung von CsA führte zu einer nur geringfügigen Verhinderung der Dephosphorylierung. Dieses Ergebnis ist zusammen mit den in Abbildung 34 und 4.1.1.2

gezeigten Resultaten ein Hinweis, dass Calcineurin in Leberzellen bzw. Hepatomzellen möglicherweise nicht effektiv durch CsA gehemmt werden kann.

Schließlich wurde versucht, durch Stimulation von durch Transfektion exprimiertem CNA in HuH7- und LMH-Zellen mit Ionomycin und PMA die Dephosphorylierung von DHBc zu verstärken (Abbildung 39). Dabei wurde deutlich, dass überexprimiertes CNA zu einer leichten Dephosphorylierung von DHBc nur in HuH7-Zellen und nicht in LMH-Zellen führte. Zugleich gelang es nicht, das rekombinante Calcineurin mit Ionomycin/PMA-Behandlung zu einer deutlich verstärkten Dephosphorylierung von DHBc anzuregen.

Insgesamt kann daher festgehalten werden, dass weder der Calcineurin-Inhibitor CsA noch die Calcineurin-Stimulatoren Ionomycin/PMA eine effektive Regulation von Calcineurin in HuH7- und LMH-Zellen erlaubten.

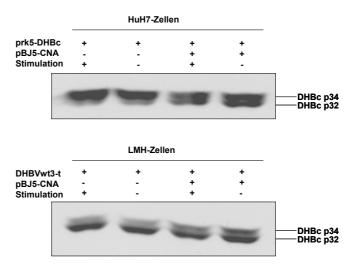


Abbildung 39: Calcineurin-Stimulation hat nur einen geringen Einfluss auf die Dephosphorylierung von DHBc in HuH7-Zellen, gar keinen nachweisbaren in LMH-Zellen

HuH7- und LMH-Zellen wurden mit Plasmiden, die zur Expression von DHBc führen, transfiziert. Zum Teil wurde ein Expressionsvektor für CNA kotransfiziert. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion mit 500 mM Ionomycin und 40 ng/ml PMA über Nacht stimuliert, anschließend lysiert und die Lysate im Immunblot auf Expression von DHBc hin untersucht.

4.1.3.2 Inhibition von PP2A mittels Okadainsäure

Schließlich sollte der Einfluss des PP2A-Inhibitors Okadainsäure (OA) auf die Dephosphorylierung von DHBc untersucht werden. Zunächst wurden D2-Zellen und PDLCs mit Konzentrationen von 0 μM bis 1 mM OA über einen Zeitraum von mehreren Tagen behandelt, da nichts über die Membrangängigkeit der Substanz in diesen Zellen bekannt war (siehe Abschnitt 2.4.1.2). Abbildung 40 zeigt, dass es nach OA-Behandlung in D2-Zellen nicht zur Hyperphosphorylierung von DHBc kam. Allerdings konnten auf D2-Zellen keine höheren Konzentrationen als 10 μM OA angewandt werden, da es dabei zum

Absterben aller Zellen kam. In DHBV-infizierten PDLCs wurde ebenfalls keine veränderte DHBc-Phosphorylierung gefunden. Jedoch erhöhte sich hier mit steigender OA-Konzentration die Menge an intrazellulärem DHBc-Protein. Erst 1 mM OA schädigte die PDLCs so stark, dass die Expression von DHBc geringer wurde. Mit steigender Menge an DHBc wurde immer weniger DHBL-p28-Protein in den Zellen gefunden, während die Menge an DHBL-p36-Protein leicht zunahm. Die mit erhöhter Konzentration an OA abnehmende Menge an β-Aktin zeigt eine Schädigung der Zellen an. Die lichtmikroskopische Begutachtung der Zellen zeigte, dass sich die Anzahl an Nicht-Parenchymzellen bei hoher OA-Konzentration verringerte, während die Menge an Hepatozyten vergleichbar war (nicht gezeigt). Bei 1 mM OA waren kaum mehr Nicht-Parenchymzellen übrig, was auch durch das fehlende PP2A-Signal belegt wird.

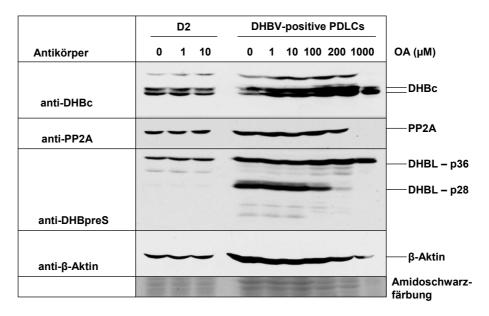


Abbildung 40: Einfluss von Okadainsäure auf die Phosphorylierung von DHBV in PDLCs

D2-Zellen und kongenital DHBV-infizierte PDLCs wurden für 5 Tage mit verschiedenen Dosen an OA bei täglichem Mediumwechsel behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Expression von viralen und zellulären Proteinen im Immunblot untersucht. OA = Okadainsäure

Schließlich wurde untersucht, ob OA die Aktivität von rekombinanter PP2A in LMH-Zellen verhindern kann (Abbildung 41). pBJ5-PP2A- und pDHBV-3t-kotransfizierte LMH-Zellen wurden unter der höchstmöglichen Dosis an OA und ohne OA gehalten. Die Behandlung ergab keine sichtbare Veränderung des Bandenmusters von DHBc gegenüber unbehandelten, kotransfizierten Zellen.

Insgesamt kann daher festgehalten werden, dass entweder OA die Aktivität von PP2A aus zellbiologischen Gründen nicht inhibieren konnte oder PP2A nicht direkt an der Dephosphorylierung von DHBc beteiligt ist.

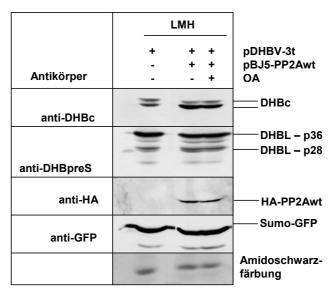


Abbildung 41: Einfluss von Okadainsäure auf die Phosphorylierung von DHBV in transfizierten LMH-Zellen

LMH-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für DHBV und PP2A und dem Kontrollexpressionsplasmid pSumo-GFP transfiziert. Direkt nach der Transfektion begann eine 5-tägige Behandlung mit $10~\mu M$ OA bei täglichem Mediumwechsel. Dann wurden die Zellen lysiert und auf die Expression der angegebenen Transgene im Immunblot untersucht.

OA = Okadainsäure

4.1.3.3 Beteiligung von Proteasomen am Abbau von hyperphosphoryliertem Kapsidprotein

Wie oben beschrieben, wurde beobachtet, dass durch Transfektion exprimiertes DHBc unter CsA-Behandlung bei Konzentrationen von 1 und 5 μ M entsprechend in LMH- und HuH7-Zellen ein stark vermindertes Signal im Immunblot ergab (4.1.3.1). Es erschien daher möglich, dass hyperphosphoryliertes DHBc von Proteasomen so schnell abgebaut wurde, dass es praktisch nicht nachweisbar war. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Proteasominhibitoren (PI) Velcade und MG-132 eingesetzt. Zunächst wurden die höchstmöglichen Konzentrationen an Velcade und MG-132 bestimmt, die eingesetzt werden konnten, ohne zum Zelltod zu führen (Abbildung 42). Für Velcade lag diese Konzentration bei 0,1 μ M und für MG-132 bei 1 μ M. Bei diesen Konzentrationen veränderte sich das Muster der in das Medium sekretierten Proteine - ein Hinweis auf die Wirkung der Inhibitoren - deutlich, ohne dass die Zellen abstarben.

Als nächstes wurden mit pDHBV16-transfizierte und CsA-behandelte oder unbehandelte HuH7-Zellen mit den ermittelten maximalen Konzentrationen an Velcade und MG-132 behandelt, um zu untersuchen, ob die vermutete Degradation des DHBc unter CsA-Behandlung verhindert werden kann (Abbildung 43).

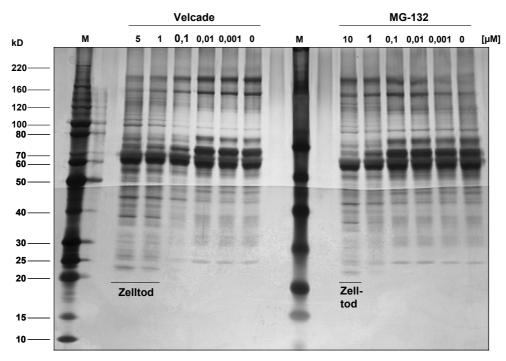


Abbildung 42: Bestimmung der Toxizität von Proteasominhibitoren für HuH7-Zellen

HuH7-Zellen wurden für 2 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Velcade oder MG-132 gehalten. Aus den Zellüberständen wurden tote Zellen pelletiert und die geklärten Überstände in einem 5-20%-igen PAA-Gel aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Silberfärbung des Gels sichtbar gemacht. M = Größenstandard

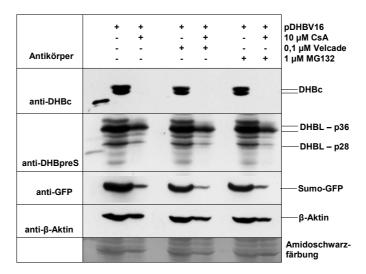


Abbildung 43: Immunblotanalyse der Transgenexpression nach Proteasominhibitor-Behandlung transfizierter HuH7-Zellen

HuH7-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für DHBV16 und dem Kontrollexpressionsvektor pSumo-GFP transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurde die Zellen für 2 Tage entweder nicht behandelt, mit 10 μ M CsA oder mit 10 μ M CsA und entweder Velcade oder MG132 behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die angegebenen Proteine im Immunblot analysiert.

Dafür wurden mehrere Zellkulturschalen jeweils parallel transfiziert und daraufhin sofort entweder mit oder ohne CsA-Zugabe PI-behandelt oder kontrollbehandelt. Abbildung 43 zeigt, dass die Proteasominhibitoren keinen Einfluss auf die Expression von DHBc,

DHBL, rekombinantem Sumo-GFP und β-Aktin in nicht-CsA-behandelten Zellen hatten. Insbesondere erhöhte sich deren Expression nicht. Die Behandlung der Zellen mit Proteasominhibitoren zusätzlich zu 10 μM CsA konnte den Mangel der DHBc-Expression nicht verhindern. Das rekombinante Sumo-GFP, welches zur Kontrolle der Transfektionseffizienz koexprimiert wurde, zeigt ebenfalls ein stark verringertes Signal unter CsA-Behandlung trotz Einsatzes der Proteasominhibitoren.

Obwohl die hohe CsA-Konzentration auch einen antiproliferatorischen Effekt auf die Zellen hatte, wie der β-Aktin-Blot und die Amidoschwarzfärbung in Abbildung 43 zeigen, ist der Einfluss von CsA auf die Transgenexpression sehr viel größer, als dass er allein dadurch erklärbar wäre. Vermutlich kommt es nicht zu einem quantitativen Abbau von hyperphosphoryliertem DHBc durch Proteasomen. Der Einfluss von CsA auf das rekombinante Sumo-GFP deutet darauf hin, dass möglicherweise ein inhibitorischer Effekt von CsA auf verschiedene Promotoren vorliegt. Die Wirkung auf die DHBL-Expression war hierbei weniger stark ausgeprägt. Möglicherweise wird der virale Promotor, der die Expression der Hüllproteine treibt, weniger von CsA beeinflusst.

Insgesamt wurde leider keine Möglichkeit gefunden, auf die intrazelluläre Dephosphorylierung von DHBc durch Modulation der endogenen Phosphataseaktivitäten einen Einfluss zu nehmen. Um den Einfluss der Phosphorylierung im Lebenszyklus des Virus weiter untersuchen zu können, musste darum auf die Überexpression der rekombinanten, konstitutiv aktiven Phosphatasen zurückgegriffen werden.

4.1.4 Konsequenzen der Hypophosphorylierung durch Calcineurin für virale Replikation und Infektiosität von DHBV

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die durch CNmut- und PP2A-Expression hervorgerufene Dephosphorylierung von DHBc in HuH7-Zellen einen Einfluss auf die Replikation, Reifung und Infektiosität eventuell entstehender Virionen hat. Bei Berücksichtigung der publizierten Daten verschiedener DHBc-Mutanten (Yu and Summers, 1994a) wird erwartet, dass die Virusreplikation behindert ist und nur wenig infektiöses Virus entsteht.

4.1.4.1 Die Replikation von DHBV in HuH7-Zellen

Die intrazelluläre Replikation von DHBV kann anhand der Ausbildung von replikativen Intermediaten der viralen DNA in transfizierten Zellen untersucht werden. Während die

virale Proteinexpression eher die Transfektionseffizienz widerspiegelt, kann anhand der Ausbildung von rcDNA erkannt werden, ob es zur Ausbildung von reifen Nukleokapsiden kommt.

Abbildung 44 zeigt die Transfektion von HuH7-Zellen mit Expressionsvektoren für DHBV, CNmut und für das als Kontrollprotein verwendete Sumo-GFP.

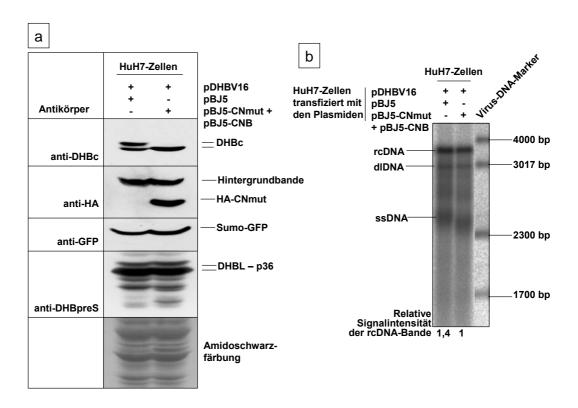


Abbildung 44: Einfluss der DHBc-Dephosphorylierung durch CNmut auf die intrazelluläre Proteinexpression und DNA-Replikation

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHBV16, CNmut und CNB oder dem Vektor pBJ5 und dem Kontrollexpressionsvektor für Sumo-GFP transfiziert. Die Zellen wurden vom zweiten Tag nach der Transfektion an für weitere 4 Tage ohne Serum gehalten und anschließend der Überstand für die Infektion und Analyse der enthaltenen Virionen gesammelt. Ein Teil der Zellen wurde im Immunblot auf Proteinexpression analysiert [a] und aus dem zweiten Teil wurde die virale DNA extrahiert, die durch Southern Blot analysiert wurde [b]. Die Quantifikation der rcDNA-Bande erfolgte mithilfe eines Phosphoimagers. rcDNA = offen zirkuläre DNA, ssDNA = einzelsträngige DNA, dlDNA = doppelsträngig-lineare DNA

Es wurden sowohl die intrazelluläre Proteinexpression, als auch die Art und relative Menge an viraler DNA bei Koexpression von CNmut untersucht. Auf der Proteinebene wird deutlich, dass bei Koexpression von CNmut die p34-Bande von DHBc nicht mehr nachzuweisen ist. Gleichzeitig bleibt die Expression der Phosphovariante von DHBL erhalten. Die Expressionsmenge der viralen Proteine und des Kontrollproteins Sumo-GFP waren in CNmut- und kontrolltransfizierten Zellen sehr ähnlich (Abbildung 44a). Die Mengen an intrazellulärer viraler DNA waren überraschenderweise ebenfalls sehr ähnlich. Die Menge an rcDNA in kontrolltransfizierten Zellen war nur um den Faktor 1,4 höher als

die in CNmut-transfizierten Zellen. Auch die Mengen an dlDNA und ssDNA waren sehr ähnlich. Der leichte Größenunterschied der ssDNAs war in anderen Experimenten z.T. nicht reproduzierbar. Ihm wurde daher auch keine große Relevanz zugeordnet. Die sichtbare Dephosphorylierung von DHBc hatte also keinen deutlichen Einfluss auf die Ausbildung von replikativen DNA-Intermediaten. Insbesondere kam es zur Ausbildung von Nukleokapsiden, ersichtlich aus der Existenz von rcDNA. In weiteren Experimenten sollte herausgefunden werden, ob unter diesen Bedingungen auch reife Virionen sekretiert werden und diese infektiös in PDLC-Kulturen sind.

4.1.4.2 Bildung von SVPs und Virionen

Es war nach wie vor denkbar, dass das Fehlen einer bestimmten Phosphorylierungsstelle es dem Nukleokapsid nicht mehr ermöglicht, das für die Umhüllung erforderliche Reifesignal nach außen zu übermitteln. Dadurch würde es zum Fehlen von Virionen im Mediumüberstand der transfizierten HuH7-Zellen kommen. Um diese Möglichkeit zu prüfen, diente ein Teil der Mediumüberstände, die von den transfizierten Zellen in oben erwähnten Experimenten (4.1.4.1) erhalten wurden, der Extraktion von Virion-DNA. Hierfür war es notwendig, zunächst nackte Kapside und die darin enthaltene DNA zu verdauen, da sie die Quantifizierung von Virion-DNA verfälschen würden. Ein weiteres Aliquot der Überstände wurde für den Nachweis von DHBL im Immunblot als Indikator für die SVP-Sekretion verwendet. Für die Sekretion von SVPs genügt bereits das Vorhandensein von DHBL-Proteinen in einer Zelle. Da auch Virionen zum extrazellulären Signal von DHBL beitragen, aber in nur einem Verhältnis von ca. 1:1 000 gegenüber SVPs vertreten sind, war nicht zu erwarten, dass eine erhöhte oder verminderte Anzahl an extrazellulären Virionen eine Veränderung des DHBL-Signals zur Folge haben würde. Abbildung 45a zeigt, dass, wie erwartet, keine wesentlichen Unterschiede in der Menge sekretierter SVPs zwischen CNmut- und kontrolltransfizierten Zellen bestanden. Die virale DNA aus Virionen im Medium wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und im Southern Blot mit einer radioaktiv markierten Sonde nachgewiesen. Es war keine ssDNA nachweisbar, die auf eine noch nicht abgeschlossene reverse Transkription hingewiesen hätte. Dagegen wurden rc- und dlDNA in vergleichbaren Mengen gefunden. Die Phosphoimager-Signale der rcDNA wurden quantifiziert. Dabei unterschieden sich die Mengen in den Überständen CNmut- und kontrolltransfizierter Zellen lediglich um den Faktor 1,1 (Abbildung 45b). Somit hatte die Dephosphorylierung von DHBV in CNmutexprimierenden HuH7-Zellen keine verminderte Virionsekretion zur Folge. Kapside aus hypophosphoryliertem DHBc waren also zur Reifung, Umhüllung und Sekretion fähig.

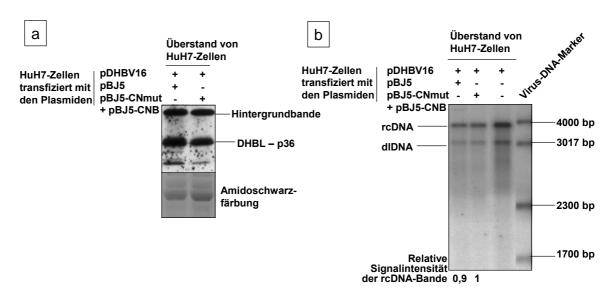


Abbildung 45: SVP- und Virionproduktion aus DHBV- und CNmut-koexprimierenden HuH7-Zellen

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHBV16, CNmut und CNB oder mit dem Vektor pBJ5 und dem Kontrollexpressionsvektor für Sumo-GFP transfiziert. Die Zellen wurden vom zweiten Tag nach der Transfektion an für weitere 4 Tage ohne Serum gehalten und anschließend die Überstände für die Weiterinfektion und die Analyse der enthaltenen Virionen gesammelt. [a] 100 µl Überstand wurden im Immunblot auf DHBL-Expression hin analysiert. [b] Virale Partikel aus 4 ml des Mediums wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert. Daraus wurde die Virionen-DNA extrahiert und im Southern Blot analysiert. Die Quantifikation der rcDNA-Bande erfolgte mithilfe eines Phosphoimagers. rcDNA = offen-zirkuläre DNA, dlDNA = doppelsträngig-lineare DNA

4.1.4.3 Infektiosität der Virionen

Nachdem es bei CNmut-Koexpression zur Sekretion von Virionen kam, sollte geprüft werden, ob diese infektionskompetent waren. Schließlich war es denkbar, dass die fehlende Phosphorylierung oder vielleicht die Inkorporation einer konstitutiv aktiven Phosphatase in Virionen verhinderte, dass eine nachfolgende Infektion möglich war.

Die Virion-haltigen Überstände der transfizierten HuH7-Zellen wurden durch niedrigtourige Zentrifugation von toten Zellen befreit und ohne weitere Konzentration für die Infektion von DHBV-negativen PDLCs eingesetzt. Die infizierten PDLCs wurden für die Replikation der Viren 8 Tage gehalten und anschließend geerntet. Ein Teil der Zellen wurde für die Analyse der intrazellulären Proteine im Immunblot genutzt (Abbildung 46a). Aus dem zweiten Teil der Zellen wurde die zytoplasmatische virale DNA isoliert und im Southern Blot analysiert (Abbildung 46b). Ein dritter Teil der PDLCs wurde für den Nachweis von Virusprotein durch Immunzytochemie verwendet (Abbildung 47).

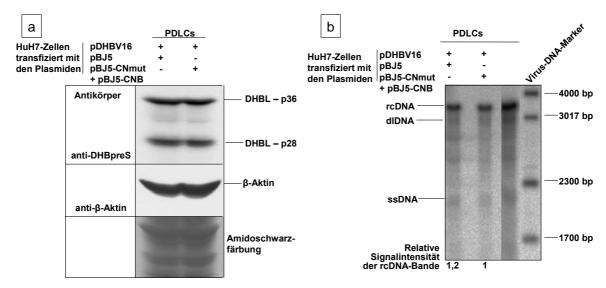


Abbildung 46: Infektiosität von Virionen aus CNmut-exprimierenden HuH7-Zellen

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHBV16, CNmut und CNB oder mit dem Vektor pBJ5 und dem Kontrollexpressionsvektor für Sumo-GFP transfiziert. Die Zellen wurden vom zweiten Tag nach der Transfektion an für weitere 4 Tage ohne Serum gehalten und die erhaltenen Überstände für die Infektion und Analyse der enthaltenen Virionen gesammelt. [a] Immunblot infizierter PDLCs. [b] Southern Blot der viralen DNA infizierter PDLCs. Die Quantifikation der rcDNA-Bande erfolgte mithilfe eines Phosphoimagers. rcDNA = offen zirkuläre DNA, ssDNA = einzelsträngige DNA, dlDNA = doppelsträngig-lineare DNA

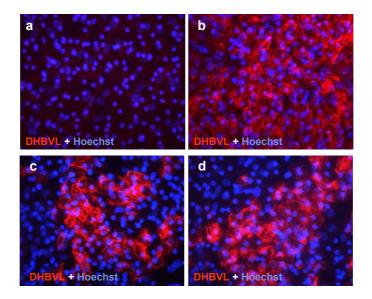


Abbildung 47: Infektiosität von Virionen aus transfizierten HuH7-Zellen

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHBV16, CNmut und CNB oder mit dem Vektor pBJ5 und dem Kontrollexpressionsvektor für Sumo-GFP transfiziert. Die Zellen wurden vom zweiten Tag nach der Transfektion an für weitere 4 Tage ohne Serum gehalten und die erhaltenen Überstände für die Infektion gesammelt. DHBV-negative PDLC-Kulturen wurden über Nacht mit den HuH7-Überständen inkubiert und anschließend gewaschen. Nach weiteren 7 Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert und mittels Immunhistochemie auf DHBV-Infektion untersucht. [a] Infektion mit Überstand von nicht-transfizierten HuH7-Zellen [b] Infektion mit D2-Zellüberstand. [c] Infektion mit Überstand aus DHBV16 und pBJ5-Kontrollvektor-transfizierten HuH7-Zellen. [d] Infektion mit Überstand von pDHBV16 und pBJ5-CNmut+pBJ5-CNB-transfizierten HuH7-Zellen.

Die Effizienz der Infektion von PDLCs war mit Überständen von pBJ5- oder pBJ5-CNmut-kotransfizierten HuH7-Zellen annähernd gleich. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der intrazellulären Expression von DHBL-Protein beobachtet (Abbildung 46a), und auch die Menge an rcDNA in den infizierten PDLCs unterschied sich nur um den Faktor 1,2 (Abbildung 46b). Die Immunzytochemie mit dem anti-DHBpreS-Antikörper zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Infektiosität oder dem Infektionsmuster der Virionen aus pBJ5- oder pBJ5-CNmut-kotransfizierten HuH7-Zellen (Abbildung 47).

Die Dephosphorylierung von DHBc in CNmut-exprimierenden Zellen führte damit offensichtlich zur Sekretion von reifen, infektionskompetenten Virionen in etwa gleicher Menge im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor.

4.1.4.4 Abhängigkeit der Infektionseffizienz von Variationen der Transfektionseffizienz

Einige der Kotransfektionen von DHBV mit CNmut in HuH7-Zellen führten im Vergleich zur Kontrolltransfektion mit dem leeren Vektor zu einer verringerten Expression der Transgene inklusive des zur Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels Kotransfektion exprimierten Sumo-GFP (Abbildung 48a). In diesen Fällen wurde intrazellulär auch eine geringere Menge an viraler DNA beobachtet (Abbildung 48b). Bei der Quantifizierung des hier dargestellten Experiments ergab sich eine um das 8-fache verringerte Menge an intrazellulärer rcDNA bei koexprimiertem CNmut. Trotzdem war das Verhältnis von extrazellulären Virionen bei der Kontrolltransfektion im Vergleich zur CNmut-Expression nur 2:1 (Abbildung 48c). Interessanterweise wurde dasselbe Verhältnis bei der Analyse der Expression intrazellulärer rcDNA in mit diesen Überständen infizierten PDLC-Kulturen beobachtet (Abbildung 48d).

Aus den Überständen dieser infizierten PDLCs wurde außerdem durch semiquantitative PCR die DHBV-Virion-DNA amplifiziert und durch Southern Blot mit einer radioaktivmarkierten DHBV-DNA-Sonde sichtbar gemacht (Abbildung 49). Die vergleichende Quantifizierung des Verhältnisses der Amplifikationsprodukte aus der Infektion mit Überständen aus der Kontrolltransfektion und der Infektion mit Überständen aus der CNmut-Expression ergab 1,7:1; ein Verhältnis fast identisch mit dem der Virion-DNA-Menge in den zur Infektion verwendeten Überständen.

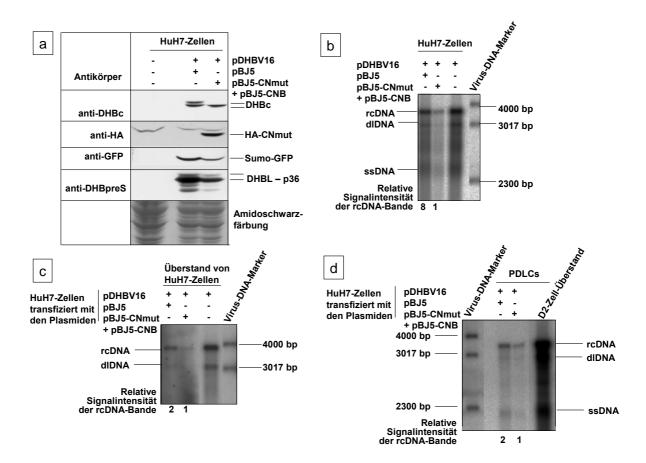


Abbildung 48: Die Variation der Transfektionseffizienz korreliert mit der Infektionseffizienz

HuH7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für DHBV und CNmut oder dem leeren Kontrollvektor pBJ5 und dem Expressionsplasmid für Sumo-GFP zur Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert und die Expression der viralen Proteine, die intrazelluläre Replikation und Infektiosität der Nachkommenvirionen des DHBV untersucht. [a] Immunblot der Expression der Transgene in den transfizierten HuH7-Zellen, [b] Southern Blot-Analyse der viralen DNA in transfizierten HuH7-Zellen, [c] Southern Blot-Analyse der Virion-DNA im Überstand transfizierter HuH7-Zellen, [d] Southern Blot-Analyse viraler DNA in mit den Überständen der transfizierten HuH7-Zellen infizierten PDLC-Kulturen. Die Quantifizierung der rcDNA-Banden erfolgte anhand der Phosphoimagerdaten.

rcDNA = offen zirkuläre DNA, ssDNA = einzelsträngige DNA, dlDNA = doppelsträngig-lineare DNA

Die Ergebnisse dieses und des obigen Experiments zeigen, dass weder die Sekretion von reifen Virionen noch deren Infektiosität durch die Hypophosphorylierung mit koexprimiertem, konstitutiv aktivem Calcineurin behindert wurden. Im Gegenteil lässt sie möglicherweise sogar eine leicht beschleunigte Reifung von Virionen zu, wie in Abbildung 48c das verbesserte Verhältnis von Virionen im Überstand im Vergleich zur intrazellulären Menge an rcDNA in Abbildung 48b vermuten lässt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Hypophosphorylierung des Kapsidproteins von DHBV durch Überexpression von CNmut keinen negativen Einfluss auf Virusreplikation und Infektiosität hatte.

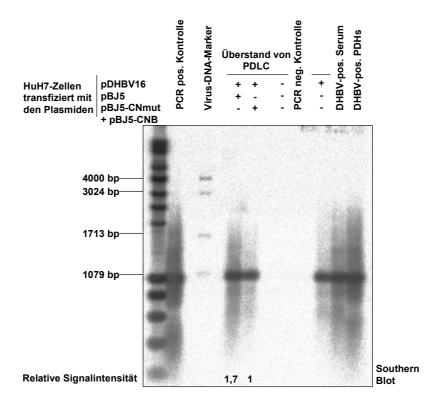


Abbildung 49: Die Variationen der Transfektionseffizienz korrelieren mit denen der Infektionseffizienz

Die Infektiosität der Nachkommenvirionen aus transfizierten HuH7-Zellen von Abbildung 48 wurde durch Übertragung des Überstandes auf PDLCs untersucht. Dann wurden die Überstände der infizierten PDLCs 7 Tage nach Infektion mittels semiquantitativer PCR auf die Menge an DHBV-DNA überprüft. Die Amplifikationsprodukte wurden in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch einen Southern Blot mit radioaktiv-markierter Sonde nachgewiesen. Die Quantifizierung der Amplifikationsprodukte erfolgte anhand der Phosphoimagerdaten.

4.1.5 Konsequenz der Hypophosphorylierung durch PP2A für virale Replikation und Infektiosität von DHBV

Zusätzlich zur Hypophosphorylierung von DHBc durch Calcineurin wurde auch die Möglichkeit der Dephosphorylierung durch PP2A geprüft, da die Analyse der Phosphorylierungsmotive Anhaltspunkte dafür ergab, dass PP2A als endogene Phosphatase in Frage kommen könnte. Es stand ein Konstrukt zur Expression der katalytischen Wildtyp-Untereinheit von PP2A (PP2Awt) zur Verfügung und eines, welches eine dominant negative Variante der katalytischen Untereinheit von PP2A (PP2Adn) kodiert. Diese beiden Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pBJ5 kloniert, um im selben Plasmid-Hintergrund wie bei Calcineurin arbeiten zu können.

PP2Awt und PP2Adn wurden zusammen mit DHBV16 und Sumo-GFP zur Transfektionskontrolle in HuH7-Zellen exprimiert. Die Expression der rekombinanten

Proteine, die Bildung der intrazellulären viralen DNA (Abbildung 50) sowie die Sekretion von Virionen und deren Infektiosität (Abbildung 51 und Abbildung 52) wurden untersucht.

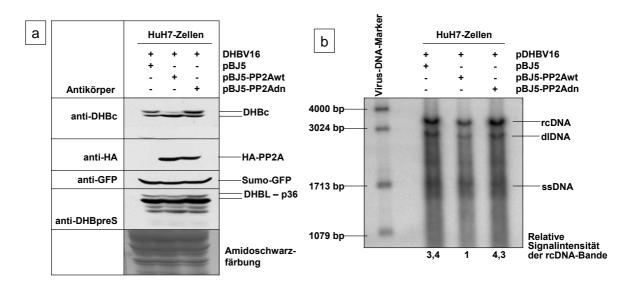


Abbildung 50: Einfluss der Koexpression von PP2Awt und PP2Adn auf die intrazelluläre Proteinexpression und DNA-Replikation von DHBV

HuH7-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für DHBV und PP2Awt, PP2Adn oder mit dem leeren Kontrollvektor pBJ5 und dem für Sumo-GFP zur Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Die Expression der viralen Proteine und die intrazelluläre Replikation der DHBV-DNA wurden 5 Tage nach der Transfektion untersucht. [a] Immunblot der Expression der angegebenen Transgene in den transfizierten HuH7-Zellen, [b] Southern Blot der viralen DNA in transfizierten HuH7-Zellen. Die Quantifizierung der rcDNA-Banden erfolgte anhand der Phosphoimagerdaten.

rcDNA = offen zirkuläre DNA, ssDNA = einzelsträngige DNA, dlDNA = doppelsträngig-lineare DNA

In Abbildung 50a ist gut zu erkennen, dass auch die Überexpression von PP2Awt zusammen mit DHBV zu einer Dephosphorylierung von DHBc führte, nicht aber von DHBL, denn das Signal für die Phosphobande des DHBL blieb unverändert bestehen. Die DHBc-Phosphovarianten, die die p34-Bande bilden, wurden jedoch nicht vollständig dephosphoryliert, denn eine schwache p34-Bande blieb erhalten. Die Überexpression von PP2Adn führte nicht nur zum Erhalt der Phosphorylierung von DHBc, sondern zu einer leichten Hyperphosphorylierung, wie man es erwarten würde, wenn die endogene PP2A von der dominant negativen Form an der Dephosphorylierung zum Teil gehindert wird. Evidenz dafür ist, dass die p34-Bande des DHBc stärker ist als bei der Kontrolltransfektion. Geringgradig verstärkte sich jedoch auch die Phosphobande des DHBL, obwohl die Expression des PP2A-Wildtypproteins keine Dephosphorylierung von DHBL bewirkte. Wegen des vergleichbaren Signals koexprimierten Sumo-GFPs kann man von vergleichbarer Transfektionseffizienz ausgehen. Trotzdem wurden Unterschiede in der Menge an intrazellulärer viraler DNA beobachtet. Wobei die Verhältnisse von replikativen DNA-Intermediaten zu rcDNA erhalten blieben. Die Quantifizierung der rcDNA-Banden

der Kotransfektionen ergab ein Verhältnis von 3,4 : 1 beim Vergleich der Kontroll- und PP2Awt-Kotransfektion und sogar ein Verhältnis von 4,3 : 1 beim Vergleich der PP2Adnund PP2Awt-Kotransfektion. Das Mengenverhältnis an rcDNA von Kontroll- zu PP2Adn-Kotransfektion betrug 1 : 1,2 und war damit annähernd gleich.

Wurden die 7 Tage nach der Transfektion erhaltenen Überstände der transfizierten HuH7-Zellen auf Virionen untersucht und für die Infektion von PDLCs eingesetzt, so wurde beobachtet, dass sich das Verhältnis der rcDNA von Kontroll- zu PP2Awt-Kotransfektion sowohl in der Menge an Virionen in den Überständen (Abbildung 51a) als auch in der Infektionseffizienz (Abbildung 51b) widerspiegelte. Die Menge an sekretierten Virionen im Überstand PP2Adn-exprimierender HuH7-Zellen jedoch war unerwarteterweise gegenüber der Kontrolltransfektion dreifach erhöht. Trotzdem führte diese erhöhte Zahl an Virionen nicht zu einer entsprechend erhöhten Infektiosität im Vergleich zu den Überständen der Kontrolltransfektion (Abbildung 51b).

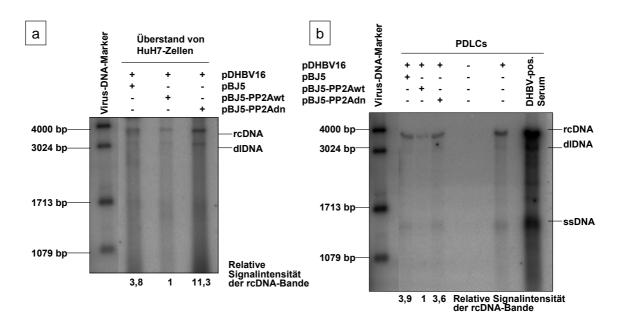


Abbildung 51: Einfluss der Koexpression von PP2Awt und PP2Adn auf die Virionproduktion und Infektiosität von DHBV

HuH7-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für DHBV und PP2Awt, PP2Adn oder mit dem leeren Kontrollvektor pBJ5 und dem für Sumo-GFP zur Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert. [a] Die Menge der in den Überstand sekretierten Virionen wurde 7 Tage nach der Transfektion durch Southern Blot-Analyse untersucht. [b] Die Infektiosität der Überstände wurde durch Southern Blot-Analyse der intrazellulären viralen DNA in PDLCs geprüft. Die Quantifizierung der rcDNA-Banden erfolgte anhand der Phosphoimagerdaten.

rcDNA = offen zirkuläre DNA, ssDNA = einzelsträngige DNA, dlDNA = doppelsträngig-lineare DNA

Der Vergleich der Mengen an intrazellulärem DHBL in den infizierten PDLCs führte zu einem ähnlichen Ergebnis (Abbildung 52). Die Menge von intrazellulärem DHBL in

PDLCs, die mit Überständen aus PP2Awt-exprimierenden HuH7-Zellen infiziert worden waren, war dagegen stark verringert.

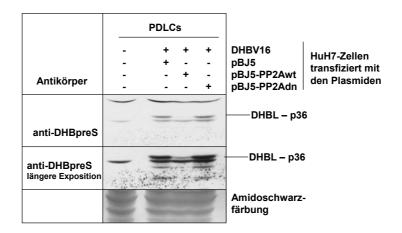


Abbildung 52: Einfluss der Koexpression von PP2Awt und PP2Adn auf die Infektiosität von DHBV

HuH7-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für DHBV und PP2Awt, PP2Adn oder mit dem leeren Kontrollvektor pBJ5 und dem für Sumo-GFP zur Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert. Die Infektiosität der Virionen in den Überständen wurde 7 Tage nach Transfektion durch Infektion von PDLCs untersucht. Sieben Tage nach der Infektion wurden die PDLCs im Immunblot bezüglich der Expression des viralen Hüllproteins DHBL getestet.

Die PP2Awt-Überexpressionsexperimente erlauben die Schlussfolgerung, dass durch die erhöhte Phosphataseaktivität die Replikation von DHBV leicht behindert wurde. Es wurden jedoch trotzdem in jedem Fall reife Virionen produziert, die sekretiert wurden und für PDLC-Kulturen infektiös waren.

Die PP2Adn-Überexpression hatte keinen deutlichen Einfluss auf die intrazelluläre virale **DNA-Replikation** transfizierten HuH7-Zellen. Neben einer leichten in Hyperphosphorylierung wurde jedoch ein Anstieg an exportierten Virionen um den Faktor 3 beobachtet. Zugleich konnte keine gleichermaßen erhöhte Infektiosität im Vergleich zur Kontrolltransfektion gefunden werden. Eine derartige Differenz war in anderen Experimenten nicht beobachtet worden, darum ist der wahrscheinlichste Grund für die hohe Menge an viraler DNA in den Überständen ein unvollständiger Verdau der nackten Kapside, deren DNA dann zur Gesamt-DNA-Menge beitrug und diese erhöhte. Andererseits wäre dies ein Hinweis auf das Vorhandensein von infektionsinkompetenten Virionen.

4.2 Experimentelle Ansätze zur Bestimmung der intrazellulären Restphosphorylierung von DHBc nach der Koexpression von konstitutiv aktivem Calcineurin und PP2A

Das Ergebnis, dass die weitgehende Dephosphorylierung von DHBc durch CNmut keinen und durch PP2A nur einen relativ geringen Einfluss auf die Replikation des DHBV hatte, war eher unerwartet, da andere Daten darauf hindeuteten, dass bereits die Mutation einer einzigen Phosphorylierungsstelle, S245, zu Alanin einen starken repliktionshemmenden Effekt hatte. Es erschien daher wichtig herauszufinden, welche der sechs Phosphorylierungsstellen durch die Überexpression der Phosphatasen betroffen waren und wie hoch der Anteil der Restphosphorylierung war. Die Darstellung der Phosphovarianten in der SDS-PAGE war unbefriedigend. Zwar war belegt, dass p34 lediglich phosphoryliertes DHBc enthielt, doch war nicht auszuschließen, dass auch p32 Phosphovarianten von DHBc enthielt. Weitestgehend ungeklärt ist auch die Frage, welche und wie viele der Phosphorylierungsstellen gleichzeitig phosphoryliert vorliegen können. Es musste eine Methode gefunden werden, mehr als nur zwei DHBc-Spezies darzustellen. Mehrere Versuche durch Zusatz von Harnstoff in PAA-Gelen eine bessere Auftrennung der Phosphovarianten von DHBc zu erreichen, blieben ohne ausreichenden Erfolg. Daher rückte die zweidimensionale Gelelektrophorese ins Blickfeld.

4.2.1 2D-Gelelektrophorese

Um zu einer Vorstellung von der Position des phosphorylierten DHBc im 2D-Gel zu gelangen, wurden die isoelektrischen Punkte für mögliche DHBc-Phosphovarianten berechnet. Hierfür wurde der "Scansite Molecular Weigt & Isolectric Point Calculator" (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) verwendet. In Tabelle 2 sind die erwarteten isoelektrischen Punkte für 0 bis 6 Phosphorylierungen an DHBc aufgeführt. Der isoelektrische Punkt von dephosphoryliertem DHBc liegt nach dieser Berechnung bei 9,56. Bei einer isoelektrischen Fokussierung würde an dieser Stelle rund die Hälfte der DHBc-Proteine zu erwarten sein, wenn man davon ausgeht, dass diese von der unteren Bande im Immunblot repräsentiert werden. Die andere Hälfte des Signals müsste sich auf isoelektrische Punkte zwischen 9,4 und 7,8 verteilen. Die Abstände der einzelnen Werte ließen vermuten, dass einzelne Signalpunkte differenziert im 2D-Gel zu unterscheiden sein sollten. Zusätzlich sollte die anschließende PAGE deutlich machen können, welchen Anteil einfach bis sechsfach phosphorylierte Spezies am p34-Signal im Immunblot haben.

Tabelle 2: Isoelektrische Punkte von unterschiedlich phosphoryliertem DHBc

Phosphate	hate isoelektrischer Punkt		
0	9,56		
1	9,41		
2	9,24		
3	9,02		
4	8,74		
5	8,33		
6	7,82		

Die erste Dimension der Trennung der Proteine bestand in einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) im Bereich von pH 7 bis pH 10 auf kommerziellen IEF-Streifen. Die Streifen wurden anschließend auf ein 12%iges PAA-Gel gebettet und einer denaturierenden Elektrophorese unterzogen.

In den ersten Experimenten mit Lysaten von D2-Zellen konnte DHBc nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Wahrscheinlich wanderte es so weit zum basischen Ende der Streifen, dass es in die äußeren, verdickten Enden gelangte und während der Vorbereitung der Streifen für die PAA-Gelelektrophorese abgeschnitten wurde. Dies war insoweit erstaunlich, da vermutet wurde, dass Mehrfach-Phosphorylierungen bestanden. Um DHBc sichtbar zu machen, wurde nun eine andere Herangehensweise gewählt. Der Probenauftrag erfolgte nicht gleichmäßig über den gesamten IEF-Streifen, sondern nach dem Schema des sogenannten "Cup-Loadings", wobei die Proben mithilfe eines Applikators, der die sofortige Verteilung der Proben über die Länge der Streifen verhinderte, an dem Ende mit dem niedrigeren pH-Wert aufgegeben wurden. Außerdem wurde eine Leistungseinstellung gewählt (50 kWh), bei der die Fokussierung unvollständig war und erwartet wurde, dass die Proteine ihre endgültige Position im Gel noch nicht erreicht hatten. Dies sollte ermöglichen, dass die Phosphovarianten von DHBc nicht bis zum basischen Pol des IEF-Streifens wandern und dort akkumulieren, sondern über die gesamte Länge des Streifens aufgetrennt werden.

Tatsächlich konnte mit dieser Methode DHBc sichtbar gemacht werden (Abbildung 53). Die Kontrollen rechts und links der Streifen zeigen, dass DHBc durch CNmut hypophosphoryliert nur als p32-Bande (Abbildung 53a) und bei der Kontrolltransfektion mit dem Vektor pBJ5 phosphoryliert in zwei Banden vorlag (Abbildung 53b). Die Auftrennung von DHBc über die IEF-Streifen zeigte ebenfalls dieses Einbzw. Zweibandenmuster. Jedoch erfolgte die erwartete Auftrennung in differenzierte Punkte für die einzelnen Phosphovarianten nicht. Vielmehr wurde ein Schmieren der Proteine über die ganze Breite des Blots beobachtet, wobei es nicht möglich war, einzelne Spots bestimmten

Phosphovarianten zuzuordnen. Ebenso gelang es nicht, die Signale der korrespondierenden Blots untereinander zuzuordnen.

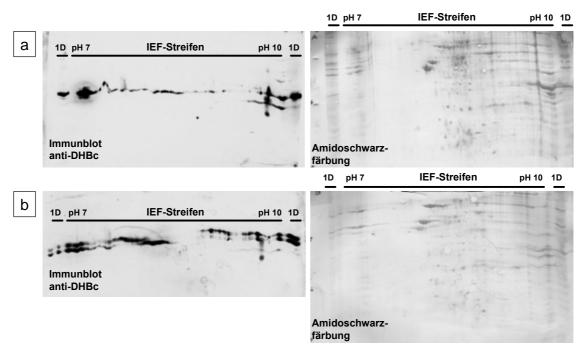


Abbildung 53: 2D-Gelelektophorese mit anschließendem Immunblot zur Auftrennung der Phosphovarianten von DHBc und Amidoschwarzfärbung

HuH7-Zellen wurden mit dem DHBV-Expressionsplasmid pDHBV16 und entweder [a] pBJ5-CNmut oder [b] mit dem Vektor pBJ5 kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert, DNA und RNA der Zellen verdaut und die Proteine aus den Lysaten gefällt. Das Proteinpellet wurde in IEF-Puffer gelöst und einer unvollständigen isoelektrischen Fokussierung mit "Cup-Loading" bei 50 kWh auf einem IEF-Streifen von pH7 bis pH10 unterzogen. Anschließend wurde der IEF-Streifen in PAGE-Laufpuffer äquilibriert und auf ein 12%iges PAA-Gel montiert. Als Kontrollen wurde neben dem Protein-Farbmarker in die zweite und letzte Tasche je ein Teil des mit Laemmli-Puffer gekochten, gefällten Proteins aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf PVDF-Membran geblottet und im Immunblot mit einem anti-DHBc-Antikörper untersucht. Zuletzt wurden die Membranen mit Amidoschwarz gefärbt, um den Proteinauftrag zu prüfen.

Es ist denkbar, dass die den Kapsidproteinen innewohnende Fähigkeit zur Zusammenlagerung und Ausbildung von Kapsidstrukturen unter den Bedingungen des IEF-Puffers nicht vollständig unterdrückt wird, so dass es zu einem "Mitschlepp-Phänomen" kam. In den ersten Experimenten wurden vermutlich alle phosphorylierten Kapsidproteine durch nicht-phosphoryliertes DHBc in den äußeren basischen Bereich der Streifen "mitgeschleppt" und damit noch vor der PAGE eliminiert. Bei der unvollständigen IEF mit "Cup-Loading" schmieren die Proteine dagegen über den gesamten Streifen, weil sie vermutlich Komplexe mit nur sehr geringen Differenzstufen im Laufverhalten bilden. Mit der 2D-Gelelelektrophorese schien es also nicht möglich zu sein, den Restanteil an phosphoryliertem DHBc nach Phosphatasenüberexpression zu bestimmen.

4.2.2 Radioaktive Markierung von DHBc

Als eine weitere Möglichkeit, die Restphosphorylierung von DHBc bei CNmut-Koexpression zu eruieren, wurde die Markierung von Proteinen mit radioaktivem Phosphat verwendet. Gefolgt von einer Immunpräzipitation der Kapsidproteine und anschließendem Autoradiogramm sollte es möglich sein, zu zeigen, ob DHBc bei gleichzeitiger Expression von CNmut in HuH7-Zellen noch phosphoryliert vorliegt oder nicht. Zugleich würde auf diese Weise eine Quantifizierung der Restphosphorylierung möglich sein.

Als Vorraussetzung für dieses Experiment musste sichergestellt werden, dass die Immunpräzipitation (IP) mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern sowohl für dephospho- als auch für phospho-DHBc funktioniert und spezifisch ist. Die IP-Bedingungen wurden mithilfe von D2- und LMH-Zellen optimiert. Abbildung 54 zeigt die erfolgreiche Präzipitation von DHBc aus dem Zelllysat von D2-Zellen.

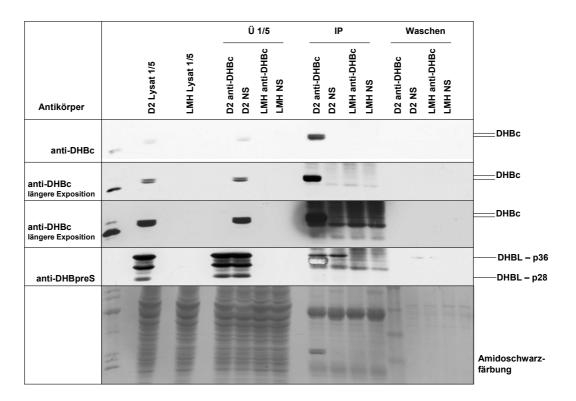


Abbildung 54: Test-Immunpräzipitation von DHBc

D2- und LMH-Zellen wurden lysiert und mit anti-DHBc-Antikörper- oder Kaninchen-Normalserum- (NS) gekoppelten PanZ bei RT inkubiert. Anschließend wurde PanZ durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand der Präzipitation (Ü) aufbewahrt. Es folgten mehrere Waschschritte mit Lysepuffer und PBS, bevor die Präzipitate mit Laemmli-Puffer gekocht wurde und zusammen mit Proben von den Lysaten, den Überständen und dem ersten Waschschritt in der PAGE aufgetrennt wurden. Das Gel wurde anschließend geblottet und die Membran mit dem anti-DHBc-Antikörper im Immunblot analysiert. Um den Proteinauftrag zu prüfen, wurde die Membran anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Ein zur Kontrolle benutztes Kaninchen-Normalserum (NS) war nicht in der Lage, DHBc aus dem Lysat zu präzipitieren, mit ihm erschienen beide DHBc-Banden im Überstand (Ü).

Der Überstand der Präzipitation mit anti-DHBc dagegen war frei von immunreaktivem DHBc. Die Präzipitate von D2-Zelllysat mit NS und die von LMH-Zelllysat mit anti-DHBc oder NS enthielten kein DHBc, während das Präzipitat von D2-Zelllysat mit anti-DHBc beide DHBc-Banden p32 und p34 enthielt. Der anti-DHBc-Antikörper war damit in der Lage, sowohl dephosphoryliertes als auch phosphoryliertes DHBc zu präzipitieren. Die Bindung war fest genug, dass im stringenten ersten Waschschritt kein DHBc nachzuweisen war.

In diesem Experiment wurde leider ebenfalls beobachtet, dass neben DHBc auch viele andere Proteine präzipitiert wurden; so wurde zum Beispiel ein geringer Anteil an DHBL im Immunblot der IP sowohl mit anti-DHBc als auch mit NS nachgewiesen. Zusätzlich erschienen eine Reihe nicht identifizierter Hintergrundbanden von zellulären Proteinen auch bei den IPs von LMH-Zelllysaten, die auch in der Amidoschwarzfärbung sichtbar waren. Auch sollte an dieser Stelle vorausschauend auf die folgenden Daten bemerkt werden, dass die DHBc-Bande, die in der Amidoschwarzfärbung des IP-Pellets mit anti-DHBc sichtbar ist, aller Wahrscheinlichkeit nach nicht von dem Kapsidprotein, sondern von an der Membran gebundenen Antikörpern herrührt. DHBc kommt intrazellulär nicht in Mengen vor, die sich als gefärbte Proteinbanden vor dem Hintergrund eines Gesamtzelllysats hervorheben. Auch war diese Bande im nach dem Blotten gefärbten PAA-Gel nicht zu sehen (nicht gezeigt).

Wegen der recht hohen Menge an unspezifisch kopräzipitierten Proteinen wurden auch verschiedene monoklonale anti-DHBc-Antikörper in transfizierten HuH7-Zellen getestet. Keiner der getesteten Antikörper führte jedoch zu einer deutlich verringerten Menge an unspezifischem Hintergrund (nicht gezeigt), weshalb für das weitere Experiment wie bisher das polyklonale anti-DHBc-Serum Verwendung fand. Auch Präzipitationen mit Protein-A/G-Agarose statt PanZ führten leider nicht zu einem besseren Ergebnis (nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt wurden HuH7-Zellen in 10 cm-Schalen und 6-Loch-Platten ausgesät und jeweils parallel aus demselben Ansatz heraus entweder mit pDHBV16 und pBJ5 oder mit pDHBV16 und pBJ5-CNmut + pBJ5-CNB oder nicht transfiziert (Abbildung 55). Während die Zellen von den 6-Loch-Platten als Kontrolle dafür Verwendung fanden, dass DHBc bei koexprimiertem CNmut dephosphoryliert wurde, wurden die Zellen der 10 cm-Schalen 24 h nach der Transfektion über Nacht in Serum- und phosphatfreiem Medium mit radioaktivem Phosphat (³²P) markiert. Anschließend wurden sie für die IP lysiert, die Zellkerne abzentrifugiert und die Zytoplasmafraktion mit anti-DHBc-vorinkubiertem PanZ

inkubiert. Die Präzipitate wurden mehrfach gewaschen, in Laemmli-Puffer gekocht und parallel mit Aliquots der Ausgangslysate und IP-Überständen auf ein PAA-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt und auf einer Phosphoimager-Platte exponiert (Abbildung 56).

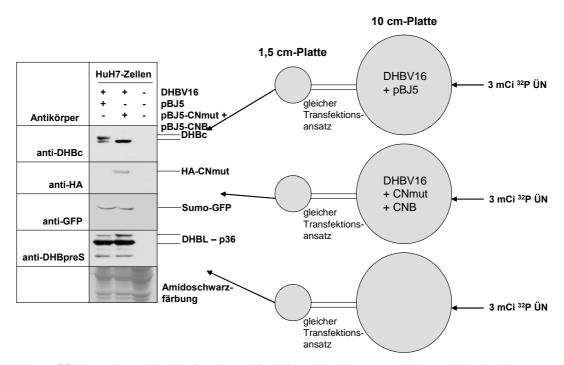


Abbildung 55: Experimentelles Design der radioaktiven Markierung und Immunblot der Lysate

HuH7-Zellen wurden zu gleicher Dichte in 10 cm-Schalen und 6-Lochplatten ausgesät und aus denselben Transfektionsansätzen heraus parallel entweder mit pDHBV16 und pBJ5, pDHBV16 und pBJ5-CNmut + pBJ5-CNB oder nicht transfiziert. 24 h später wurde den 10 cm-Schalen radioaktives Phosphat (32 P) zugegeben. Nach einer Über-Nacht-Inkubation wurden die Zellen der 6-Loch-Platten und der 10 cm-Schalen geerntet. Die Zellen der 6-Loch-Platten wurden in Laemmli-Puffer lysiert und nach PAGE im Immunblot auf die Expression von DHBc geprüft. Die Zelllysate der 10 cm-Schalen wurden für die IP verwendet.

Wie in Abbildung 55 ersichtlich, kam es durch CNmut-Koexpression wieder zu einem Verlust der p34-Bande von DHBc. Die Transfektionseffizienz war vergleichbar und DHBL konnte in beiden Fällen mit seiner Phosphovariante detektiert werden. Der mit Amidoschwarz gefärbte Blot zeigt, dass die Proteinmenge in äquivalenten Lysat-Volumina ohne Transfektion deutlich höher lag als bei den transfizierten Zellen. Dies ist auch bei dem Auftrag der Lysate und IP-Überstände im Coomassie-gefärbten Gel zu erkennen (Abbildung 56).

Das Coomassie-gefärbte Gel wurde getrocknet und eine Phosphoimager-Platte aufgelegt, um die radioaktiven Signale zu dokumentieren. Im Autoradiogramm (Abbildung 56) ist sehr viel Hintergrund zu erkennen, wie es die Ergebnisse der Immunpräzipitation bereits vermuten ließen. Auf der Höhe von 32 kDa findet sich im IP-Pellet transfizierter Zellen eine Bande, die zwar nicht im IP-Pellet jedoch in dem Lysat und IP-Überstand nicht-

transfizierter Zellen zu finden ist. Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Bande um eine DHBc-spezifische Bande handelt. Genauso verhält es sich für die Bande, die auf der Höhe von 34 kDa zu finden ist. Diese ist sogar im IP-Pellet nicht transfizierter Zellen zu sehen.

Insgesamt erreichte diese Methode nicht die nötige Sensitivität, um phosphoryliertes DHBc zu zeigen. Ein Grund dafür liegt sicher in der geringen Menge an Kapsidprotein in den Zellen. Ein anderer wichtiger Grund ist die relativ unsaubere Immunpräzipitation, weshalb auch eine Erhöhung der Ausgangsmenge an Protein bzw. transfizierten Zellen wahrscheinlich keine wesentlich bessere Empfindlichkeit liefern würde.

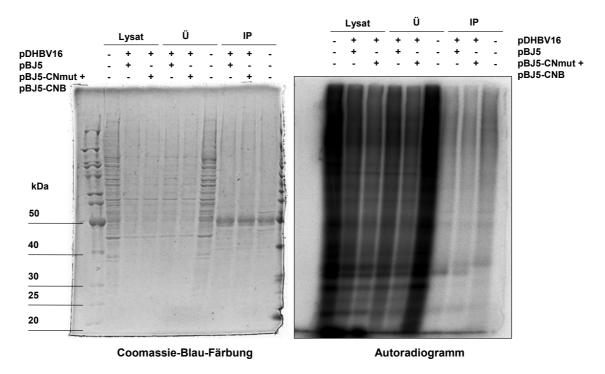


Abbildung 56: Autoradiogramm und Coomassie-gefärbtes Gel der radioaktiven Markierung

HuH7-Zellen wurden in 10 cm-Schalen und entweder mit pDHBV16 und pBJ5, pDHBV16 und pBJ5-CNmut + pBJ5-CNB oder nicht transfiziert. 24 h später wurde den 10 cm-Schalen ³²P zugegeben. Nach einer Über-Nacht-Inkubation wurden die Zellen lysiert und die zytoplasmatischen Fraktionen einer Immunpräzipitation (IP) unterzogen. Aliquots der Lysate, der IP-Überstände (Ü) und der IP-Pellets wurden durch PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet (links) und auf einer Phosphoimager-Platte exponiert (rechts).

4.2.3 Phosphospezifische Antikörper

4.2.3.1 Herstellung phosphospezifischer Antikörper gegen DHBc

Die Summe aller möglichen Kombinationen an Phosphorylierung der bekannten Phosphorylierungsstellen im DHBc beläuft sich auf 63. Damit gibt es neben der dephosphorylierten Form theoretisch 63 verschiedene Phosphovarianten von DHBc,

worunter einfach bis sechsfach phosphorylierte Proteine fallen. All diese in der 2D-Gelelektrophorese oder durch eine andere Methode aufzutrennen, wäre eine enorme Herausforderung.

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Notwendigkeit der Unterscheidung der Phosphorylierung einzelner Aminosäurepositionen von DHBc immer jedoch deutlicher, insbesondere um die Aussagen über den Einfluss der Dephosphorylierung auf die Replikation von DHBV zu untermauern. Daher wurde versucht, phosphospezifische Antikörper gegen alle sechs bekannte Phosphorylierungsstellen im DHBc zu produzieren. Dazu wurden Peptide von 10 bzw. 11 Aminosäuren Länge mit der jeweils phosphorylierten Aminosäure in möglichst mittlerer Position synthetisiert und für die Immunisierung an KLH gekoppelt.

Die Sequenzen der Peptide waren die folgenden: für phosphoryliertes DHBc S230: Cys – GRRRsKSRER, für phosphoryliertes DHBc S232: Cys – GRRRSKsRER, für phosphoryliertes DHBc T239: Cys – ERRAPtPQRA, für phosphoryliertes DHBc S245: Cys – PQRAGsPLPRS, für phosphoryliertes DHBc S257: Cys – SHHRsPSPRK, für phosphoryliertes DHBc S259: Cys – SHHRSPsPRK; wobei die Kleinbuchstaben die jeweils phosphorylierte Aminosäure darstellen (siehe Abbildung 57).

DHBV3-C-Terminus:	Peptid T239		
	Peptide S230 und S232	Peptid S245	Peptide S257 und S259
RRRKVKTT\	VYGRRR S K S RERRAP	rporag s plprs	SSSHHR S P S PRK

Abbildung 57: Lage und Sequenzen der Peptide für die Herstellung phosphospezifischer Antikörper gegen DHBc

Dargestellt ist die Sequenz des DHBc-C-Terminus mit den Phosphorylierungsstellen in fetten Buchstaben. Darüber ist die Lage der für die Immunisierung von Kaninchen synthetisierten Peptide eingezeichnet.

Für alle vier Sequenzen wurde ein genomweiter Homologievergleich mithilfe von BLAST auf dem Netzwerk-Service von ExPASy (http://www.expasy.ch) durchgeführt. Dabei wurden neben den Übereinstimmungen mit Sequenzen aus Kapsidproteinen verschiedener Hepadnaviren lediglich für die letzten neun Aminosäuren des Peptids für die Antikörperherstellung gegen phosphoryliertes DHBc S245 (xxRAGSPLPRS) eine Übereinstimmung mit einer Sequenz aus einer Splicevariante des humanen TREX2 (engl.: Three prime repair exonuclease 2, Accession Nummer Q9BQ50) gefunden. Eine zweite Übereinstimmung fand sich mit dem Peptid für die Antikörperherstellung gegen phosphoryliertes S232 mit einer Sequenz (GRRRxKSRER) aus U2(RNU2) (engl.: small nuclear RNA auxiliary factor 1, Accession Nummer Q28C63) aus *Xenopus tropicalis*

(Westlicher Krallenfrosch). In beiden Fällen wurde keine Konservierung dieser Sequenzen entdeckt. Da die Antikörper anschließend auf humanen Zellen (HuH7) angewandt wurden, besteht die Möglichkeit, dass die Antikörper gegen phosphoryliertes DHBc S245 eventuell auch die Splicevariante von TREX2 erkennen. Dieses Protein besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 33 kDa. Das entspricht etwa der Position, an der DHBc gefunden wird. Eine Antikörperreaktion mit einem Protein dieser Größe wäre allerdings bereits bei nicht-pDHBV16-transfizierten Zellen zu erwarten. Durch die Kontrolle mit nichttransfizierten Zellen kann eine Verwechslung von TREX2 und DHBc somit ausgeschlossen werden.

Die Immunisierung von je zwei Kaninchen pro Peptid erfolgte im vierwöchigen Abstand. Die Entwicklung von Antikörpern wurde zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung durch Immunblots verfolgt. Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung wurden die Tiere ausgeblutet und die Seren in Immunblots auf ihre Spezifität getestet. Dafür wurden jeweils gleiche Volumina derselben Lysate von pBJ5, pBJ5-CNmut + pBJ5-CNB, pBJ5-PP2Awt und z.T. pBJ5-PP2Adn transfizierten HuH7-Zellen mehrfach nebeneinander auf ein PAA-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese und dem Blotten der Proteine auf eine Membran wurden die einzelnen Abschnitte der Blots mit den verschiedenen Peptidantiseren und zum Vergleich ebenfalls mit einem Antikörper, der gegen die gesamte Sequenz von nicht phosphoryliertem DHBc gerichtet ist, inkubiert. Obwohl die Dephosphorylierung mit PP2Awt bei diesen Transfektionen (mit dem anti-DHBc-ATG-Serum betrachtet) unbefriedigend effizient war, zeigten die phosphorylierung von DHBc durch CNmut (siehe unten).

DHBc-S230

In Abbildung 58 sind jeweils die Reaktionen der Antiseren CR73 und CR74 gegen das phosphorylierte S230-Peptid mit unterschiedlich stark phosphoryliertem DHBc gezeigt. In Zellen, die mit pDHBV16 und dem Kontrollvektor pBJ5 transfiziert worden waren, reagierte das Antiserum CR73 bereits ab der zweiten Immunisierung mit großer Präferenz mit der oberen DHBc-Bande p34, mit der von p32 jedoch kaum. Im Falle pDHBV16- und pBJ5-CNmut-transfizierter Zellen wurde hingegen die p32-Bande deutlich markiert, nicht jedoch die p34-Bande. Bei pDHBV16- und pBJ5-PP2Awt-transfizierten Zellen wurde phosphoryliertes DHBc in der p34-Bande nur äußerst schwach erkannt und die p32-Bande so gut wie gar nicht markiert. Bei pDHBV16- und pBJ5-PP2Adn-transfizierten Zellen

wurde die p34-Bande ebenfalls vergleichsweise schwach markiert und eine p32-Bande so gut wie nicht.

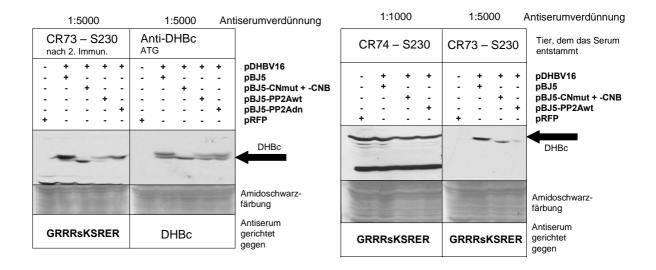


Abbildung 58: Reaktivität von Antikörpern gegen Phosphopeptid S230 mit DHBc

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB, pBJ5-PP2Awt oder pBJ5-PP2Adn transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20%ige PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den Antiseren CR73 und CR74, welche gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-S230 produziert wurden, oder mit anti-DHBc-ATG analysiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Das gegenüber dem Blot mit anti-DHBc-ATG stark veränderte DHBc-Bandenmuster der pBJ5-kotransfizierten HuH7- Zellen lässt vermuten, dass das Serum CR73 eine relativ hohe Spezifität für DHBc mit phosphoryliertem Serin 230 besitzt. Würde das Antiserum auch mit dephosphoryliertem DHBc reagieren, würde man eine stärkere p32-Bande bei pBJ5-kotransfizierten Zellen erwarten. So kann man schlussfolgern, dass ein recht großer Anteil der Kapsidproteine in CNmut-exprimierenden Zellen an der Position S230 phosphoryliert blieb und dass diese Phosphorylierung in der PAGE kein verändertes Laufverhalten des Proteins hervorrief. Dies trifft auch für die Dephosphorylierung von DHBc mit PP2Awt zu, wie weiter unten gezeigt. Das weitgehende Fehlen der p32-Bande pBJ5-kotransfizierten Zellen bedeutet wahrscheinlich, bei dass Mehrfach-Phosphorylierungen vorlagen, wobei die zusätzliche Phosphorylierung von DHBc an anderer Position als S230 die elektrophoretische Laufdifferenz hervorrief. Das an S230 phosphorylierte DHBc scheint demnach recht resistent gegenüber dem Angriff von Calcineurin und PP2A zu sein.

Das Antiserum CR74 erkannte keine spezifischen DHBc-Banden und war daher für den Immunblot unbrauchbar.

S232

Das gegen DHBc, phosphoryliert an S232, produzierte Antiserum CR78 zeigte ein sehr ähnliches Bild, wie Antiserum CR73 gegen phospho-S230 (Abbildung 59). In Lysaten von pBJ5-kotransfizierten HuH7-Zellen wurde mit starker Präferenz die obere Bande p34 von DHBc markiert. In Lysaten von pBJ5-CNmut + pBJ5-CNB-kotransfizierten Zellen wurde die p32-Bande von DHBc schwach markiert, während sie in pBJ5- und pBJ5-PP2Awt-kotransfizierten Zellen so gut wie nicht sichtbar war. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch die Phosphorylierung von S232 kein verändertes Laufmuster von DHBc in der PAGE hervorruft und ein geringer Teil der Kapsidproteine in CNmut-exprimierenden Zellen noch phosphoryliert vorlag. Zu diesem Zeitpunkt konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass ebenfalls eine spezifische Reaktion des Antiserums mit nicht phosphoryliertem DHBc vorlag. Daher ist dies ebenfalls eine mögliche Erklärung für das Erscheinen der p32-Bande in diesem wie im vorigen Fall.

Das ebenfalls mit Phosphopeptid S232 immunisierte Tier CR75 produzierte keine phosphospezifischen, aber dennoch DHBc-spezifische Antikörper. Evidenz hierfür war, dass das Serum CR75 zwischen den verschiedenen Phosphovarianten von DHBc genauso wenig unterschied wie das anti-DHBc-ATG-Serum, das gegen nicht phosphoryliertes DHBc gerichtet ist.

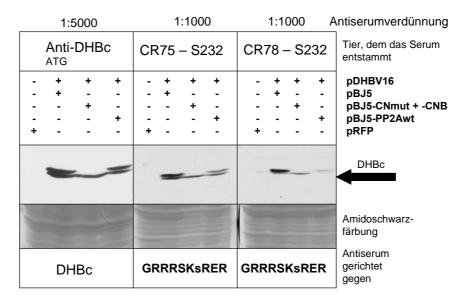


Abbildung 59: Reaktivität von Antikörpern gegen Phosphopeptid S232 mit DHBc

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB oder pBJ5-PP2Awt transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20% PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den Antiseren CR75 und CR78, welche gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-S232 produziert wurden, oder mit anti-DHBc-ATG analysiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

T239

Das Serum des Tiers CR77, welches mit Phosphopeptid T239 immunisiert worden war, enthielt Antikörper, die in Lysaten von pBJ5-, pBJ5-PP2Awt- und pBJ5-PP2Adn-kotransfizierten Zellen mit großer Präferenz mit der p34-Bande des DHBc reagierten (Abbildung 60). In Lysaten von pBJ5-CNmut-kotransfizierten Zellen wurde neben einer schwachen p32-Bande ebenfalls eine p34-Bande nachgewiesen, obwohl diese bei Inkubation des Parallelblots mit anti-DHBc-ATG-Serum nicht zu sehen war. Diese zeigt, dass die Phosphorylierung von T239 sehr wahrscheinlich zu einem veränderten Laufverhalten des Proteins in der PAGE führte und, dass außerdem ein sehr geringer Teil der Kapsidproteine in CNmut-koexprimierenden Zellen noch eine Phosphorylierung an dieser Stelle trug. Alternativ könnte es auch sein, dass der elektrophoretische "Shift" erst durch die Kombination der Phosphorylierung an T239 mit einer anderen Phosphorylierung zustande kommt, wodurch sich auch die relativ starke p32-Bande der CNmut-Koexpression erklären ließe, die in diesem Fall durch nur an T239 phosphorylierten Kapsidproteinen entstünde.

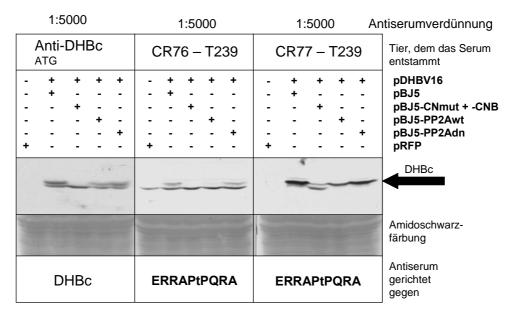


Abbildung 60: Reaktivität von Antikörpern gegen Phosphopeptid T239 mit DHBc

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB, pBJ5-PP2Awt oder pBJ5-PP2Adn transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch 5-20 % PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den Antiseren CR76 und CR77, welche gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-T239 produziert wurden, oder mit anti-DHBc-ATG analysiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Darüberhinaus ist wiederum die Reaktion des Antiserums mit dephosphoryliertem DHBc nicht auszuschließen, wodurch eine im Vergleich zu den anderen Transfektionen stärker ausgeprägte p32-Bande bei CNmut-Koexpression entstünde, da diese auch mit dem anti-DHBc-ATG-Serum stärker ausgeprägt war. Letztere Möglichkeit erscheint aber weniger wahrscheinlich, da die p32-Bande bei pBJ5-Kotransfektion nur äußerst schwach und gar nicht bei PP2Awt- und PP2Adn-Kotransfektion erkannt wurde. Der größte Teil der in diesen Zellen vorhandenen Kapsidproteine war wahrscheinlich unter anderem an T239 phosphoryliert, wodurch sich fast die gesamte Reaktivität in der oberen p34-Bande befand. Dies bedeutet auch, dass PP2A wahrscheinlich keinen Einfluss Phosphorylierungsstatus von DHBc an dieser Stelle hatte und auch CNmut schien T239 nicht vollständig dephosphorylieren zu können.

S245

Die Reaktionen der Antiseren 8589 und CR80 zeigten keine Hintergrundbande bei 33 kDa, die durch Kreuzreaktion der Antiseren mit TREX2 wegen der identischen Peptidsequenz in diesem zellulären Protein hätte entstehen können (Abbildung 61). Darüberhinaus ist ein eindeutiger elektrophoretischer "Shift" der an S245 phosphorylierten Kapsidproteine zu erkennen.

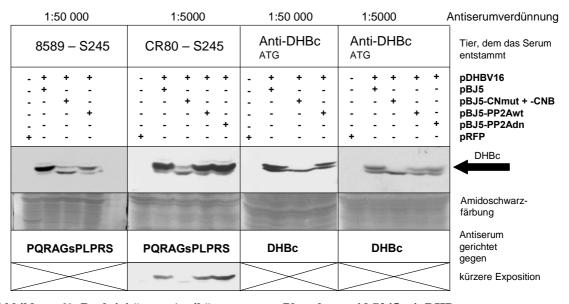


Abbildung 61: Reaktivität von Antikörpern gegen Phosphopeptid S245 mit DHBc

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB, pBJ5-PP2Awt oder pBJ5-PP2Adn transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20 % PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den Antiseren CR80 und 8589, welche gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-S245 produziert wurden, oder mit anti-DHBc-ATG analysiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Beim Vergleich der kurzen Exposition des Blots, der mit CR80 inkubiert wurde, mit dem Blot, der mit anti-DHBc-ATG behandelt wurde, fällt der relative Verlust der p32-Bande bei CNmut-Koexpression auf. Zugleich zeigt die längere Exposition, dass nur noch ein sehr geringer Teil der Kapsidproteine bei CNmut-Koexpression an wahrscheinlich S245 phosphoryliert vorlag. Andererseits wäre auch eine Reaktion mit dem dephosphorylierten Peptid denkbar, wobei die Position des detektierten DHBc in der p34-Bande durch Phosphorylierung an S245 oder an einer anderen Aminosäure (am ehesten T239, S257 oder S259) hervorgerufen würde. Jedenfalls reagierten die Antiseren 8589 und CR80 auch schwach mit nicht-phosphoryliertem DHBc, ersichtlich an den p32-Banden bei pBJ5-, pBJ5-PP2Awt- und pBJ5-PP2Adn-Kotransfektion, in etwa demselben Signalintensitätsverhältnis untereinander, wie es beim Einsatz des anti-DHBc-ATG-Serums der Fall war. Die deutlichen p34-Banden von DHBc bei pBJ5-PP2Awt- und pBJ5-PP2Adn-Kotransfektion sprechen dafür, dass die Expression von rekombinantem PP2Awt oder PP2Adn keinen wesentlichen Einfluss auf die Phosphorylierung von S245 des DHBc hatte. Dies konnte unten noch in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

S257
Beide gegen Phosphopeptid S257 gerichtete Antiseren CR81 und CR82 erkannten mit hoher Präferenz die p34-Bande von DHBc (Abbildung 62).

1:5000	1:5000	1:5000	1:5000	Antiserumverdünnung
Anti-DHBc ATG	CR81 – S257 2. Immun.	CR81 – S257	CR82 – S257	Antiserum
- + + + - + + - +	. + + +	- + + + - + + - +	- + + + - + + - +	pDHBV16 pBJ5 pBJ5-CNmut + pBJ5-CNB pBJ5-PP2Awt pRFP
	- ==		-	DHBc
				Amidoschwarz- färbung
DHBc	SHHRsPSPRK	SHHRsPSPRK	SHHRsPSPRK	Antiserum gerichtet gegen
	-	-		längere Exposition

Abbildung 62: Reaktivität von Antikörpern gegen Phosphopeptid S257 mit DHBc

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB oder pBJ5-PP2Awt transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20 % PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den Antiseren CR81 und CR82, welche gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-S257 produziert wurden, oder mit anti-DHBc-ATG analysiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Beide Antiseren reagierten zwar auch mit DHBc-p32, dies aber nur schwach und beim Vergleich der verschiedenen Transfektionen untereinander in etwa demselben Verhältnis wie das anti-DHBc-ATG-Serum. Das bedeutet wahrscheinlich, dass ein geringer Teil der Antikörper auch dephosphoryliertes DHBc erkannte. Die Reaktion der Antiseren zeigte auch eine p34-Bande bei CNmut-koexprimierenden Zellen, welche mit dem anti-DHBc-ATG-Serum nicht erkannt wurde. Dies bedeutet wahrscheinlich, dass ein geringer Anteil der Kapsidproteine bei CNmut-Koexpression noch an S245 phosphoryliert war und dass die Phosphorylierung an dieser Stelle ein elektrophoretisch verändertes Laufmuster zur Folge hatte. Andererseits kann dies, wie bei S245 beschrieben, auch durch die Reaktion der Antikörper mit dem an S257 dephosphorylierten, aber an anderer Stelle phosphorylierten DHBc entstanden sein.

DHBc-p34 wird bei PP2Awt-Koexpression durch die phosphospezifischen Antiseren etwa genauso gut erkannt wie durch anti-DHBc-ATG. Dies ließ vermuten, dass die pBJ5-PP2Awt-Kotransfektion hier nicht zur Dephosphorylierung von S257 führte. Weiter unten wird allerdings in einem aussagekräftigeren, unabhängigen Experiment gezeigt, dass S257 durch PP2Awt tatsächlich weitgehend dephosphoryliert wurde.

Um die Phosphospezifität des Antiserums CR81 exemplarisch zu zeigen, wurde versucht, den Blot nach der Behandlung mit CR81 auch noch mit anti-DHBc-ATG zu entwickeln. Diese nachfolgende zweite Behandlung, diesmal mit anti-DHBc-ATG, zeigte eine starke Reaktion des zweiten Antikörpers mit dem dephosphoryliertem DHBc der p32-Bande, während phosphoryliertes DHBc der p34-Bande vergleichsweise wenig Signal zeigte (Abbildung 63).

Dieser Vergleich macht die sehr hohe Spezifität des Antiserums CR81 für die phosphorylierte Sequenz bereits nach der zweiten Immunisierung deutlich. Trotzdem wäre es erstrebenswert, durch Kompetition die Reaktivität der phosphospezifischen Antiseren mit dephosphoryliertem DHBc zu eliminieren.

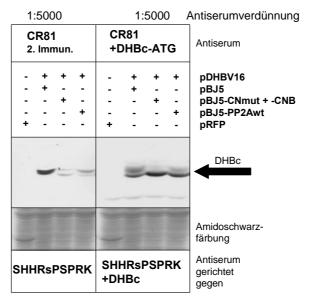


Abbildung 63: Spezifität des Antikörpers CR81

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB oder pBJ5-PP2Awt transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20 % PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit dem Antiserum CR81, welches gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-S257 produziert wurde, analysiert. Anschließend wurde derselbe Blot mit anti-DHBc-ATG inkubiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

S259

Die Antiseren CR83 und CR84, die durch Immunisierung mit Phosphopeptid S259 gewonnen wurden, zeigten, obwohl beide präferenziell mit der DHBc-p34-Bande reagierten, auch eine relativ ausgeprägte Reaktivität mit der DHBc-p32-Bande (Abbildung 64). Bei der pBJ5-CNmut-Kotransfektion erkannten beide Antiseren interessanterweise p32 und p34 mit gleicher Intensität. Die Erkennung von DHBc-p34 in diesem Fall spricht dafür, dass die Phosphorylierung von DHBc an der Position S259 eine elektrophoretische Laufveränderung bewirkte und ein gewisser Teil der Kapsidproteine bei CNmut-Koexpression an dieser Stelle noch phosphoryliert war. Genauso kann allerdings zutreffen, dass die Antiseren ein an S259 dephosphoryliertes, aber an anderer Stelle phosphoryliertes DHBc in dieser Position erkannten. Ausgeschlossen werden kann dies nur durch Kompetitionsexperimente mit den Seren und dephosphoryliertem Peptid oder Protein.

Bei Koexpression von PP2Awt reagierten sowohl CR83 als auch CR84 stark mit der DHBc-p34-Bande. Dies spricht dafür, dass in diesem Experiment die Koexpression von PP2Awt nicht zur Dephosphorylierung von DHBc-S259 führte. Diese Interpretation konnte weiter unten bestätigt werden.

Der Blot, der mit CR83 entwickelt worden war, wurde im Anschluss mit anti-DHBc-ATG inkubiert, um die Spezifität des Serums für phosphoryliertes DHBc zu zeigen

(Abbildung 65). Daraufhin traten die p32-Banden, welche zuvor mit CR83 eher schwach sichtbar waren, insbesondere bei CNmut-Koexpression deutlich hervor.

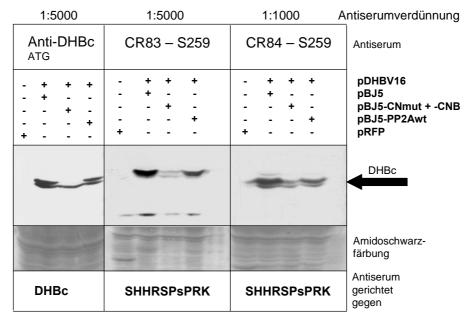


Abbildung 64: Reaktivität von Antikörpern gegen Phosphopeptid S259 mit DHBc

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB oder pBJ5-PP2Awt transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20 % PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den Antiseren CR83 und CR84, welche gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-S259 produziert wurden, oder mit anti-DHBc-ATG analysiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

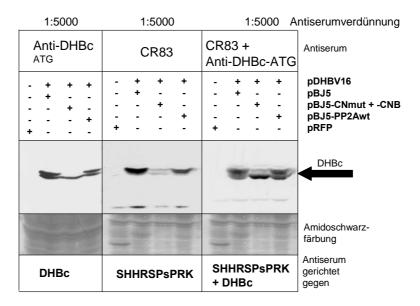


Abbildung 65: Spezifität des Serums CR83

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB oder pBJ5-PP2Awt transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20 % PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit dem Antiserum CR83, welches gegen ein Peptid mit phosphoryliertem DHBc-S259 produziert wurde, analysiert. Anschließend wurde derselbe Blot mit anti-DHBc-ATG inkubiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Die Dephosphorylierung von DHBc durch PP2Awt

Da die obigen Experimente aufgrund unzureichender Dephosphorylierung von DHBc in den Zelllysaten nur wenig Aussagekraft zu den durch PP2Awt dephosphorylierten Aminosäuren hatten, wurde nach einer weiteren Transfektion speziell dieser Aspekt nochmals untersucht. In Abbildung 66 oben rechts ist mit dem Antiserum anti-DHBc-ATG gezeigt, dass bei diesem Versuch die Dephosphorylierung von DHBc durch PP2Awt sehr gut war. Gleiche Mengen dieses Lysats wurden parallel in der PAGE aufgetrennt und jede der Phosphorylierungsstellen mit ein bzw. zwei geeigneten Antiseren untersucht. Für DHBc-S230 kam CR73 zum Einsatz, für DHBc-S232 CR78, für DHBc-T239 CR77, für DHBc-S245 CR80 und 8589, für DHBc-S257 CR82 und für DHBc-S259 wurde CR83 eingesetzt.

Mit CR73 wurde bei der Kotransfektion von pBJ5-PP2Awt, anders als oben, ein starkes Signal in der unteren p32-Bande gefunden. Vergleichsweise schwächer fielen die p32-Banden der Kotransfektionen mit pBJ5 und pBJ5-PP2Adn aus. Dies deutet darauf hin, dass die PP2Awt-Überexpression nicht zu einer Dephosphorylierung von DHBc-S230 führte, sondern möglicherweise sogar eine vermehrte Phosphorylierung dieser Aminosäure bewirkte. Zugleich bestätigte diese Beobachtung die Vermutung, dass die Phosphorylierung von S230 nicht zu einem veränderten Laufverhalten der Proteine in der Elektrophorese führte.

CR78 erkannte, wie schon zuvor beobachtet, hauptsächlich die p34-Bande. Das Verhältnis der Signalintensitäten von der p34- zur p32-Bande bei PP2Awt-Koexpression hat sich im Vergleich zum Blot mit anti-DHBc-ATG deutlich zugunsten von p34 verschoben. Dies könnte bedeuten, dass die Phosphorylierung von S232 doch zu einem elektrophoretischen "Shift" führt, anders als bisher vermutet. Der relative Gesamtsignalverlust bei der pBJ5-PP2Awt- im Vergleich zur pBJ5-Kotransfektion zeigt, dass wahrscheinlich fast alles DHBc an der Position S232 durch PP2Awt dephosphoryliert wurde.

Der Nachweis von DHBc mit CR77 zeigte ein unerwartet verändertes Bandenmuster im Vergleich zu anderen Peptidseren. Wie mit allen anderen phosphospezifischen Peptidseren wurde mit hoher Präferenz die p34-Bande markiert, doch war bei PP2Awt-Koexpression DHBc-p32 nicht mehr nachweisbar und zudem trat recht deutlich eine dritte Bande oberhalb von p34 auf, die zum Teil auch mit anderen Peptidseren bei langer Exposition beobachtet wurde. Möglicherweise stellt diese dritte Bande, DHBc-p35, eine weiter minore Phosphovariante von DHBc dar. Ihre Existenz könnte darauf hinweisen, dass die Phosphorylierung von T239 und noch mindestens einer weiteren Aminosäuren zu einer

Phosphovariante von DHBc mit noch langsamerer elektrophoretischer Beweglichkeit als DHBc-p34 führt. Die DHBc-p35 Bande wurde nicht bei Kotransfektion mit pBJ5-PP2Awt beobachtet.

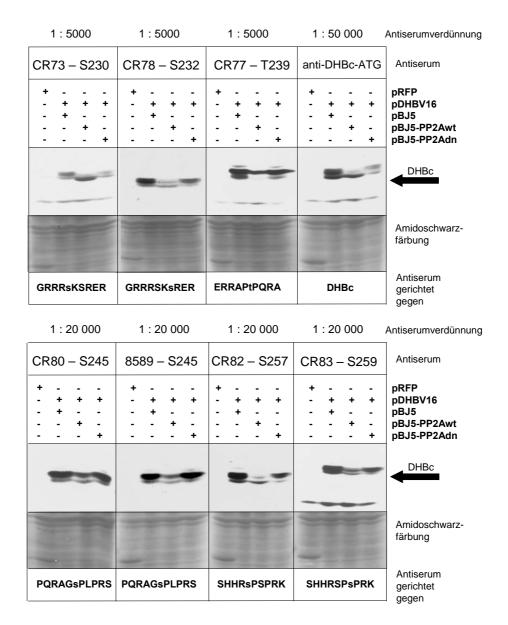


Abbildung 66: Analyse des durch PP2Awt dephosphorylierten DHBc mit Antikörpern gegen DHBc-Phosphopeptide

HuH7-Zellen wurden mit pRFP oder pDHBV16 und entweder dem Kontrollvektor pBJ5, pBJ5-PP2Awt oder pBJ5-PP2Adn transfiziert. Die Proteine der Zelllysate wurden durch eine 5-20 % PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit den Antiseren CR73, CR78, CR77, CR80, 8589, CR82, CR83 und anti-DHBc-ATG analysiert. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Aus dem Fehlen des Signals für DHBc-p32 bei PP2wt-Koexpression kann man schlussfolgern, dass entweder die Phosphorylierung von T239 zu einem elektrophoretischen "Shift" von DHBc führt oder T239 bei PP2Awt-Koexpression nur

dann phosphoryliert bleibt, wenn eine zweite Aminosäure gleichzeitig phosphoryliert ist. Der Nachweis von DHBc-p32 bei pBJ5- und pBJ5-PP2Adn-Koexpression deutet allerdings eher auf letztere Möglichkeit hin. Eine Reaktion von CR77 mit dephospho-DHBc scheint an dieser Stelle fast ausgeschlossen, da sonst die p32-Bande auch bei CNmut-Koexpression hätte nachgewiesen werden müssen.

Die Seren CR80 und 8589 erkannten beide, auch bei PP2Awt-Koexpression, mit Präferenz DHBc-p34. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Phosphorylierung von S245 zu einem veränderten elektrophoretischen Laufverhalten führte und ein sehr großer Anteil der DHBc-Proteine an S245 noch phosphoryliert vorlag, wenn PP2Awt koexprimiert wurde.

Das Antiserum CR82 reagierte wieder mit großer Präferenz mit der p34-Bande, jedoch wurde die p32-Bande bei PP2Awt-Koexpression deutlich stärker markiert als p34. Das Signalverhältnis von p32 zu p34 in diesem Fall hat sich gegenüber der Markierung mit anti-DHBc-ATG nicht verändert, was möglicherweise bedeutet, dass die Phosphorylierung an S257 im Gegensatz zu obiger Interpretation kein verändertes Laufverhalten in der Elektrophorese bewirkte. Der relative Signalverlust im Vergleich zur pBJ5-Kotransfektion weist darauf hin, dass ein größerer Anteil von DHBc an S257 durch Koexpression von PP2Awt dephosphoryliert wurde.

CR83 zeigte ein sehr ähnliches Bandenmuster wie CR78. P34 wurde präferentiell markiert, aber bei PP2Awt-Koexpression hat sich das Signalverhältnis von p34 zu p32 gegenüber der Markierung mit anti-DHBc-ATG deutlich zugunsten von p34 verschoben, wobei die Gesamtsignalstärke abgenommen hat. Dies bedeutet, dass vermutlich ein geringer Teil an S259 bei PP2Awt-Koexpression noch phosphoryliert vorlag und die Phosphorylierung von S259 zu einer elektrophoretischen Laufdifferenz führte.

Die Kotransfektion der Zellen mit pBJ5-PP2Adn zeigte mit keinem der Peptidantiseren eine deutlich von der pBJ5-Kotransfektion abweichende Bandenverteilung. Daher kann angenommen werden, dass durch PP2Adn-Koexpression keine generell veränderte Phosphorylierung von DHBc auftrat. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von DHBc, die durch Koexpression von PP2Awt hervorgerufen wurden, vermutlich indirekt erfolgten. Dieses Ergebnis lässt allerdings offen, wieso es unter PP2Adn-Expression zu einer vermehrten Virionsekretion kam (vergleiche Abbildung 50 bis Abbildung 52) und spricht ebenfalls dafür, dass in diesem einen Fall nackte Kapside vor der Isolierung der Virion-DNA nicht vollständig verdaut wurden, denn derartig ausgeprägte Differenzen waren in keinem der anderen (hier nicht gezeigten) Experimente zu sehen.

4.2.3.2 Nachweis der Phosphospezifität ausgewählter Peptidantiseren

Behandlung von Immunblots mit Phosphatase

Als unabhängige Evidenz für oder gegen die Korrektheit der Interpretation der obigen Immunblot-Daten wurde analysiert, inwiefern die Peptidantiseren noch mit DHBc reagierten, nachdem es in denaturierter Form auf einer Membran mithilfe von Phosphatase dephosphoryliert worden war. Die phosphospezifischen Antikörper sollten nach der Dephosphorylierung weder DHBc-p34 noch DHBc-p32 erkennen, während Antikörper mit Spezifität für nicht-phosphorylierte Epitope des DHBc, beide Formen des Proteins auch nach der Dephosphorylierung erkennen sollten. Als Kontrollserum wurde anti-DHBc-ATG eingesetzt, welches gegen die gesamte dephosphorylierte Sequenz von DHBc gerichtet ist. Es wurden gleiche Volumina an Lysaten pDHBV16 und pBJ5-CNmut oder pBJ5-PP2A kotransfizierter Zellen mehrfach nebeneinander auf PAA-Gele aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membran wurden die Blots auseinander geschnitten und entweder mit der alkalischen Phosphatase CIP oder ohne Phosphatase über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von DHBc auf jeweils CIP-behandelten und kontrollbehandelten Blots parallel mit gleichen Expositionszeiten auf Röntgenfilm für je ein Peptidantiserum. Die Ergebnisse dieser Dephosphorylierungsexperimente sind in Abbildung 67 und Abbildung 68 zu sehen.

Die Markierung von DHBc mit anti-DHBc-ATG mit und ohne Dephosphorylierung der Membran war wie erwartet jeweils identisch (Abbildung 67 oben rechts und Abbildung 68 unten rechts). Dies spricht dafür, dass es während der Dephosphorylierung mit CIP im Vergleich zur Kontrollbehandlung nicht zu einer Degradation mit Verlust von Protein auf der Membran kam. Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Signalintensität der Banden nach Verwendung der Antiseren CR80, CR82 und CR83 auf CIP-behandelten Membranen auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau (Abbildung 68).

Das bedeutet, dass die mit den Antiseren CR80, CR82 und CR83 nachweisbaren DHBc-Signale sehr wahrscheinlich ausschließlich von den jeweiligen phosphorylierten Proteinen stammten. CR80 erkennt damit nur DHBc, welches an S245 phosphoryliert ist, CR82 erkennt nur DHBc, welches an S257 phosphoryliert ist und CR83 erkennt nur DHBc, welches an S259 phosphoryliert ist. Da bei der Dephosphorylierung von DHBc mit CNmut oder PP2Awt mit jedem dieser Antiseren neben der p34-Bande auch eine p32-Bande sichtbar war, kann daraus geschlussfolgert werden, dass die Phosphorylierung von S245, S257 oder S259 allein vermutlich keine elektrophoretische Laufveränderung von DHBc

hervorruft. Die langsamer laufenden elektrophoretischen Spezies von DHBc entstehen daher wahrscheinlich durch Mehrfach-Phosphorylierung von DHBc an mindestens zwei Aminosäuren. DHBc in pBJ5-kotransfizierten HuH7-Zellen wird von diesen Antiseren hauptsächlich als p34-Bande erkannt und liegt somit zum größten Teil in mehrfach phosphorylierter Form vor.

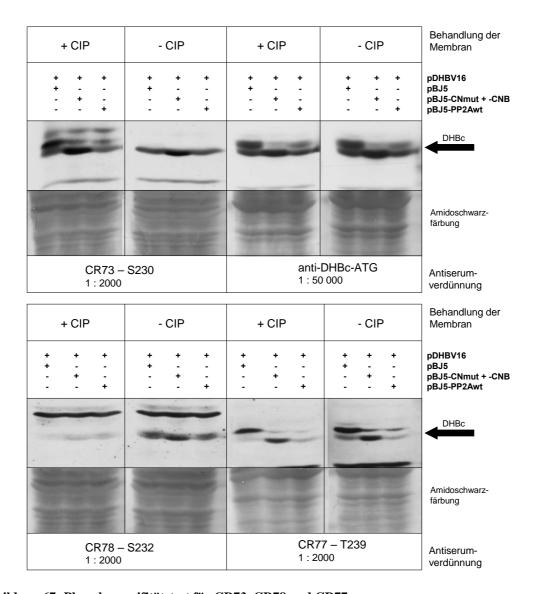


Abbildung 67: Phosphospezifitätstest für CR73, CR78 und CR77

Immunblots mit Lysaten transfizierter HuH7-Zellen wurden über Nacht bei 37°C parallel entweder mit Phosphatase (+CIP) oder ohne Phosphatase (-CIP) in Reaktionspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Blots geblockt und mit den Antiseren CR73, CR78, CR77 oder anti-DHBc-ATG behandelt. Die Exposition von Phosphatase-behandelten und kontrollbehandelten Blots war für jedes Antiserum gleich lang. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Die Signalintensitäten der DHBc-Banden, die mit dem Antiserum CR78 nach CIP-Behandlung der Membran beobachtet wurden, lagen deutlich unter der des kontrollbehandelten Blots. CR78 erkennt daher wahrscheinlich zu einem geringen Teil

auch dephosphoryliertes DHBc. Es konnte daher keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die verbleibende p32-Bande in diesem Fall nur dephosphoryliertes oder auch phosphoryliertes DHBc enthält. In jedem Fall wurde jedoch ein Großteil an S232 durch Koexpression von CNmut oder PP2Awt dephosphoryliert.

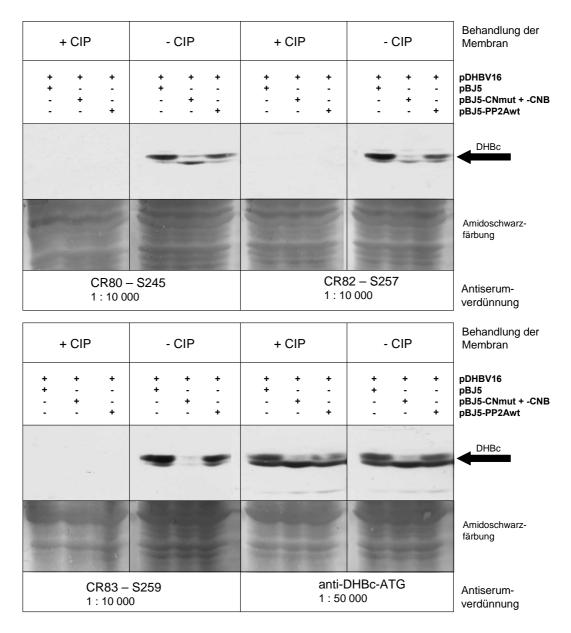


Abbildung 68: Phosphospezifitätstest für CR80, CR82 und CR83

Immunblots mit Lysaten transfizierter HuH7-Zellen wurden über Nacht bei 37°C parallel entweder mit Phosphatase (+CIP) oder ohne Phosphatase (-CIP) in Reaktionspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Blots geblockt und mit den Antiseren CR80, CR82, CR83 oder anti-DHBc-ATG behandelt. Die Exposition von Phosphatase-behandelten und kontrollbehandelten Blots war für jedes Antiserum gleich lang. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt.

Der Nachweis von DHBc mit den Antiseren CR73 und CR77 nach CIP-Behandlung der Membranen ergab keine verringerte Signalintensität im Vergleich zur Kontrollbehandlung.

Dass das Bandenmuster für DHBc für beide Antiseren deutlich verschieden ist von dem des anti-DHBc-ATG-Serums, ist aber ein guter Hinweis auf Phosphospezifität. Es kann daher angenommen werden, dass die Zugänglichkeit der Proteine auf der Membran für CIP nicht gegeben war, die Antikörperbindung gleichzeitig jedoch nicht behindert wurde. Dies könnte dadurch erfolgt sein, dass von den Proteinen auf der Membran beim Blotten durch das Auswaschen von SDS z.T. Sekundär- und Tertiärstrukturen angenommen wurden, die die Zugänglichkeit bestimmter Proteinregionen begrenzten.

Des Weiteren konnte mithilfe der CIP-Behandlung von Blots mit anschließender Immunreaktion analog obiger Experimente auch für die Antiseren 8589 (S245), CR81 (S257) und CR84 (S259) gezeigt werden, dass ihre Bindung durch Dephosphorylierung der Proteine auf der Membran stark verringert wurde (Abbildung 69).

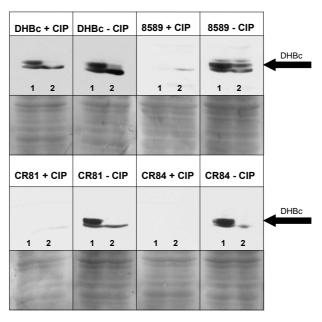


Abbildung 69: Phosphospezifitätstests für weitere Antikörper

Immunblots mit Lysaten transfizierter HuH7-Zellen wurden über Nacht bei 37°C parallel entweder mit Phosphatase (+CIP) oder ohne Phosphatase (-CIP) in Reaktionspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Blots geblockt und mit den Antiseren 8589, CR81, CR84 oder anti-DHBc-ATG behandelt. Die Exposition von Phosphatase-behandelten und kontrollbehandelten Blots war für jedes Antiserum gleich lang. Zur Kontrolle, ob die aufgetragenen Lysate vergleichbare Mengen an Protein enthielten, wurden die Blots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt. 1 – Transfektion von HuH7-Zellen mit pDHBV16 und pBJ5, 2 – Transfektion von HuH7-Zellen mit pDHBV16, pBJ5-CNmut und pBJ5-CNB.

Vergleich der Reaktivität der Seren mit Phospho- und Nicht-Phosphopeptiden

Durch die CIP-Behandlung der Immunblots konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Seren CR73 und CR77 noch hohe Reaktivität mit dephospho-DHBc aufwiesen. Daher sollte der Nachweis der Phosphospezifität der Peptidantiseren zusätzlich noch auf eine andere Art erfolgen. Beim enzymgekoppelten Immunnachweis (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) wird die Antigen-Antikörperbindung mithilfe einer

Farbentwicklung während der Enzymreaktion sichtbar gemacht. Durch die Reaktion einer Verdünnungsreihe der Peptidantiseren sollte die Differenz der Antigenität gegenüber Phospho-Nicht-Phosphopeptiden entsprechenden und sowie einem Kontroll-Phosphopeptid quantitativ bestimmt werden. Zur weiteren Kontrolle wurde das jeweils entsprechende Präimmunserum für dieselben Peptide eingesetzt. Abbildung 70 bis Abbildung 72 zeigen die Ergebnisse der Titrierung. Aus dem Abstand der Kurven für die Reaktion mit dem Phosphopeptid und dem Nicht-Phosphopeptid wurden Faktoren berechnet, die angeben, um wie viel höher die Konzentration des Antiserums sein müsste, um das Nicht-Phosphopeptid mit gleicher Effizienz wie das Phosphopeptid erkennen zu können.

Tabelle 3 fasst die so ermittelten Faktoren der relativen Reaktivitätsdifferenzen der Antiseren zusammen.

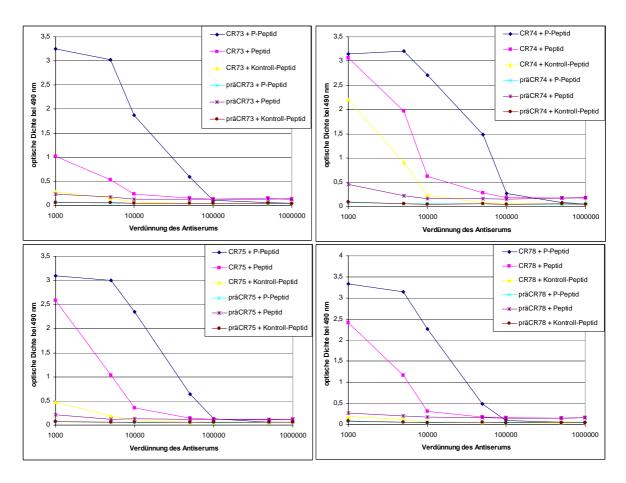


Abbildung 70: ELISAs zur Bestimmung der Phosphospezifität der Peptidantiseren CR73, CR74, CR75 und CR78

Nunc-MaxiSorb ELISA-Platten wurden mit je 10 µg Peptid inkubiert. Als Phosphopeptid für die Seren CR73 und CR74 kam Fra1, als Nicht-Phosphopeptid HPI-3 zum Einsatz und als Kontrollpeptid wurde Fra6 gewählt. Als Phosphopeptid für die Seren CR75 und CR78 kam Fra2, als Nicht-Phosphopeptid HPI-3 zum Einsatz und als Kontrollpeptid wurde Fra6 gewählt. Die Antiseren wurden in Verdünnungsstufen von 1:1 000 bis 1:1 000 000 eingesetzt. Nach der enzymatischen Reaktion wurde mithilfe eines ELISA-Geräts die optische Dichte der Proben bei 490 nm Wellenlänge bestimmt und logarithmisch aufgetragen.

Die Reaktionen der zur Kontrolle eingesetzten Präimmunseren mit Phospho- und Nicht-Phosphopeptiden war in jedem Fall sehr gering. Ebenso niedrig waren fast alle Reaktionen mit den Kontrollpeptiden, die in jedem Fall phosphoryliert waren und eine vollständig andere Sequenz als die spezifischen Peptide aufwiesen. Die Ausnahme bildete die Reaktion des Serums CR74, gerichtet gegen eine Sequenz mit phospho-S230, mit dem Kontrollpeptid Fra6. Diese war fast vergleichbar mit der Reaktion des Serums mit dem Nicht-Phosphopeptid HPI-3 (Abbildung 70). CR74 zeigte im Immunblot allerdings keine Reaktion mit DHBc, erkannte dafür andere nicht näher charakterisierte zelluläre Proteine, wahrscheinlich ein Ausdruck dieser Unspezifität. Das andere Peptidantiserum, welches die Sequenz um S230 erkennt, CR73, zeigte dagegen deutliche Phosphospezifität mit einem Faktor von 40, mit dem das Phosphopeptid Fra1 besser erkannt wurde als das Nicht-Phosphopeptid HPI-3 (Abbildung 70).

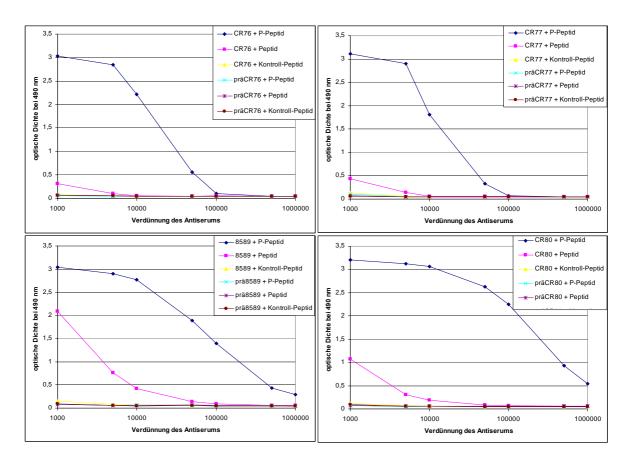


Abbildung 71: ELISAs zur Bestimmung der Phosphospezifität der Peptidantiseren CR76, CR77, 8589 und CR80

Nunc-MaxiSorb ELISA-Platten wurden mit je 10 µg Peptid inkubiert. Als Phosphopeptid für die Seren CR76 und CR77 kam Fra3, als Nicht-Phosphopeptid HPI-4 zum Einsatz und als Kontrollpeptid wurde Fra2 gewählt. Als Phosphopeptid für die Seren 8589 und CR80 kam Fra4, als Nicht-Phosphopeptid HPI-5 zum Einsatz und als Kontrollpeptid wurde Fra2 gewählt. Die Antiseren wurden in Verdünnungsstufen von 1:1 000 bis 1:1 000 000 eingesetzt. Nach der enzymatischen Reaktion wurde mithilfe eines ELISA-Geräts die optische Dichte der Proben bei 490 nm Wellenlänge bestimmt und logarithmisch aufgetragen.

Für CR75 wurde im Immunblot keine Phosphospezifität gefunden, jedoch für CR78, wobei beide Antiseren gegen die Sequenz um das phosphorylierte DHBc-S232 gerichtet sind. Im ELISA jedoch zeigte sich keine deutlich unterschiedliche Präferenz beider Seren bei der Erkennung des Phosphopeptids Fra2 und des Nicht-Phosphopeptids HPI-3 (Abbildung 70). Eine unterschiedliche konformationelle Darbietung der Sequenzen auf der PVDF-Membran im Gegensatz zur ELISA-Platte könnte eine Ursache dafür sein.

Die beiden Antiseren CR76 und CR77, die durch Immunisierung mit Fra3, einer DHBc-Sequenz mit phosphoryliertem T239, gewonnen werden konnten, zeigten im ELISA gute Phosphospezifität mit entsprechenden Faktoren von 70 und 45 (Abbildung 71). CR76 war jedoch für den Nachweis von DHBc in Lysaten von HuH7-Zellen durch Immunblot ungeeignet, weil es dort eine Hintergrundbande bei 32 kDa aufwies.

CR80 zeigte von allen Seren die deutlichste Präferenz für die Erkennung des Phosphopeptids gegenüber dem Nicht-Phosphopeptid, denn es war eine 450-fach höhere Konzentration für eine gleichwertige Erkennung des Nicht-Phosphopeptids nötig. Auch das Antiserum 8589 war mit der Differenz 70 hoch phosphospezifisch (Abbildung 71). Diese Beobachtung geht einher mit dem Verlust der Reaktivität von CR80 und 8589 mit DHBc nach CIP-Behandlung von Immunblots.

Für die Antiseren, die durch Immunisierung mit dem Phosphopeptid Fra5 für die Erkennung des phosphorylierten DHBc-S257 gewonnen wurden, CR81 und CR82, wurden im ELISA relativ niedrige Differenzen der Antigenität gegenüber Phospho- und Nicht-Phosphopeptid von 9 und 7 gefunden (Abbildung 72).

Für beide Antiseren war jedoch bereits zuvor gezeigt worden, dass sie jegliche DHBc-Erkennung verloren, wenn DHBc im Immunblot zuvor durch CIP dephosphoryliert worden war. Daher ist der Faktor von 7 nicht notwendigerweise ein Widerspruch zu der hohen Phosphospezifität eines Serums, zumindest dann nicht, wenn die Grenzkonzentration an Serum eingesetzt wird, bei der noch das Phosphopeptid, nicht aber das entsprechende Nicht-Phosphopeptid erkannt wird. Auch für die Antiseren CR83 und CR84, die gegen die Sequenz um das phosphorylierte DHBc-S259 gerichtet sind, ergaben sich im ELISA Faktoren von 18 und 7 (Abbildung 72). In Übereinstimmung damit war zuvor ebenfalls für beide der vollständige Verlust der Reaktivität mit CIP-dephosphoryliertem DHBc im Immunblot gezeigt worden.

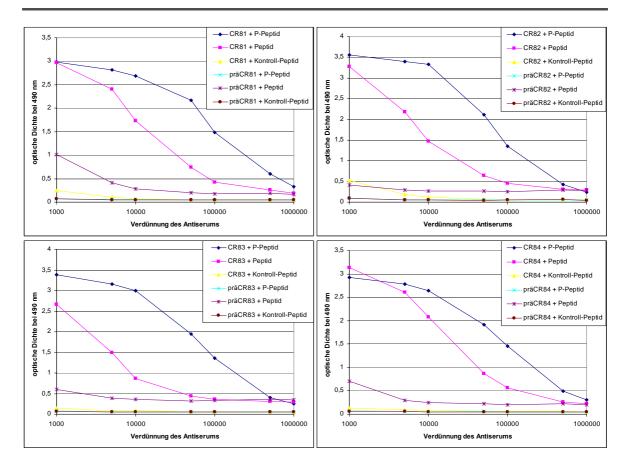


Abbildung 72: ELISAs zur Bestimmung der Phosphospezifität der Peptidantiseren CR81, CR82, CR83 und CR84

Nunc-MaxiSorb ELISA-Platten wurden mit je 10 µg Peptid inkubiert. Als Phosphopeptid für die Seren CR81 und CR82 kam Fra5, als Nicht-Phosphopeptid HPI-6 zum Einsatz und als Kontrollpeptid wurde Fra1 gewählt. Als Phosphopeptid für die Seren CR83 und CR84 kam Fra6, als Nicht-Phosphopeptid HPI-6 zum Einsatz und als Kontrollpeptid wurde Fra1 gewählt. Die Antiseren wurden in Verdünnungsstufen von 1:1 000 bis 1:1 000 000 eingesetzt. Nach der enzymatischen Reaktion wurde mithilfe eines ELISA-Geräts die optische Dichte der Proben bei 490 nm Wellenlänge bestimmt und logarithmisch aufgetragen.

Vergleicht man die Faktoren für die Phosphospezifitäten, wie sie im ELISA ermittelt wurden (Tabelle 3), so kann man feststellen, dass diese für die Peptidantiseren CR73 und CR77 deutlich höher lagen als die für CR82 und CR84. Letztere Seren aber verloren im Gegensatz zu ersteren jegliche Reaktivität mit DHBc, wenn dieses im Immunblot auf der Membran durch CIP dephosphoryliert worden war. Es kann daher angenommen werden, dass CR73 und CR77 auch im Immunblot nicht weniger phosphospezifisch reagieren als CR82 und CR84, wobei die Reaktivität nach CIP-Behandlung durch die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen des DHBc während des Blottens und damit einhergehender Unzugänglichkeit für die Phosphatase erklärt werden kann. Nicht zuletzt wiesen bereits die stark veränderten Bandenmuster im Gegensatz zum nichtphosphospezifischen Serum auf eine veränderte DHBc-Erkennung hin.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der vergleichenden Titrierung der Peptidseren

Phosphopeptid	Antiserum	Faktor P-Peptid- Erkennung über Peptiderkennung	Antiserum	Faktor P-Peptid- Erkennung über Peptiderkennung
S230	CR73	40	CR74	8
S232	CR78	7	CR75	9
T239	CR77	45	CR76	70
S245	CR80	450	8589	70
S257	CR82	7	CR81	9
S259	CR83	18	CR84	7

4.2.3.3 Reaktivität der phosphospezifischen DHBc-Antiseren in der Immunhistochemie

Für die weitere Charakterisierung der erhaltenen phosphospezifischen DHBc-Antiseren wurden diese in der Immunhistochemie auf DHBV-infizierten PDLCs getestet. Zur Kontrolle der Spezifität der Reaktionen dienten parallel nicht-infizierte PDLCs. In Abbildung 73 ist das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen der Methanol/Aceton-fixierten Zellen zu sehen. Dargestellt sind ausgewählte Bereiche, in denen Hepatozyten wuchsen.

Die Antiseren CR73, CR74, CR75 und CR78, die gegen die phosphorylierten Aminosäuren DHBc-S230 und DHBc-S232 gerichtet sind, erkannten keine infizierten Zellen. CR76, CR77, 8589, CR80, CR81, CR82, CR83 und CR84 dagegen markierten infizierte Hepatozyten. Die Spezifität der Markierung lässt sich daraus ersehen, dass nur ein Teil der Hepatozyten der infizierten Kulturen mit den Antiseren reagierte, während in nicht-infizierten Kulturen keine Hepatozyten markiert wurden. Leider regierte die Mehrzahl der Seren sowohl in DHBV-infizierten als auch nicht-infizierten PDLC-Kulturen mehr oder weniger stark mit LSECs, die aufgrund ihres Färbemusters und ihrer Morphologie eindeutig von Hepatozyten zu unterscheiden sind (Abbildung 74). Diese Reaktion muss als unspezifisch eingeordnet werden. Obwohl beschrieben worden ist, dass DHBV-Partikel von LSECs aufgenommen werden können (Breiner et al., 2001), kann dies die Markierung nicht-infizierter PDLCs nicht erklären. Die unspezifische Reaktion könnte sowohl von passiver Adsorption der Antikörper durch LSECs herrühren, als auch von in den Seren vorhandenen Antikörpern gegen andere als die DHBV-Peptid-Antigene.

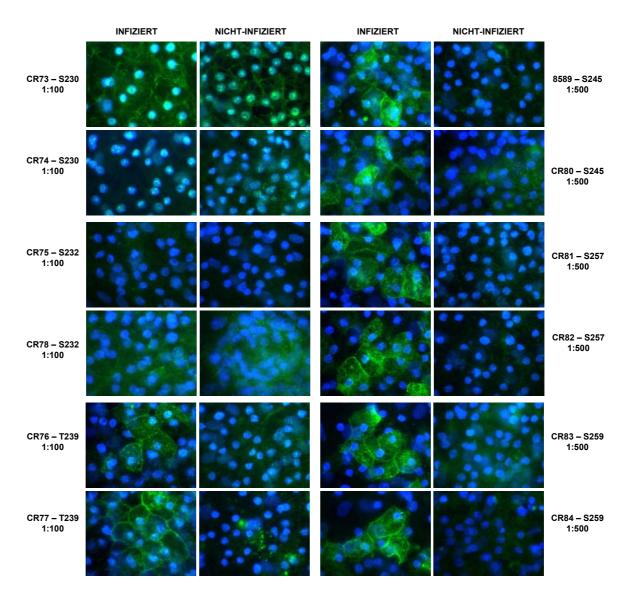


Abbildung 73: Test der anti-DHBc-Phosphopeptidantiseren in der Immunhistochemie

PDLCs wurden auf Glasplättchen ausgesät und wenige Stunden nach der Aussaat mit DHBV3-positivem oder -negativem Entenserum über Nacht inkubiert. 7 Tage nach der Infektion wurden die mit Zellen bewachsenen Plättchen geerntet, die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und in der Immunhistochemie mit den verschiedenen phosphospezifischen Antiseren gegen DHBc getestet. Ein Alexa 488-markierter Zweitantikörper wurde für den Nachweis der Immunreaktion verwendet. DNA wurde mit Hoechst gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen.

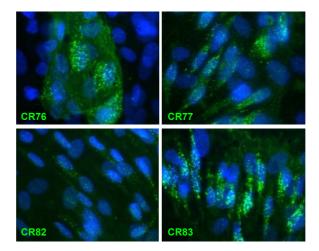


Abbildung 74: Beispiele für die Markierung von LSECs in unterschiedlicher Intensität durch anti-DHBc-Peptidantikörper

PDLCs wurden auf Glasplättchen ausgesät und wenige Stunden nach der Aussaat mit DHBV-positivem oder -negativem Entenserum über Nacht inkubiert. 7 Tage nach der Infektion wurden die mit Zellen bewachsenen Plättchen geerntet, die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und in der Immunhistochemie mit den verschiedenen phosphospezifischen Antiseren gegen DHBc getestet. Ein Alexa 488-markierter Zweitantikörper wurde für den Nachweis der Immunreaktion verwendet. DNA wurde mit Hoechst gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen.

Zusammenfassung der Ergebnisse für die Peptidantiseren

Es wurden Peptidantiseren gegen jede bekannte Phosphorylierungsstelle im DHBc hergestellt. Eine Zusammenfassung der Reaktivitäten der erhaltenen Antiseren findet sich in Tabelle 4. Bei der Immunisierung von Kaninchen mit der Peptidsequenz GRRRsKSRER wurde das Antiserum CR73 erhalten, welches phosphoryliertes DHBc-S230 im Immunblot erkannte. Leider zeigte dieses Antiserum keine Reaktivität in der Immunhistochemie. Bei der Immunisierung mit der Peptidsequenz GRRRSKsRER wurden die Antiseren CR75 und CR78 erhalten, wobei CR75 keine Phosphospezifität aufwies und auch nicht in der Immunhistochemie reagierte, während CR78 im Immunblot phosphoryliertes DHBc-S232 erkannte und auch in der Immunhistochemie mit DHBV-infizierten PDHs reagierte. Die Immunisierung mit der Peptidsequenz ERRAPtPQRA ergab die Antiseren CR76 und CR77, wobei CR76 in HuH7-Zellen eine Hintergrundbande bei 32 kDa aufwies und daher nicht im Immunblot verwendet werden konnte, in der Immunhistochemie aber mit DHBVinfizierten PDHs reagierte. CR77 dagegen reagierte mit phosphoryliertem DHBc-T239 im Immunblot und ebenfalls mit DHBV-infizierten PDHs in der Immunhistochemie. Die Antiseren 8589 und CR80, die bei der Immunisierung mit der Peptidsequenz PQRAGsPLPRS erhalten wurden, reagierten beide mit phosphoryliertem DHBc-S245 im Immunblot und zeigten auch Reaktivität in der Immunhistochemie mit DHBV-infizierten PDHs. Die Antiseren CR81 und CR82, die bei der Immunisierung mit der Peptidsequenz SHHRsPSPRK erhalten wurden, reagierten beide mit phosphoryliertem DHBc-S257 im Immunblot und zeigten auch Reaktivität in der Immunhistochemie mit DHBV-infizierten PDHs. Ebenso ergab die Immunisierung mit der Peptidsequenz SHHRSPsPRK zwei Antiseren, CR83 und CR84, die mit phosphoryliertem DHBc-S259 im Immunblot und mit DHBV-infizierten PDHs in der Immunhistochemie reagierten.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Reaktivität der Peptidantiseren in Immunblot und Immunhistochemie

Antiserum	Reaktion mit transfizierten HuH7- Zellen im Immunblot		Reaktion mit infizierten PDHs in der Immunhistochemie		Verlust der Bindung an DHBc nach Dephophorylierung von Blots mit CIP
CR73 - S230	✓	1:2000	-	1:100	-
CR74 - S230	-	1:1000	-	1:100	-
CR75 - S232	√*	1:2000	-	1:100	-
CR76 - T239	√#	1:2000	✓	1:100	-
CR77 - T239	✓	1:2000	✓	1:100	√ †
CR78 - \$232	✓	1:2000	-	1:100	√ †
8589 – S245	✓	1:20 000	✓	1:500	✓
CR80 - S245	✓	1:20 000	✓	1:500	✓
CR81 - S257	✓	1:20 000	✓	1:500	✓
CR82 - S257	✓	1:20 000	✓	1:500	✓
CR83 - S259	✓	1:20 000	✓	1:500	✓
CR84 - S259	√	1:20 000	✓	1:500	✓

^{*} nicht phosphospezifisch, # Hintergrundbande bei 32 kDa, † nur teilweise

Für jede Phosphorylierungsstelle wurde ein geeignetes Antiserum ausgewählt, für das die Phosphospezifität durch Nachweis von DHBc auf CIP-behandelten Immunblots gezeigt werden sollte. Für phosphoryliertes DHBc-T239, -S245, -S257 und -S259 mit den Antiseren CR78, CR80, CR82 und CR83 gelang dieser Nachweis. Zusätzlich konnte auch für die Seren 8589, CR81 und CR84 dieser Nachweis erbracht werden. Weiterhin wurde durch ELISA die Nachweissensitivität der Peptidantiseren im Vergleich vom Phosphopeptid zu dem gleichen, nicht phosphorylierten Peptid untersucht (Tabelle 3). Dabei ergaben sich Faktoren von 7 bis 450, die die Präferenz der Erkennung des Phosphopeptids gegenüber dem gleichen nicht phosphorylierten Peptid kennzeichnen. Im ELISA wurde die höchste Phosphospezifität für CR80 gefunden. Ebenfalls relativ hohe Spezifitäten wiesen die Seren CR73, CR76, CR77 und 8589 auf. Niedrige Phosphospezifitäten zeigten dagegen die Seren CR74, CR75, CR78, CR81, CR82 und CR84. Eine Phosphospezifität mittlerer Stärke wurde für CR83 gefunden. Da jedoch insbesondere einige der Seren mit niedrigen Spezifitäten im ELISA einen vollständigen

Verlust der Reaktivität mit CIP-dephosphoryliertem DHBc im Immunblot zeigten, kann angenommen werden, dass auch ein ELISA-Spezifitäts-Faktor von "nur" 7 durchaus mit einer guten oder sehr guten Phosphoreaktivität im Immunblot vereinbar sein kann.

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der wahrscheinlichen Dephosphorylierung von DHBc durch CNmut und PP2Awt bei Kotransfektion der Expressionskonstrukte in HuH7-Zellen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Dephosphorylierung von DHBc durch CNmut und PP2Awt

	Dephosphoryliert vermutlich durch Koexpression mit		
Phosphorylierte AS	CNmut	PP2Awt	
S230	teilweise	nicht	
S232	stark	stark	
T239	teilweise	nicht	
S245	stark	teilweise	
S257	sehr stark	stark	
S259	sehr stark	stark	

Da wie oben erläutert die Phosphorylierung nur einer Aminosäure in DHBc vermutlich keinen elektrophoretischen "Shift" ergibt und die CNmut-Koexpression zum Verlust der p34-Bande führt, wenn der Nachweis von DHBc mit dem anti-DHBc-ATG-Antiserum erfolgt, kann geschlussfolgert werden, dass es durch die Aktivität von CNmut zum weitgehenden Verlust von Mehrfach-Phosphorylierungen in DHBc kommt. Ein sehr geringer Anteil an erhaltenen Mehrfach-Phosphorylierungen konnte für jede Phosphorylierungsstelle bis auf S230 nachgewiesen werden. Es muss betont werden, dass der Großteil der Gesamtphosphorylierung durch CNmut-Expression entfernt wurde, wobei die größten Verluste an S257 und S259 auftraten. Ebenfalls sehr wenig Phosphorylierung blieb an S232 und S245 erhalten. Etwas stärker phosphoryliert blieben dagegen S230 und T239. Bei Koexpression von PP2Awt wurde S230 wahrscheinlich nicht dephosphoryliert, befand sich aber fast ausschließlich in der p32-Bande. T239 wurde in einer starken p34-Bande nachgewiesen, daher blieben vermutlich Mehrfach-Phosphorylierungen von T239 mit S245 und wahrscheinlich auch, aber schwächer, mit S259 erhalten, die beide ebenfalls eine relativ ausgeprägte p34-Bande zeigten. Diese verbleibenden Mehrfach-Phosphorylierungen erklären möglicherweise den, wenn auch schwachen, Erhalt der p34-Bande beim Nachweis mit anti-DHBc-ATG im Gegensatz zur Dephosphorylierung durch CNmut. Eine starke Dephosphorylierung erfolgte an S232 und S257.

5 Diskussion

Die Folgeerkrankungen einer Infektion mit dem humanen Hepatitis B-Virus gehören trotz der Existenz eines sehr effizienten Impfstoffes noch immer zu einer der Haupttodesursachen weltweit, vor allem, weil effektive Therapien zur Heilung der chronischen Hepatitis B noch nicht gefunden wurden. Es besteht daher großer Bedarf an der Entwicklung neuer Therapieansätze, für die ein weitreichendes Verständnis des Virus nötig ist. Die Erforschung der Biologie von HBV wird allerdings behindert durch das weitgehende Fehlen guter *in vitro*-Infektionssysteme und leicht handhabbarer Tiermodelle für die *in vivo*-Infektion. Es werden daher Tiermodelle verwandter Hepatitis B-Viren herangezogen, um wichtige Fragen des hepadnaviralen Lebenszyklus aufzuklären. Die Erforschung von DHBV im Entensystem wird schon lange parallel zu HBV vorangetrieben.

Die Analyse von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der Kapsidproteine im Lebenszyklus von HBV und DHBV mithilfe von Mutationsmimikry führte zu der Vermutung, dass der Phosphorylierungsstatus dieser Proteine eine wichtige Rolle für einzelne Schritte der Replikation spielt. Die Untersuchung von Phosphorylierungsmutanten hat aber den Nachteil, dass durch den Aminosäureaustausch Veränderungen der Protein-Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen entstehen Proteinkönnen, Auswirkungen nicht eindeutig von denen der Mimikry unterschieden werden können. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es Möglichkeiten gibt, die Phosphorylierung von DHBc während der viralen Replikation in vitro zu modulieren und damit auf den Einsatz von Phosphorylierungsmutanten zu verzichten. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Einflussnahme der Calcineurinaktivität gelegt, da Vorexperimente gezeigt hatten, dass CsA-Behandlung DHBV-infizierter PDLCs zur Hyperphosphorylierung von DHBc und dem Verlust der Infektiosität der Nachkommenviren führte. Darüberhinaus weisen die Aminosäuresequenzen Phosphorylierungsstellen Übereinstimmungen mit Zielsequenzen von Calcineurin auf. Außerdem scheinen bei DHBV insbesondere zelluläre Phosphatasen einen entscheidenden Beitrag zur viralen Replikation zu leisten, da die Reifung von Virionen mit der vollständigen Dephosphorylierung von DHBc einhergeht (Perlman et al., 2005). Mit PP2A wurde eine weitere Kandidatenphosphatase in die Untersuchungen aufgenommen, da der Vergleich der bevorzugten Phosphorylierungsmotive die Möglichkeit einer Beteiligung von PP2A an der Dephosphorylierung von DHBc nahe legte. Leider waren die

Experimente, in denen Reagenzien zur Modulation der Aktivitäten der Phosphatasen eingesetzt wurden, die auch erlaubt hätten, die Auswirkungen auf die Infektion zu untersuchen, nicht von Erfolg beschieden. Aber es gelang durch Überexpression konstitutiv aktiver Varianten beider Phosphatasen eine umfassende Hypophosphorylierung von DHBc in HuH7-Zellen zu erreichen. So konnte untersucht werden, welchen Einfluss eine Hypophosphorylierung auf die Replikation, Sekretion und Infektiosität von DHBV hat. Der Einsatz phosphospezifischer Peptidantikörper gegen jede einzelne bekannte Phosphorylierungsstelle im DHBc schließlich ließ eine tiefergehende Analyse der bei Koexpression der Phosphatasen verbleibenden Restphosphorylierung zu.

5.1 Das DHBV-Kapsidprotein ist ein potentielles Substrat für die zellulären Phosphatasen Calcineurin und PP2A

5.1.1 Fehlende Reproduzierbarkeit des Einflusses von Calcineurin auf DHBc-Phosphorylierung und DHBV-Infektiosität

Bei Beginn dieser Arbeit vorliegende, unveröffentlichte Daten wiesen auf die Beteiligung von Calcineurin bei der Dephosphorylierung von DHBc hin, da die Behandlung von infizierten PDLCs mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA zu einer Hyperphosphorylierung von DHBc, verbunden mit einer Verringerung der Infektiosität der entstandenen Virionen um das ca. 100-fache, führte. Zusätzlich ergab die Sequenzanalyse der phosphorylierten Domänen von DHBc Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Calcineurin und eventuell auch von PP2A an der Dephosphorylierung (4.1.2.1). Vor diesem Hintergrund und für die Bestätigung der Vorexperimente wurde zunächst der Einfluss von CsA auf die Virusproduktion in infizierten PDLCs und stabil transfizierten D2-Zellen untersucht. In beiden Fällen verringerte sich die Virussekretion ab einer bestimmten CsA-Konzentration (PDLCs: 5 μM, D2: 0,5 μM), die für PDLCs fünffach höher lag, als die in den Vorarbeiten verwendete. Für die verringerte Virussekretion war wahrscheinlich hauptsächlich eine verringerte Zellzahl aufgrund leichter CsA-Zytotoxizität verantwortlich. Zusätzlich kam es vermutlich zu einer leichten Sekretionshemmung oder vermehrten DHBL-Expression, wie an der erhöhten intrazellulären DHBL-Menge nach 6 Behandlungstagen ersichtlich war. Gleichzeitig zeigte das eAg eine Hyperglykosylierung auf. Welche Rolle eine Modulation der Glykosylierung des DHBe im Lebenszyklus von DHBV oder im Zusammenspiel mit dem Immunsystem des Wirts spielt, ist nicht bekannt, da diesem Protein bislang noch keine klar definierte Funktion zugewiesen werden konnte. Möglicherweise spielt es eine

Rolle bei der Modulation der Immunreaktion, indem es die T-Zell-Antwort vom Kapsidprotein "ablenkt", wie dies an einem Mausmodel von HBV demonstriert werden konnte (Milich et al., 1998).

Eine Hyperphosphorylierung des DHBc, wie sie die Vorexperimente zeigten, konnte jedoch nicht reproduziert werden. Auch führte die CsA-Behandlung von DHBV-infizierten PDLCs nicht zu einer Verringerung der Infektiosität sekretierter Virionen.

Die Ursache für die Nichtreproduzierbarkeit der Ergebnisse der Vorexperimente konnte nicht eruiert werden. Vorstellbar wäre, dass die technische Durchführung geringfügig von der damals verwendeten abwich. Dies ist jedoch wenig wahrscheinlich, da auch dem Erstexperimentator die Reproduktion der Ergebnisse nicht gelang. Erklärungsmöglichkeit für dieses generelle Problem könnte die Qualität einer oder mehrerer der verwendeten Reagenzien sein. Die genetische Heterogenität der benutzten Primärzellkulturen wurde als Grund weitgehend ausgeschlossen, denn die verwendeten Enteneier stammten von derselben Firma wie die zuvor verwendeten und die Leberzellen aller DHBV-negativen Enten einer Präparation (5-10 Stück) wurden vor der Aussaat stets vermischt.

Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die CsA-Behandlung von DHBV-infizierten PDLC-Kulturen keinen sichtbaren Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von DHBc hatte, so ist doch denkbar, dass eine bestimmte Phosphorylierungsstelle im DHBc, deren einzelne Darstellung im Immunblot mit dem zur Zeit zur Verfügung stehenden Antikörper nicht möglich war, verändert wurde. Dies könnte man bei der Fortsetzung der Untersuchungen zur Phosphorylierung von DHBc mithilfe der im späteren Verlauf der Arbeit erzeugten phosphospezifischen Antikörper versuchen zu klären.

5.1.2 Nachweis von Calcineurin und PP2A in Leberzellen der Ente und Hepatomzelllinien

Obwohl die Inhibition von Calcineurin in PDLCs durch CsA keine offensichtliche Veränderung der Phosphorylierung von DHBc erbrachte, schienen doch Calcineurin und unter Umständen ebenfalls PP2A in Frage kommende endogene Phosphatasen für die Dephosphorylierung von DHBc zu sein. Ein Grund hierfür sind die Sequenzmotive der phosphorylierten Regionen des DHBc, die sich als Zielstrukturen für diese Phosphatasen eignen (siehe 4.1.2.1). Eine Voraussetzung hierfür wäre aber die Zugänglichkeit der entsprechenden Regionen für die Phosphatasen und auch die Existenz von kompatiblen, "konformationellen" Strukturen für die Enzym-Substrat-Interaktion.

Eine zweite Voraussetzung für die Richtigkeit der Kandidatenvoraussage ist, dass diese in Hepatozyten exprimiert werden. Aus diesem Grunde wurden fötale Entenlebern, sowie Kulturen von PDLCs und relevante Zelllinien auf die Expression dieser Phosphatasen untersucht.

Calcineurin B konnte in den Hepatozyten der Ente nachgewiesen werden. Für Calcineurin A dagegen wurde keine Reaktion des Antikörpers mit Entenhepatozyten gefunden. Sinusoidale Endothelzellen allerdings wurden markiert. Dies schließt die Existenz von Calcineurin A in Hepatozyten nicht gänzlich aus, denn es könnte sein, dass der verwendete Antikörper nicht mit Enten-Calcineurin A kreuzreagiert. Das Ergebnis kann auch bedeuten, dass das Expressionsniveau sehr niedrig ist. Hierfür spricht, dass die Aktivität von Calcineurin z.B. in der Leber der Maus im Vergleich zu anderen Geweben als äußerst niedrig beschrieben wurde (3-fach niedriger als in den Nieren und 45-fach niedriger als im Gehirn). Trotzdem bewirkte die Behandlung von Mäusen mit CsA *in vivo* eine über 90%ige Inhibition der Calcineurinaktivität in der Leber (Kung et al., 2001). Von anderer Seite wurde jedoch berichtet, dass die Calcineurinaktivität der Leber CsA-resistent war (Su et al., 1995).

In verschiedenen Hepatomzelllinien konnte sowohl die Expression von Calcineurin als auch die der katalytischen Untereinheit von PP2A nachgewiesen werden, ein starker Hinweis auf die Funktionalität der Phosphatasen in diesen Zellen. Darauf basierend wurde DHBc in diesen Zellen exprimiert und der Einfluss von Inhibitoren oder Aktivatoren der endogenen und z.T. zusätzlich ektopisch exprimierten Phosphatasen in diesen Zelllinien auf die Phosphorylierung von DHBc untersucht.

Die Behandlung von transfizierten HuH7- und LMH-Zellen mit CsA hemmte stark die ektopische Expression von sowohl viralen Proteinen von pDHBV16 als auch die des Kontrollproteins Sumo-GFP. Die Menge an DHBc war jedoch stärker verringert, als die des DHBL. Eine CsA-induzierte proteolytische Degradation als Erklärung ist unwahrscheinlich, da eine Beteiligung von Proteasomen beim eventuellen Abbau von hyperphosphoryliertem DHBc ausgeschlossen werden konnte. Dieser CsA-Effekt ist daher wohl eher hauptsächlich auf eine Promotorinhibition zurückzuführen. Eine CsA-induzierte Hyperphosphorylierung, die zu erwarten wäre, vorausgesetzt Calcineurin ist an der Dephosphorylierung von DHBc beteiligt und lässt sich in Hepatozyten durch CsA inhibiteren, fand nicht statt. Weder die Inhibition von PP2A durch Okadainsäure noch die Aktivierung von Calcineurin durch Ionomycin/PMA hatten eine veränderte DHBc-Phosphorylierung zur Folge. Somit musste davon ausgegangen werden, dass entweder

Calcineurin und PP2A nicht direkt an der Dephosphorylierung von DHBc beteiligt sind oder dass Inhibition oder Aktivierung der Phosphatasen durch die klassischen Reagenzien bei HuH7- und LMH-Zellen nicht möglich sind.

Da diese Arbeit die Klärung des Einflusses der Phosphorylierung von DHBc auf den Lebenszyklus von DHBV zum Ziel hatte, musste ein anderer Weg gefunden werden, den Phosphorylierungsstatus von DHBc intrazellulär zu beeinflussen. Die Überexpression rekombinanter Phosphatasen schien dafür geeignet. Eine weitere interessante Alternative wäre der "Knockdown" von endogenen Phosphatasen, doch waren die Evidenzen für die Beteiligung einer bestimmten Phosphatase an der Dephosphorylierung für einen derartigen Ansatz nicht ausreichend. Außerdem ist unbekannt ist, ob nicht bei fehlender Expression einer Phosphatase eine andere deren Aufgabe übernehmen würde.

Die PDLC-Kultur wäre das bevorzugte System für die Überexpression einer Phosphatase gewesen, doch leider fand sich kein Reagenz, das es ermöglicht hätte, Hepatozyten in einer PDLC-Kultur quantitativ zu transfizieren, um die Überexpression einer Phosphatase herbeizuführen. Die Transduktion von DHBV-infizierten PDLCs mit Adenoviren, die Konstrukte für die Expression einer Phosphatase tragen, wäre eine eventuell eine Möglichkeit, die Untersuchung im primären Entensystem weiterzuführen. In dieser Arbeit wurde damit fortgefahren, eine Hypophosphorylierung von DHBc durch Transfektion von Calcineurin bzw. PP2A in Zelllinien herbeizuführen und dessen Einfluss auf die Replikation und Infektiosität von DHBV zu untersuchen.

5.1.3 Hypophosphorylierung von DHBc durch Überexpression von konstitutiv aktivem Calcineurin A oder der katalytischen Untereinheit von PP2A in Zelllinien

Die Koexpression einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin (CNmut) oder der katalytischen Untereinheit von PP2A mit DHBV führte zur weitgehenden intrazellulären Dephosphorylierung von DHBc in verschiedenen Hepatomzelllinien. Diese Hypophosphorylierung wurde evident durch das Fehlen der p34-Bande von DHBc, welche durch Phosphorylierung bedingt ist. Letzteres konnte durch *in vitro*-Dephosphorylierung von Zelllysaten mit CIP gezeigt werden (Abbildung 19).

Die Signalintensität der p34-Bande von DHBc war in Immunblots mit Extrakten von transfizierten HuH7- und HepG2-Zellen ähnlich stark wie die der p32-Bande. Dies bedeutet, dass es in diesen Zelllinien nach Transfektion eines CMV-Promotor-getriebenen

Expressionsvektors für DHBV16 zur Phosphorylierung von ungefähr der Hälfte aller Kapsidproteine an zumindest einer Aminosäure kommt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Mehrzahl der DHBc-Proteine im Laufe der Kapsidreifung zu einem bestimmten Zeitpunkt phosphoryliert wird, da die Zellen zum Zeitpunkt der Analyse auch bereits reife, noch nicht sekretierte Kapside enthielten, welche vermutlich schon vollständig dephosphoryliert waren. So wurde in infizierter Entenleber gefunden, dass die Hälfte aller intrazellulären Kapside mit Membranen assoziiert und hypophosphoryliert vorlag, was auf den reifen Status hinweist (Mabit and Schaller, 2000). Die Transfektion eines Dimer-Genoms von DHBV3 (dessen DHBc dieselbe Sequenz und Phosphorylierungsstellen im C-Terminus wie DHBV16 besitzt, Abbildung 76) in LMH-Zellen führte dagegen stets zu einer größeren intrazellulären Menge an hypophosphorylierem DHBc als phosphoryliertem DHBc. Die Replikation von DHBV3 in LMH-Zellen und die Infektiosität der sekretierten Virionen nach Transfektion mit einem DHBV-Dimer-Konstrukt, dessen RNA-Prägenom unter autologer viraler Transkriptionskontrolle ist, ist belegt (Condreay et al., 1990). Transfiziert man ein CMV-Promotor-getriebenes Expressionskonstrukt für DHBV in LMH-Zellen, so findet man ein ähnliches Bild wie nach pDHBV-3t-Transfektion mit einer stärkeren p32-Bande (nicht gezeigt).

Ein direkter Vergleich der Effizienz der Replikation und Sekretion von DHBV, kodiert von CMV-Promotor-getriebenen Expressionskonstrukten und Dimeren mit viralen Promotoren, zwischen transfizierten LMH- und HuH7-Zellen ist allerdings nicht möglich, da beide Zelllinien stark unterschiedliche Transfektions- und Replikationseffizienzen aufweisen. Der Grund für die oben gemachte Beobachtung könnte sein, dass das Verhältnis von reifen Kapsiden zu unreifen Kapsiden und noch nicht zu Kapsiden zusammengefundenen Kapsidproteinen in Abhängigkeit von der benutzen Zelllinie unterschiedlich ist.

Für die intrazelluläre Modifikation von DHBc kann man sich folgendes Modell vorstellen. Ein Kapsidprotein von DHBV wird sogleich nach der Synthese an einer oder mehreren Stellen phosphoryliert. Möglicherweise kommt es zu mehreren Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsschritten im Laufe der Kapsidbildung und reversen Transkription. Mit fortschreitender DNA-Synthese werden dann immer mehr Kapsidproteine dephosphoryliert bis das reife DNA-haltige Kapsid keine Phosphorylierung mehr trägt. Dieser Zustand wird von zellulären Membrankomponenten des ER und den exponierten preS-Domänen der darin eingebetteten großen Hüllproteine als Reifesignal für die Umhüllung erkannt. Bis zur Sekretion verbleibt das reife Virion in Vesikeln des ER. Werden Kapsidproteine schneller synthetisiert als sich Kapside zusammenfinden und

reifen können, so liegt intrazellulär mehr phosphoryliertes als dephosphoryliertes DHBc vor. Übersteigt die Geschwindigkeit der Kapsidreifung den Nachschub an neu synthetisiertem DHBc, so wird intrazellulär mehr dephosphoryliertes DHBc nachweisbar sein. Beides ist zusätzlich abhängig von der Sekretionsgeschwindigkeit. Ob dies zelltypabhängig unterschiedlich geschieht, könnte man prüfen, indem man die Transfektion eines DHBc-,,knockout"-DHBV-Expressionsplasmids mit unterschiedlichen DHBc-Expressionsplasmids in Mengen eines verschiedenen Zelllinien transkomplementiert. Obige Ergebnisse weisen darauf hin, dass das DHBV-Nukleokapsid in LMH-Zellen vermutlich schneller zur Reifung kommt als in HuH7- und HepG2-Zellen oder dass die Umhüllung und Sekretion der Virionen langsamer verläuft, so dass es zur Anhäufung reifer Kapside und Virionen kommt.

Unter den gleichen Bedingungen, die zur Dephosphorylierung von DHBc durch rekombinante Phosphatasen führten, bewahrte das große Hüllprotein von DHBV - DHBL seine Phosphorylierung an S118, ein Hinweis für eine gewisse Spezifität der Dephosphorylierung. Die teilweise phosphorylierte Aminosäure S118 liegt in der preS-Domäne des Hüllproteins. Diese wird zytoplasmatisch am ER synthetisiert. Posttranslational werden ca. 50% der Domänen in das Lumen des ER transloziert (Guo and Pugh, 1997; Swameye and Schaller, 1997). Die Phosphorylierung von S118 erfolgt jedoch auf der zytoplasmatischen Seite, denn es konnte gezeigt werden, dass DHBV-Partikel aus dem Serum nur dann resistent gegenüber dem Verdau mit saurer Phosphatase sind, wenn die viralen Hüllen nicht durch Detergenzien zerstört wurden (Grgacic and Anderson, 1994). Das bedeutet, dass die ursprüngliche Topologie der Phosphorylierung auf der zytoplasmatischen Seite liegen muss (vergleiche Abbildung 75). Daher kann DHBL gut als interne Kontrolle für die Spezifität der Dephosphorylierung von DHBc durch zytoplasmatische Phosphatasen wie Calcineurin und PP2A herangezogen werden, denn durch beide Phosphatasen sollte ein Großteil des intrazellulären DHBL (genau der Anteil, der noch nicht partikulär vorliegt) ebenfalls dephosphoryliert werden, wenn dies unspezifisch erfolgt.

Der Erhalt der Phosphorylierung von DHBL, während DHBc durch CNmut und PP2A dephosphoryliert wurde, weist auf eine gewisse Spezifität der Reaktionen hin. Es kann daher angenommen werden, dass die konstitutiv aktiven Phosphatasen nicht jedes Protein unspezifisch dephosphorylierten, sondern wahrscheinlich sequenz- oder konformationsspezifische Dephosphorylierungen durchführten. Dies ist ein Hinweis dafür, dass

Calcineurin und PP2A oder verwandte Enzyme als endogene Phosphatasen für die Dephosphorylierung von DHBc in Betracht kommen.

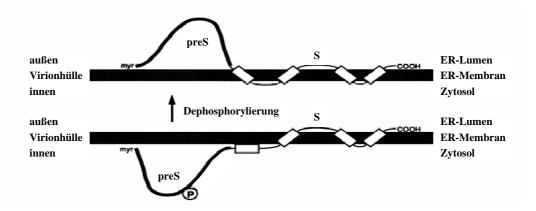


Abbildung 75: Topologie von DHBL

Die Phosphorylierung von DHBL erfolgt in der preS-Domäne auf zytosolischer Seite vor der posttranslationalen Translokation. Translozierte preS-Domänen sind dephosphoryliert. Nach Grgacic and Anderson, 1994.

Doch auch wenn dies nicht der Fall sein sollte, so konnte die Tatsache, dass die Überexpression dieser rekombinanten Phosphatasen eine weitreichende Hypophosphorylierung von DHBc zur Folge hatte, dazu verwendet werden, dessen Einfluss auf die Replikation von DHBV zu untersuchen.

Eine nicht mehr vorhandene p34-Bande des DHBc besagt jedoch nicht, dass DHBc vollständig dephosphoryliert vorliegt. Es ist durchaus vorstellbar, dass bestimmte Phosphorylierungen kein verändertes Laufverhalten eines Proteins in der PAGE verursachen (Yu and Summers, 1994b) und dies wurde im Laufe der Arbeit auch experimentell bestätigt.

Verschiedene Szenarien der unvollständigen Dephosphorylierung sind denkbar. Erstens wäre es möglich, dass eine oder mehrere phosphorylierte Aminosäurereste für rekombinantes CNmut und/oder PP2A entweder nicht zugänglich sind oder nicht durch sie dephosphoryliert werden können. Diese Möglichkeit ließe sich prüfen, indem man die einzelnen Phosphovarianten von DHBc sichtbar macht. Zweitens könnte es sein, dass die Phosphorylierung entweder an nur sehr wenigen DHBc-Proteinen eines Kapsids erfolgen muss oder ein äußerst kurzer Zeitraum der Phosphorylierung bereits genügt, um das geordnete Fortschreiten der Replikation zu ermöglichen. Diese beiden letzten Szenarien sind schwer auszuschließen, da der Nachweis einer sehr geringen Menge an phosphoryliertem DHBc in transfizierten Zellen kaum möglich ist.

5.2 Die virale Replikation unter den Bedingungen eines hypophosphorylierten Kapsidproteins

Es war bekannt, dass die Ausbildung des DHBV-Nukleokapsids und die Verpackung der pgRNA, jedoch nicht die reverse Transkription, noch stattfinden können, wenn die letzten 36 Aminosäuren des DHBc und damit alle bekannten Phosphorylierungsstellen deletiert werden.

Wenn nur die letzten 12 Aminosäuren, und damit die letzten zwei Phosphorylierungsstellen, fehlen, findet die rcDNA-Synthese statt, es entstehen jedoch keine infektiösen Viren (Schlicht et al., 1989). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass Mutationen der letzten vier Phosphorylierungsstellen von DHBc nur eine mäßige Verringerung der Enkapsidierungskapazitäten zur Folge hatten (Gazina et al., 2000). Ausgehend von diesen Erkenntnissen war zu vermuten, dass zumindest pgRNA-haltige virale Nukleokapside entstehen würden, sollte die Dephosphorylierung von DHBc einen gravierenden Effekt im Lebenszyklus haben.

Für den Fall, dass die phosphorylierten Serine die Funktionen des unreifen Kapsids unterstützen, wie durch Mutationsexperimente gefunden (Yu and Summers, 1994a), und dies durch die Koexpression von CNmut oder PP2A behindert würde, so wäre zu vermuten, dass Replikation und Infektiosität von DHBV unter diesen Umständen vermindert wären.

Um die Auswirkung eines hypophosphorylierten Kapsidproteins auf die Replikation und Sekretion von DHBV zu untersuchen, wurden die Mengen an intrazellulären viralen Proteinen, replikativen DNA-Intermediaten, sowie die Mengen an sekretierten SVPs (DHBL-Protein) und Virionen (DNA) mit und ohne Koexpression der rekombinanten Phosphatasen analysiert. Weiterhin wäre es noch möglich gewesen, die virale RNA unter diesen Bedingungen zu analysieren. Da jedoch bekannt war, dass Mutationen der Phosphorylierungsstellen in DHBc keinen großen Einfluss auf die Genomverpackung haben (Gazina et al., 2000) und gezeigt werden konnte, dass alle Formen der replikativen Intermediate in kaum veränderten Mengen und Verhältnissen synthetisiert wurden, erübrigte sich die Untersuchung der viralen RNA, denn eine Störung der RNA-Synthese oder -Verpackung hätte sich in dem Fehlen von viraler DNA widergespiegelt.

Die Amplifikation von cccDNA in Abhängigkeit von der DHBc-Phosphorylierung wurde ebenfalls nicht weiter untersucht. Deren Vorhandensein oder Fehlen neben den transfizierten Expressionsvektoren für DHBV hätte vermutlich keine Auswirkungen auf die DHBV-Expression gehabt. Bei der weiterführenden Bearbeitung des Themas sollte sie

vorstellbar aber Berücksichtigung finden, da es durchaus ist. dass die Hypophosphorylierung sich auf den Reimport von Nukleokapsiden in den Zellkern auswirkt. Diese Vermutung beruht auf der Tatsache, dass die beschriebene S245A-Mutante von DHBc, die eine Dephosphorylierung an dieser Stelle imitiert, einen Defekt bei der cccDNA-Synthese aufwies (Köck et al., 2003). In einem in vivo-System oder bei Langzeitin vitro-Infektionen hätte dies enorme Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung der viralen Replikation bzw. Infektion.

Die Extraktion der Virion-DNA aus dem Überstand transfizierter HuH7-Zellen blieb während der Untersuchungen ein kritischer Punkt, da nicht kontrolliert werden konnte, ob der initiale Proteinase K- und DNase-Verdau tatsächlich alle vorhandenen nackten Nukleokapside zerstörte. Doch stellte sich im Laufe der Experimente heraus, dass die jeweiligen Verhältnisse der erhaltenen Werte für die Mengen an Virion-DNA gut mit denen der extrahierten intrazellulären DNA bzw. denen der Infektionen korrelierten. Dies spricht dafür, dass die Verdaus der nackten Kapside generell erfolgreich waren und nur DNA aus Virionen extrahiert wurde.

In weiterführenden Experimenten könnte die Anzahl an Virionen in den Überständen, die für die Infektionen von PDLCs eingesetzt werden, genau bestimmt und angepasst werden. Zudem sollten mit jedem HuH7-Überstand mehrere Zellkulturschalen an PDLCs infiziert werden, deren Ergebnisse dann gemittelt werden können, um so die natürlichen Differenzen in der Zusammensetzung der PDLC-Kulturen besser auszugleichen. Dieses Vorgehen würde den Nachweis geringerer Unterschiede in der Infektiosität der Virionen aus den Kotransfektionen erbringen können. Ob der Nachweis nur geringer Differenzen jedoch relevant wäre, bleibt dahingestellt, da auch mit einem gewissen Fehler durch die natürliche und nicht reproduzierbare Inhomogenität der zu infizierenden PDLC-Kulturen gerechnet werden muss. Geringe Differenzen der Infektiosität von Viren könnten außerdem in einer *in vivo-*Situation nicht oder wenig relevant sein.

5.2.1 Die Dephosphorylierung durch CNmut

Durch Koexpression von CNmut mit DHBV ließ sich die DHBc-Doppelbande im Immunblot vollständig auf die dephosphorylierte p32-Bande reduzieren. Das bedeutet, dass eine weitreichende Dephosphorylierung der Mehrzahl der phosphorylierten Aminosäuren (derjenigen, die zum elektrophoretischen "shift" führen) stattgefunden haben musste. Dies hatte allerdings keinen ersichtlichen Einfluss auf die untersuchten Parameter des viralen Lebenszyklus (DNA-Replikation, Virionsekretion und Infektiosität). Sowohl die Mengen an intrazellulärer viraler DNA als auch die sekretierter Virionen und die

Effizienz der Infektion waren zwischen pBJ5- und pBJ5-CNmut-Kotransfektionen vergleichbar.

Das veränderte Verhältnis der Mengen an Virionen im Medium im Vergleich zu dem Verhältnis der intrazellulären rcDNA in dem in Abschnitt 4.1.4.4 dargestellten Experiment ließ die Vermutung zu, dass die Hypophosphorylierung möglicherweise sogar zu einer beschleunigten Reifung von Virionen führen kann. Dies ist gut vorstellbar. Da gezeigt wurde, dass DHBc von extrazellulärem DHBV vollständig dephosphoryliert ist (Perlman et al., 2005), besteht die Wahrscheinlichkeit, dass der Prozess der Dephosphorylierung bei der intrazellulären Reifung ein zeitlimitierender Faktor ist. Je schneller es dann intrazellulär zur Dephosphorylierung kommt, desto schneller können Kapside heranreifen, umhüllt und sekretiert werden.

Offensichtlich kam es trotz weitgehender Dephosphorylierung von DHBc nicht zu den replikationsinhibierenden Effekten, die viele der Experimente mit Mutationsmimikry haben vermuten lassen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die entscheidenden Aminosäuren nicht dephosphoryliert wurden. Dies kann letztendlich nur durch die Analyse der Phosphorylierungsstadien der einzelnen Aminosäuremotive geklärt werden. Weiterhin ist es möglich, dass die Phosphorylierung sehr weniger DHBc-Proteine im Kapsid oder ein stark verkürzter Phosphorylierungszeitraum ausreicht, um den entscheidenden Schritt der Replikation voranzutreiben. Nur wenige phosphorylierte Aminosäuren vor dem Hintergrund aller DHBc-Proteine in der Zelle zu finden und sauber nachzuweisen, würde sich aber als äußerst schwierig gestalten. Schließlich kommt auch noch in Betracht, dass die Mutationsmimikry nicht ohne Folgen für die Konformation oder Interaktionen der DHBc-Proteine waren und somit indirekt die Replikation, Sekretion und Infektiosität beeinträchtigten. Tatsächlich lassen sich in der Literatur Beispiele dafür finden, dass die Mimikry eines dephosphorylierten Serins durch Alanin dazu führte, dass die Interaktion, die das dephosphorylierte Protein gewöhnlich ausführt, nicht mehr stattfand (Esashi et al., 2005). In diesem Sinne könnte die Dephosphorylierung aller durch CNmut attackierten Aminosäuren ohne Einfluss auf die Replikation von DHBV sein.

Weiterführend wäre ebenfalls sehr interessant, durch Überexpression von Kinasen zu prüfen, ob eventuell der phosphorylierte Zustand einzelner Aminosäuren einen Einfluss auf die Replikation nimmt. Da das Kapsidprotein des extrazellulären Virus vollständig dephosphoryliert vorliegt, ist zu vermuten, dass durch Hyperphosphorylierung die Virionreifung deutlich behindert würde.

5.2.2 Die Dephosphorylierung durch PP2A

Bei der Hypophosphorylierung von DHBc durch PP2A fand im Gegensatz zu CNmut zwar eine deutliche, aber nicht vollständige Reduktion der Signalintensität der p34-Bande statt. Zugleich verringerte sich unter der Koexpression von PP2Awt die intrazelluläre Menge an rcDNA um den Faktor 3 bis 4. Die Verhältnisse von ssDNA und dlDNA zu rcDNA schienen dagegen nicht verändert zu sein. Daher kann man annehmen, dass kein Block der viralen DNA-Synthese vorlag. Die Ursache für die verringerte Menge an rcDNA bei PP2Awt-Koexpression liegt daher vermutlich eher auf der Ebene der Transkription oder der Verpackung der prägenomischen RNA. Ebenfalls denkbar ist aber auch ein sekundärer Effekt der Überexpression von PP2A auf den Zellmetabolismus, welcher indirekt die Replikation von DHBV negativ beeinflusst haben könnte. Der tatsächliche Grund bleibt in weiterführenden Experimenten geprüft zu werden.

Die Koexpression von PP2Adn ging einher mit einer leichten Hyperphosphorylierung von sowohl DHBc als auch DHBL. Während dieses Ergebnis für DHBc nicht erstaunlich ist, wenn man in Betracht zieht, dass die Überexpression von PP2Awt zur Dephosphorylierung führt, so war dies doch für DHBL unerwartet, wo doch dessen Phosphovariante bei Überexpression von PP2Awt mit gleicher Signalstärke erhalten blieb (siehe Abbildung 50). Dies kann durch einen direkten Effekt kaum erklärt werden und spricht eher dafür, dass PP2A entweder auf DHBc oder DHBL indirekt wirkt. Dass PP2A die raf1-MEK1/2-ERK1/2-Signalkaskade an mehreren Stellen reguliert ist ein Argument für diese Hypothese (Millward et al., 1999). ERK-Kinasen wiederum regulieren diverse intrazelluläre Signalkaskaden, welche unter anderem die zelluläre Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren. Die für die Phosphorylierung von DHBL verantwortliche Kinase und/oder die für die Dephosphorylierung von DHBc verantwortliche Phosphatase ist dann möglicherweise Teil einer dieser Signalwege. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass bei HBV das X-Protein die Aktivitäten von PI-3K-Akt/Proteinkinase B und ERK1/2 stimulieren kann (Chung et al., 2004) und dass die Anwesenheit von HBx die HBc-Phosphorylierung erhöht (Melegari et al., 2005).

Weiterhin wurde bei Koexpression von PP2Adn eine dreifach erhöhte Menge an extrazellulären Virionen gefunden. Die Infektiosität der Überstände aus der PP2Adn-Kotransfektion im Vergleich zur Kontrolltransfektion dagegen war gleich effizient. Eine derartige Tendenz war in anderen Experimenten nicht so stark ausgeprägt. Es ist daher am wahrscheinlichsten, dass der Verdau nackter Kapside in diesem einen Fall nicht vollständig war und diese die Menge an extrazellulärer Virion-DNA verfälscht haben. Wenn dies nicht

zutreffen sollte, so wäre weiterhin denkbar, dass das Verhindern der Dephosphorylierung an den Aminosäuren, welche PP2A angreift, die Sekretion von Virionen fördert, diese jedoch nicht so effizient infizieren können, wie Virionen aus kontrolltransfizierten Zellen. Da jedoch davon ausgegangen werden kann, dass nur Virionen mit vollständig dephosphorylierten Kapsiden an den bekannten Phosphorylierungsstellen entstehen können (Perlman et al., 2005), wäre es theoretisch möglich, dass weitere Aminosäuremotive, die vielleicht seltener oder zu einem geringeren Anteil phosphoryliert werden, noch nicht identifiziert wurden.

5.3 Dissektion der an der Dephosphorylierung durch Calcineurin und PP2A betroffenen Aminosäuren

Für die Interpretation der Ergebnisse war es von großer Bedeutung herauszufinden, wie viele und welche der sechs phosphorylierten Aminosäuren im DHBc durch die Überexpression von CNmut und PP2A dephosphoryliert wurden. Theoretisch könnte jede dieser Aminosäuren oder eine bestimmte Kombination von ihnen entweder im phosphorylierten oder dephosphorylierten Zustand einen spezifischen Schritt während der Replikation des Virus vorantreiben bzw. behindern. Keinen Erfolg in dieser Hinsicht brachte die Verwendung von 2-D-Gelen oder der Versuch, die Restphosphorylierung durch radioaktive Markierung nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden phosphospezifische Antikörper hergestellt, die zeigen sollten, wie vollständig die Dephosphorylierung tatsächlich war.

5.3.1 Phosphospezifische Antikörper

Die Immunisierung von je zwei Kaninchen pro Phosphopeptid erbrachte je ein spezifisches Antiserum für P-S230 (CR73), für P-232 (CR78), für P-S239 (CR77) und je zwei spezifische Antiseren für P-S245 (CR80 und 8589), P-S257 (CR81 und CR82) und P-S259 (CR83 und CR84). Alle diese Peptidantiseren zeigten ein für DHBc im Gegensatz zum anti-DHBc-ATG-Serum deutlich verändertes Bandenmuster mit starker Präferenz für die Erkennung der p34-Bande, welche nur Phosphovarianten von DHBc enthält (Abbildung 58 bis Abbildung 64).

Um die Phosphospezifität der Peptidantiseren zu belegen, wurden Immunblots mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt und die Reaktion der Seren mit dem dephosphorylierten DHBc auf den Membranen getestet. Eine Reaktion der Peptidseren CR80, CR82 und CR83 mit DHBc war nach CIP-Behandlung der Blots nicht mehr

nachweisbar, die von CR78 stark reduziert, während die Reaktion des dephospho-DHBc mit anti-DHBc-ATG unverändert war. Leider konnte für die Seren CR73 und CR77 die Phosphospezifität auf diese Weise nicht gezeigt werden (Abbildung 67 und Abbildung 68). Ein ELISA sollte zusätzlich für alle Seren die selektive Erkennung des Phosphopeptids, welches für die Immunisierung eingesetzt worden war, gegenüber dem gleichen, nicht phosphorylierten Peptid zeigen. Tatsächlich konnte für alle Seren die präferenzielle Erkennung des Phosphopeptids belegt werden (Abbildung 70 bis Abbildung 72). Die ELISA-Ergebnisse implizieren auch, dass alle Antiseren zu einem geringen Teil auch die nicht phosphorylierten Peptide erkennen. Daraus kann jedoch nicht mit Sicherheit geschlossen werden, dass die entsprechenden Sequenzen im Kontext der Gesamt-DHBc-Sequenz im Immunblot von den Antiseren mit identischer Präferenz für phosphorylierte und nicht phosphorylierte Aminosäuren erkannt wird. Hier ist zu berücksichtigen, dass DHBc nach dem Kochen in SDS-Probenpuffer, dem Lauf im elektrischen Feld im Gel, nach Transfer auf PVDF-Membran und dortiger Anhaftung vermutlich weder qualitativ noch quantitativ die gleichen Konformationen der entsprechenden Sequenzen zulässt wie dies für die auf der Plastik-Oberfläche gebundenen Peptiden in der Mikrotiterplatte der Fall ist.

Um die Spezifität der hergestellten Antiseren für die DHBc-Phosphopeptide noch weiter zu erhöhen, sollten diese für weiterführende Experimente mithilfe Matrix-gekoppelter Nicht-Phosphopeptide affinitätschromatographisch gereinigt werden. Dadurch könnte der größte Anteil nicht-phosphospezifisch reagierender Antikörper eliminiert werden.

Aus den bisherigen Ergebnissen mit den nicht-affinitätsgereinigten Peptidantiseren können folgende Schlüsse gezogen werden:

Da alle "phosphospezifischen" Antiseren DHBc-p32 markierten, führt die alleinige Phosphorylierung einer einzelnen Phosphorylierungsstelle in DHBc sehr wahrscheinlich nicht zu einem retardierten elektrophoretischen Laufverhalten des Proteins.

In HuH7-Zellen, die mit Expressionsvektoren für DHBV transfiziert worden sind, wurde von allen Peptidantikörpern die p34-Bande bevorzugt erkannt. Daraus lässt sich schließen, dass die Mehrzahl der DHBc-Proteine vor der Reifung der Kapside in mehrfach phosphorylierter Form vorliegt, wodurch sich der elektrophoretische "Aufwärts-Shift" zur p34-Variante ergibt. Jede Phosphorylierungsstelle ist anscheinend jedoch ebenfalls in einfach phosphorylierter Form vorhanden. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, dass die p32-Bande bei pBJ5-Kotransfektion in jedem Fall nachweisbar war. Ein Hinweis, dass eine der monophosphorylierten DHBc-Formen, nämlich die exklusiv an

T239 phosphorylierte Form, für die virale Replikation von Bedeutung sein könnte, ergibt sich daraus, dass diese allein bei PP2Awt-koexprimierenden Zellen nicht mehr nachweisbar war und aus der Beobachtung, dass dies mit einer verminderten intrazellulären viralen DNA-Menge assoziiert war. Interessanterweise konnte insbesondere DHBc-T239 mithilfe der Phosphorylierungsmutanten keine Rolle im viralen Lebenszyklus zugeschrieben werden (Yu and Summers, 1994a).

Dass die Einfach-Phosphorylierung keinen elektrophoretischen "Shift" zeigt, widerspricht der Interpretation der Ergebnisse, die auf Experimenten mit Mutationsmimikry basierten (Yu and Summers, 1994b). Dort wurde gezeigt, dass die DHBc-Mutanten S230A und S232A kein verändertes Laufmuster in der PAGE zeigten, während es durch die Aminosäureaustausche T239A, S245A, S257A und S259A zu einer verringerten Komplexität des elektrophoretischen Bildes kam, wobei die Autoren jedoch drei separate DHBc-Banden darstellen konnten, deren Zuordnung zu den üblicherweise nur zwei Banden wie in dieser Arbeit ungewiss ist. Ein Argument gegen die Richtigkeit der Daten dieser Arbeit wäre, dass die verwendeten Antiseren nicht absolut phosphospezifisch waren und in jedem Falle auch nicht phosphoryliertes DHBc im Immunblot erkannten. Dieser Einwand sollte auszuräumen sein, indem man eine affinitätschromatographische Aufreinigung der Seren mit Nicht-Phosphopeptiden oder mit in E.coli synthetisiertem DHBc, welches nicht phosphoryliert wird, vornimmt und die Experimente wiederholt. Wenn sich das Proteinmuster in der PAGE danach bestätigt, so wäre gezeigt, dass die Mutationsmimikry wahrscheinlich die Konformation von DHBc verändert, was nicht vorhersagbare Auswirkungen auf die vielfältigen Funktionen des Nukleokapsids haben kann.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Großteil der Phosphorylierungen des DHBc durch CNmut-Koexpression verloren ging. Noch vorhandene Phosphorylierung fand sich vor allem in der p32-Bande, was dafür spricht, dass fast nur noch Einfach-Phosphorylierungen vorlagen. Mit PP2Awt-Koexpression dagegen konnte nur eine gute Dephosphorylierung von S232, S245, S257 und S259 erreicht werden. Die Phosphorylierung an S230 blieb zumindest erhalten und von T239 blieben lediglich mehrfach phosphorylierte Varianten, am wahrscheinlichsten zusammen mit S245 und S259, bestehen. Interessanterweise führte nicht die stärkere Dephosphorylierung von DHBc durch CNmut, sondern die unvollständigere Dephosphorylierung durch PP2A zu einer leicht verringerten Virusproduktion in HuH7-Zellen. Möglicherweise verhinderte die

Überexpression von PP2A eine effiziente Dephosphorylierung von S230 und T239, was für einen indirekten Einfluss der Phosphatase auf die DHBc-Phosphorylierung spräche.

Die vorläufige Charakterisierung der Peptidantiseren in der Immunhistochemie auf ihre Reaktion mit Methanol/Aceton-fixierten DHBV-infizierten PDLC-Kulturen zeigte, dass die Antiseren, die gegen die vorderen Phosphorylierungsmotive DHBc-S230 und DHBc-S232 produziert worden waren, keine Reaktion mit infizierten Hepatozyten aufwiesen. Alle anderen Antiseren dagegen markierten spezifisch DHBc in infizierten PDHs (Abbildung 73). Die Reaktivität der Antiseren in der Immunhistochemie könnte ein Hinweis dahingehend sein, welche Epitope des DHBc-C-Terminus und damit auch welche Phosphorylierungen auf der zytoplasmatischen Seite der Kapside exponiert werden, da die Fixierung und Behandlung der Zellen nicht ausreicht, um DHBV-Nukleokapside zu sprengen. Dafür geht man davon aus, dass die Mehrzahl der Kapsidproteine in Kapsidform vorliegt, da für die Multimerisierung bereits geringe Konzentrationen an DHBc genügen. Deshalb zeigt dieses Ergebnis möglicherweise, dass die Aminosäuren T239, S245, S257 und S259 auf der Oberfläche der Nukleokapsiden zu finden sind, während die Aminosäuren S230 und S232 im Inneren der Kapside liegen, wo sie für die Antikörpererkennung von außen nicht zugänglich sind. Andererseits könnte es aber auch ein Ausdruck dafür sein, dass die Konformation der Sequenz um S230 und S232 im Kapsidzusammenhang ungünstig für die Antikörpererkennung ist oder die Antiseren CR73 und CR78 präferenziell die vollständig denaturierte Sequenz erkennen. Weitergehende Informationen könnten Immunpräzipitationen unter Kapsid-erhaltenden und Kapsiddenaturierenden Bedingungen beitragen oder auch eine Immunhistochemieanalyse unter Bedingungen, wo das Kapsid auch von innen zugänglich wird. Jedoch ist für die weitere Verwendung der Antiseren auch für diese Experimente eine affinitätschromatographische Aufreinigung mit Matrix-gekoppelten Phosphopeptiden zu empfehlen, um unspezifische Reaktivitäten, wie sie durch Markierung der LSECs sichtbar wurden (siehe Abbildung 74), zu eliminieren.

5.3.2 Widersprüche zu bereits veröffentlichten Daten

Die Ergebnisse der Hypophosphorylierung durch CNmut widersprechen weitgehend den Interpretationen der Ergebnisse, die durch Mutationsmimikry erhalten wurden. Zum Beispiel hatte der Aminosäureaustausch S245A, der ein dephosphoryliertes Serin imitieren soll, eine reduzierte Replikation von DHBV zur Folge und führte zu einer stark

verringerten Menge an sekretierten Virionen (Köck et al., 2003). Auch von anderer Seite wurde berichtet, dass die Mutante S245A einen spezifischen Defekt der (+)-Strang-DNA-Synthese aufwies und unfähig war, umhüllten Virionen zu produzieren (Yu and Summers, 1994a). Weiterhin zeigte letztere Arbeit auch, dass die Mutante S259A eine drei- bis fünffach verringerte Menge an viraler DNA und umhüllten Virionen produzierte, die darüberhinaus nicht infektiös waren. Noch drastischere Effekte wurden Mutationsmimikry in HBc berichtet. Hier führte der Austausch Phosphorylierungsstellen S157, S164 und S172 zu Alanin dazu, dass die prägenomische RNA nicht einmal mehr verpackt werden konnte (Lan et al., 1999). Bemerkenswert an den Daten zur Mutationsmimikry von HBc ist, dass zwei verschiedene Mutanten, die beide phosphoryliertes HBc imitieren sollen, einmal durch Austausch aller drei Serine mit Asparaginsäure und einmal mit Glutaminsäure, ganz unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Erstere Mutante unterstützt die reverse Transkription nicht, während letztere durchaus zur Ausbildung von rcDNA fähig ist (Köck et al., 2004). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Mutationen über das Mimikry hinausgehende Auswirkungen haben können. Ein zweiter interessanter Punkt ist, dass bei HBc beobachtet wurde, dass Mimikry-Mutanten dominant negative Phänotypen besitzen, wenn sie mit Wildtyp-Virus in Transfektionen gemischt werden (Melegari et al., 2005). Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass fast alle Kapsidproteine eines Nukleokapsids zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Replikation an einer oder mehreren definierten Stelle phosphoryliert oder dephosphoryliert sein müssen - wofür es bisher keine Daten gibt - oder dass es zu einer gestörten Kapsidintegrität kommt, wodurch dessen Funktionen behindert werden. Über analoge Versuche wurde für DHBV bisher nicht berichtet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei DHBV das Stattfinden der Replikation der viralen DNA, die Ausbildung und Sekretion von Virionen und deren Infektiosität vom Großteil der Phosphorylierung an allen Phosphorylierungsstellen im DHBc unabhängig ist. Die durch Dephosphorylierung von DHBc mit CNmut erhaltenen Daten widersprechen klar der bisherigen Vorstellung, dass S245 in phosphorylierter Form eine wichtige Rolle bei der Regulation der reversen Transkription des RNA-Prägenoms übernimmt. Ebenso sind sie kaum vereinbar mit der Vorstellung, dass dephosphoryliertes S245 zu verminderter DNA-Replikation und Virionsekretion führt, vor allem, wenn angenommen wird, dass alle Kapsidproteine eines Nukleokapsids zum gleichen Zeitpunkt an einer bestimmten Aminosäure phosphoryliert oder dephosphoryliert sein müssen. Tatsächlich läuft die Virusreifung von DHBV in HuH7-Zellen bei starker Mehrfach-

Falle der pBJ5-Kotransfektion, Phosphorylierung, wie im und weitgehender Dephosphorylierung und nur geringer restlicher Einfach-Phosphorylierung, im Falle der CNmut-Koexpression, gleich effektiv ab. Es scheint daher sehr unwahrscheinlich, dass der spezifische Phosphorylierungsstatus von DHBc zu irgendeinem Punkt der Virusreifung eine entscheidende Rolle spielt. Sollte die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung für bestimmten Phosphorylierungsstelle die Virusreplikation doch entscheidender Bedeutung sein, so muss angenommen werden, Phosphorylierungsstatus entweder bei nur sehr wenigen Kapsidproteinen im Nukleokapsid nötig ist oder nur für eine sehr kurze Zeitspanne. Sollte dies so sein, dann wären diese Situationen auch mit hoch-phosphospezifischen Antikörpern nicht nachweisbar, da in der Zelle zu jedem Zeitpunkt ein Gemisch an Kapsiden unterschiedlicher Reifestufen vorliegt. Nur die Auftrennung intrazellulärer Kapside verschiedener Reifestufen und deren getrennte Untersuchung würde möglicherweise Klarheit in diesem Punkt bringen. Einer Forschergruppe um D. H. Perlmann gelang es, verschiedene Reifestadien von Nukleokapsiden des DHBV aus D2-Zellen durch Geschwindigkeitsgradientenzentrifugation aufzutrennen. Eine Quantifizierung des Anteils verschiedener Reifestadien an der Gesamtheit aller intrazellulären Nukleokapside und die Untersuchung der spezifischen Phosphorylierung einzelner Reifestadien erfolgte jedoch bisher nicht (Perlman et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit widmete sich nicht dem Einfluss des Phosphorylierungsstatuses von DHBc auf die akute Infektion, inklusive Reimports von Nukleokapsiden in den Zellkern. Es kann daher sehr gut sein, dass eine starke Phosphorylierung an dieser Stelle eine entscheidende Rolle spielt (siehe unten).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die durch Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin und der katalytischen Untereinheit von PP2A erfolgte, weitgehende Dephosphorylierung von DHBc keinen gravierenden Einfluss auf die intrazelluläre Replikation von DHBV hatte. Ebenso waren Sekretion und Infektiosität von Virionen nicht maßgeblich beeinflusst. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Mehrzahl der Phosphorylierungen von DHBc während der Replikation in HuH7-Zellen für einen produktiven Lebenszyklus von DHBV nicht erforderlich sind.

5.4 Offene Fragen und Ausblick

Keine befriedigende Antwort gibt es derzeit auf die Frage, warum es überhaupt zur Phosphorylierung so vieler Aminosäuren von DHBc kommt, wenn die meisten von ihnen bei der viralen Replikation von DHBV keine Rolle spielen. Um eine Antwort darauf zu finden, wäre es erforderlich, den Einfluss einer Hypophosphorylierung während der akuten Infektion zu untersuchen. Es ist durchaus vorstellbar, dass für den nukleären Transport von Nukleokapsiden und den Zerfall des Kapsids in der Kernpore die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren eine entscheidende Rolle spielt. So wurde für HBV in einem *in vitro*-System gezeigt, dass nur phosphorylierte Kapside an die Kernpore binden (Kann et al., 1999). Für eine solche Untersuchung wäre die Transduktion von PDLCs mit adenoviralen Konstrukten zur Phosphatase-Expression mit anschließender Infektion möglich. Außerdem sollte geprüft werden, ob die Ausbildung der cccDNA unter Hypophosphorylierung von DHBc verändert ist. Diese Experimente könnten in LMH-Zellen erfolgen, von denen bekannt ist, dass sie cccDNA synthetisieren.

Eine andere interessante Alternative für die Rolle der Phosphorylierung bei Hepadnaviren ist verbunden mit der Modulation der Immunantwort. Für HBc wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung aller Serine im C-Terminus die Bindung an Makrophagen und damit die Induktion von Cytokinen reduziert (Cooper et al., 2005). Somit könnte eine Funktion der intrazellulären Hyperphosphorylierung sein, beim Freisetzen der unreifen Kapside durch Zelltod die Immunreaktion gering zu halten.

Der Nachweis einer direkten Interaktion von DHBc mit einer der Phosphatasen gelang bisher nicht. Daher wäre zu erwägen, weitere Phosphatasen auf ihren Einfluss auf die DHBc-Phosphorylierung zu testen, um mögliche weitere Kandidatenphosphatasen für die direkte Dephosphorylierung zu identifizieren. Mindestens ebenso interessant wäre es, den Einfluss überexprimierter Kinasen zu erforschen.

Im Fall der hergestellten "phosphospezifischen" Peptidantiseren sollten die Ergebnisse auf jeden Fall nach affinitätschromatographischer Aufreinigung bestätigt werden. Daraufhin könnte untersucht werden, ob der Phosphorylierungsstatus einzelner Phosphorylierungsstellen in LMH-Zellen und PDLCs vergleichbar ist mit dem in HuH7-Zellen und, bei Kreuzreaktivität der Peptidantiseren mit den entsprechenden Phosphorylierungsstellen anderer Vogelhepadnaviren, der Phosphorylierungsstatus der Kapsidproteine verwandter Viren untersucht werden.

Der Sequenzvergleich der C-Termini der Nukleokapsidproteine verschiedener Vogelhepadnaviren (Abbildung 76) zeigt den hohen Grad der Konservierung der gesamten C-terminalen Sequenz und insbesondere der phosphorylierten Aminosäuren S230, S232, S245, S257 und S259. T239 dagegen ist nur bei RgHBV (engl.: Ross's Goose hepatitis B virus) konserviert.

C-Terminus:		Peptid T239		
		Peptide S230 und S232	Peptid S245	Peptide S257 und S259
DHBV3	RRRKVKTTVVY	GRRR s k s rerra	P T PQRAG S PLPRSS	SSHHR S P S PRK
DHBV16	RRRKVKTTVVY	GRRR s k s rerra	P T PQRAG S PLPRSS	SSHHR S P S PRK
RgHBV	RRRKVKTTVVY	GRRR s k s rerra	P T PQRAG S PLPRSS	SSHHR S P S PRK
SgHBV			SS <mark>PQRAGSPLPRSS</mark>	
ShgHBV			PSPQRAG S PLPRPS	
HHBV			<mark>SPS</mark> QRAG S PLPR <mark>NR</mark>	
StHBV	RRRKVKTTVVY	GRRR s k s r <mark>g</mark> rr <mark>s</mark>	<mark>SPS</mark> QRAG S PIPR <mark>NR</mark>	E <mark>NQ</mark> SR S SSPR <mark>E</mark>

Abbildung 76: Vergleich der C-terminalen Sequenzen der Nukleokapsidproteine verschiedener Vogelhepadnaviren

Dargestellt sind die C-Termini der Kapsidproteine von DHBV der Subtypen 3 und 16, der Hepadnaviren von Zwergschneegans (engl.: Ross's Goose HBV, RgHBV), Schneegans (engl.: Snow Goose, SgHBV), Andengans (engl.: Sheldgoose, ShgHBV), Graureiher (engl.: Heron, HHBV) und Storch (engl.: Stork, StHBV). Übereinstimmende Sequenz wurde grün, die konservierten Aminosäuren bei HHBV und StHBV violett hinterlegt. Phosphorylierte Aminosäuren bei DHBV und entsprechend konservierten Aminosäuren der anderen Viren wurden fett gedruckt.

Andere Gänsehepatitisviren (SgHBV - snow goose HBV und ShgHBV - sheldgoose HBV) weisen an dieser Stelle anstelle des TP- ein SP-Motiv auf, das möglicherweise ebenfalls phosphoryliert wird. Die Hepadnaviren von Reiher (HHBV, heron HBV) und Storch (StHBV, stork HBV) besitzen ein um eine Aminosäure stromaufwärts verschobenes SP-Motiv, an dem auch eine Phosphorylierung vorliegen könnte. Die gegen die phosphorylierten Aminosäuren im C-Terminus von DHBc gerichteten Antikörper sind in jedem Fall geeignet, den Grad der Phosphorylierung des C-Proteins von RgHBV zu untersuchen. Alle Antiseren, bis auf CR76, welches T239 erkennt, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls die entsprechenden Phosphorylierungsstellen von SgHBV erkennen. S230, S245 und S259 von HHBV und StHBV sollten ebenfalls mit guter Wahrscheinlichkeit erkannt werden, auch wenn die Sequenzen in näherer Nachbarschaft einige nicht konservierte Aminosäuren aufweisen. Die Erkennung von S232 und S257 dagegen ist schwieriger vorherzusagen, da nicht konservierte Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft auftreten. Insgesamt jedoch bestehen gute Aussichten dafür, mit den gewonnenen Antikörpern auch die Phosphorylierung an Nukleokapsidproteinen anderer Vogelhepadnaviren untersuchen und durch den Vergleich mit DHBV weitere

Schlüsse auf die Rolle der Phosphorylierung in Lebenszyklus von Hepadnaviren ziehen zu können.

Schließlich könnte durch Einsatz der phosphospezifischen Peptidantiseren der noch umstrittenen Frage nachgegangen werden, ob sich die Phosphorylierung am DHBV-Kapsid auf zytoplasmatischer oder luminaler Seite befindet. Durch Immunpräzipitation intakter Zellextrakten ließe unreifer Kapside aus sich eventuell bestimmen, phosphorylierten Aminosäuren nach außen gerichtet sind und welche eine luminale Orientierung haben. In Verbindung mit Zentrifugations- oder anderen Techniken, die verschiedene Reifestadien der Kapside zu trennen vermögen, könnte so auch die Veränderung des Phosphorylierungsstatuses während der Kapsidreifung verfolgt werden (Perlman et al., 2005). Ganz besonders interessant in diesem Zusammenhang wäre ebenfalls die Verwendung eines synchronisierten DHBV-Replikationssystems wie für eine Temperatur-sensitive DHBV-Mutante in stabil transfizierten LMH-Zellen beschrieben worden ist (Seeger et al., 1996), um die Kinetik der Phosphorylierung und Dephosphorylierung einzelner Aminosäuren aufzuklären.

Von grundsätzlicher Bedeutung wäre natürlich, die Thematik der Kapsidphosphorylierung im Kontext von HBV zu untersuchen. Da reife HBV-Kapside eine Phosphorylierung aufweisen, welche möglicherweise in unmittelbarer Folge der Erststrang-DNA-Synthese vom Inneren des Kapsids aus erfolgt (A. Bischof, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, 1999) und somit im Gegensatz zu DHBV einen die Kapsidreife begleitenden Prozess darstellt, könnte angenommen werden, dass die Überexpression einer Phosphatase einen gravierenderen Einfluss auf die virale Replikation und Ausbildung reifer Virionen als bei DHBV hat. Vielversprechend wäre es, eine HepaRG-Zelllinie zu entwickeln, die induzierbar CNmut oder andere Phosphatasen oder Kinasen exprimiert bzw. in der diese Enzyme ausschaltbar sind. Diese könnte sowohl mit HBV transfiziert als auch infiziert werden, um jeden Aspekt des Lebenszyklus von HBV bei Hypo- oder Hyperphosphorylierung des Kapsidproteins zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Acs, G., M.A. Sells, R.H. Purcell, P. Price, R. Engle, M. Shapiro and H. Popper, 1987, Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees, Proc Natl Acad Sci U S A 84, 4641.
- Aden, D.P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov and B.B. Knowles, 1979, Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, Nature 282, 615.
- Aramburu, J., F. Garcia-Cozar, A. Raghavan, H. Okamura, A. Rao and P.G. Hogan, 1998, Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT, Mol Cell 1, 627.
- Aramburu, J., M.B. Yaffe, C. Lopez-Rodriguez, L.C. Cantley, P.G. Hogan and A. Rao, 1999, Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A, Science 285, 2129.
- Awumey, E.M., B.S. Moonga, B.R. Sodam, A.P. Koval, O.A. Adebanjo, M. Kumegawa, M. Zaidi and S. Epstein, 1999, Molecular and functional evidence for calcineurin-A alpha and beta isoforms in the osteoclast: novel insights into cyclosporin A action on bone resorption, Biochem Biophys Res Commun 254, 248.
- Baharians, Z. and A.H. Schonthal, 1998, Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression, J Biol Chem 273, 19019.
- Beck, J. and M. Nassal, 2003, Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein, J Biol Chem 278, 36128.
- Bialojan, C. and A. Takai, 1988, Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics, Biochem J 256, 283.
- Borel, C., C. Sunyach, O. Hantz, C. Trepo and A. Kay, 1998, Phosphorylation of DHBV pre-S: identification of the major site of phosphorylation and effects of mutations on the virus life cycle, Virology 242, 90.
- Borel, J.F., C. Feurer, H.U. Gubler and H. Stahelin, 1976, Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent, Agents Actions 6, 468.
- Bork, P., N.P. Brown, H. Hegyi and J. Schultz, 1996, The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues, Protein Sci 5, 1421.
- Bosser, R., R. Aligue, D. Guerini, N. Agell, E. Carafoli and O. Bachs, 1993, Calmodulin can modulate protein phosphorylation in rat liver cells nuclei, J Biol Chem 268, 15477.
- Bouchard, M.J. and R.J. Schneider, 2004, The enigmatic X gene of hepatitis B virus, J Virol 78, 12725.
- Breiner, K.M., H. Schaller and P.A. Knolle, 2001, Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms, Hepatology 34, 803.
- Bruns, M., S. Miska, S. Chassot and H. Will, 1998, Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles, J Virol 72, 1462.
- Bruss, V., 2004, Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid, Virus Res 106, 199.
- Calvert, J. and J. Summers, 1994, Two regions of an avian hepadnavirus RNA pregenome are required in cis for encapsidation, J Virol 68, 2084.
- Chan, D.W. and I.O. Ng, 2006, Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells, J Pathol 208, 372.

- Chang, S.F., H.J. Netter, E. Hildt, R. Schuster, S. Schaefer, Y.C. Hsu, A. Rang and H. Will, 2001, Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame, J Virol 75, 161.
- Chen, M., M. Sallberg, J. Hughes, J. Jones, L.G. Guidotti, F.V. Chisari, J.N. Billaud and D.R. Milich, 2005, Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins, J Virol 79, 3016.
- Chojnacki, J., D.A. Anderson and E.V. Grgacic, 2005, A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome, J Virol 79, 14945.
- Chung, T.W., Y.C. Lee and C.H. Kim, 2004, Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential, Faseb J 18, 1123.
- Chuvpilo, S., E. Jankevics, D. Tyrsin, A. Akimzhanov, D. Moroz, M.K. Jha, J. Schulze-Luehrmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. Konig, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl and E. Serfling, 2002, Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis, Immunity 16, 881.
- Clipstone, N.A. and G.R. Crabtree, 1993, Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506, Ann N Y Acad Sci 696, 20.
- Clipstone, N.A., D.F. Fiorentino and G.R. Crabtree, 1994, Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes, J Biol Chem 269, 26431.
- Coghlan, V.M., B.A. Perrino, M. Howard, L.K. Langeberg, J.B. Hicks, W.M. Gallatin and J.D. Scott, 1995, Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein, Science 267, 108.
- Condreay, L.D., C.E. Aldrich, L. Coates, W.S. Mason and T.T. Wu, 1990, Efficient duck hepatitis B virus production by an avian liver tumor cell line, J Virol 64, 3249.
- Cooper, A., G. Tal, O. Lider and Y. Shaul, 2005, Cytokine Induction by the Hepatitis B Virus Capsid in Macrophages Is Facilitated by Membrane Heparan Sulfate and Involves TLR2, J Immunol 175, 3165.
- Cooper, N.G., B.J. McLaughlin, E.A. Tallant and W.Y. Cheung, 1985, Calmodulin-dependent protein phosphatase: immunocytochemical localization in chick retina, J Cell Biol 101, 1212.
- Coussens, L.M. and Z. Werb, 2002, Inflammation and cancer, Nature 420, 860.
- Cullen, J.M., P.L. Marion and J.E. Newbold, 1989, A sequential histologic and immunohistochemical study of duck hepatitis B virus infection in Pekin ducks, Vet Pathol 26, 164.
- Donella-Deana, A., M.H. Krinks, M. Ruzzene, C. Klee and L.A. Pinna, 1994, Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B), Eur J Biochem 219, 109.
- Esashi, F., N. Christ, J. Gannon, Y. Liu, T. Hunt, M. Jasin and S.C. West, 2005, CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair, Nature 434, 598.
- Evans, D.R., T. Myles, J. Hofsteenge and B.A. Hemmings, 1999, Functional expression of human PP2Ac in yeast permits the identification of novel C-terminal and dominant-negative mutant forms, J Biol Chem 274, 24038.

- Favre, B., P. Turowski and B.A. Hemmings, 1997, Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin, J Biol Chem 272, 13856.
- Fellner, T., D.H. Lackner, H. Hombauer, P. Piribauer, I. Mudrak, K. Zaragoza, C. Juno and E. Ogris, 2003, A novel and essential mechanism determining specificity and activity of protein phosphatase 2A (PP2A) in vivo, Genes Dev 17, 2138.
- Ferenci, P., 2004, Treatment of chronic viral hepatitis, Best Pract Res Clin Gastroenterol 18 Suppl, 113.
- Fernholz, D., G. Wildner and H. Will, 1993, Minor envelope proteins of duck hepatitis B virus are initiated at internal pre-S AUG codons but are not essential for infectivity, Virology 197, 64.
- Ferreira, A., R. Kincaid and K.S. Kosik, 1993, Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity, Mol Biol Cell 4, 1225.
- Fruman, D.A., S.Y. Pai, C.B. Klee, S.J. Burakoff and B.E. Bierer, 1996, Measurement of Calcineurin Phosphatase Activity in Cell Extracts, Methods 9, 146.
- Funk, A., M. Mhamdi, L. Lin, H. Will and H. Sirma, 2004, Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry, J Virol 78, 8289.
- Gagliardino, J.J., M.H. Krinks and E.E. Gagliardino, 1991, Identification of the calmodulin-regulated protein phosphatase, calcineurin, in rat pancreatic islets, Biochim Biophys Acta 1091, 370.
- Ganem, D. and H.E. Varmus, 1987, The molecular biology of the hepatitis B viruses, Annu Rev Biochem 56, 651.
- Gazina, E.V., J.E. Fielding, B. Lin and D.A. Anderson, 2000, Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses, J Virol 74, 4721.
- Gerelsaikhan, T., J.E. Tavis and V. Bruss, 1996, Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis, J Virol 70, 4269.
- Gorlach, J., D.S. Fox, N.S. Cutler, G.M. Cox, J.R. Perfect and J. Heitman, 2000, Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calcipressin, in Cryptococcus neoformans, EMBO J 19, 3618.
- Gostissa, M., A. Hengstermann, V. Fogal, P. Sandy, S.E. Schwarz, M. Scheffner and G. Del Sal, 1999, Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1, EMBO J 18, 6462.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell and R. Nairn, 1977, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, J Gen Virol 36, 59.
- Grgacic, E.V. and D.A. Anderson, 1994, The large surface protein of duck hepatitis B virus is phosphorylated in the pre-S domain, J Virol 68, 7344.
- Grgacic, E.V. and D.A. Anderson, 2005, St, a truncated envelope protein derived from the S protein of duck hepatitis B virus, acts as a chaperone for the folding of the large envelope protein, J Virol 79, 5346.
- Grgacic, E.V., C. Kuhn and H. Schaller, 2000, Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation, J Virol 74, 2455.
- Grgacic, E.V. and H. Schaller, 2000, A metastable form of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: low-pH release results in a transition to a hydrophobic, potentially fusogenic conformation, J Virol 74, 5116.

- Gripon, P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo and C. Guguen-Guillouzo, 2002, Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus, Proc Natl Acad Sci U S A 99, 15655.
- Guidotti, L.G., R. Rochford, J. Chung, M. Shapiro, R. Purcell and F.V. Chisari, 1999, Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection, Science 284, 825.
- Guo, J.T. and J.C. Pugh, 1997, Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis, J Virol 71, 1107.
- Halpern, M.S., J.M. England, D.T. Deery, D.J. Petcu, W.S. Mason and K.L. Molnar-Kimber, 1983, Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus, Proc Natl Acad Sci U S A 80, 4865.
- Hanley, R.M., J.R. Dedman and S. Shenolikar, 1987, Identification of high-affinity calmodulin-binding proteins in rat liver, Am J Physiol 252, C277.
- Hirsch, R.C., D.D. Loeb, J.R. Pollack and D. Ganem, 1991, cis-acting sequences required for encapsidation of duck hepatitis B virus pregenomic RNA, J Virol 65, 3309.
- Hu, J., D.O. Toft and C. Seeger, 1997, Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multicomponent chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids, EMBO J 16, 59.
- Hudson, J.D., M.A. Shoaibi, R. Maestro, A. Carnero, G.J. Hannon and D.H. Beach, 1999, A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity, J Exp Med 190, 1375.
- Ingebritsen, T.S., A.A. Stewart and P. Cohen, 1983, The protein phosphatases involved in cellular regulation.

 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles, Eur J Biochem 132, 297.
- Irving, M.G., F.J. Roll, S. Huang and D.M. Bissell, 1984, Characterization and culture of sinusoidal endothelium from normal rat liver: lipoprotein uptake and collagen phenotype, Gastroenterology 87, 1233.
- Jiang, H., F. Xiong, S. Kong, T. Ogawa, M. Kobayashi and J.O. Liu, 1997, Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin, Mol Immunol 34, 663.
- Jilbert, A.R., J.A. Botten, D.S. Miller, E.M. Bertram, P.M. Hall, J. Kotlarski and C.J. Burrell, 1998, Characterization of age- and dose-related outcomes of duck hepatitis B virus infection, Virology 244, 273.
- Jilbert, A.R., J.S. Freiman, E.J. Gowans, M. Holmes, Y.E. Cossart and C.J. Burrell, 1987, Duck hepatitis B virus DNA in liver, spleen, and pancreas: analysis by in situ and Southern blot hybridization, Virology 158, 330.
- Kann, M. and W.H. Gerlich, 1994, Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus, J Virol 68, 7993.
- Kann, M., B. Sodeik, A. Vlachou, W.H. Gerlich and A. Helenius, 1999, Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex, J Cell Biol 145, 45.
- Kawaguchi, T., K. Nomura, Y. Hirayama and T. Kitagawa, 1987, Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH, Cancer Res 47, 4460.
- Ke, H. and Q. Huai, 2003, Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants, Biochem Biophys Res Commun 311, 1095.

- Kehlenbach, R.H., A. Dickmanns and L. Gerace, 1998, Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT In vitro, J Cell Biol 141, 863.
- Kennedy, M.T., H. Brockman and F. Rusnak, 1996, Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function, J Biol Chem 271, 26517.
- Kennedy, M.T., H. Brockman and F. Rusnak, 1997, Determinants of calcineurin binding to model membranes, Biochemistry 36, 13579.
- Kincaid, R.L., P.R. Giri, S. Higuchi, J. Tamura, S.C. Dixon, C.A. Marietta, D.A. Amorese and B.M. Martin, 1990, Cloning and characterization of molecular isoforms of the catalytic subunit of calcineurin using nonisotopic methods, J Biol Chem 265, 11312.
- Kincaid, R.L., H. Takayama, M.L. Billingsley and M.V. Sitkovsky, 1987, Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes, Nature 330, 176.
- Kino, T., H. Hatanaka, M. Hashimoto, M. Nishiyama, T. Goto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Aoki and H. Imanaka, 1987, FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics, J Antibiot (Tokyo) 40, 1249.
- Klee, C.B., G.F. Draetta and M.J. Hubbard, 1988, Calcineurin, Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 61, 149.
- Kleinberger, T. and T. Shenk, 1993, Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription, J Virol 67, 7556.
- Klumpp, S. and J. Krieglstein, 2002, Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis, Curr Opin Pharmacol 2, 458.
- Köck, J., E.M. Borst and H.J. Schlicht, 1996, 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, 5827.
- Köck, J., M. Kann, G. Putz, H.E. Blum and F. Von Weizsacker, 2003, Central role of a serine phosphorylation site within duck hepatitis B virus core protein for capsid trafficking and genome release, J Biol Chem 278, 28123.
- Köck, J., M. Nassal, K. Deres, H.E. Blum and F. von Weizsacker, 2004, Hepatitis B virus nucleocapsids formed by carboxy-terminally mutated core proteins contain spliced viral genomes but lack full-size DNA, J Virol 78, 13812.
- Köck, J. and H.J. Schlicht, 1993, Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity, J Virol 67, 4867.
- Köck, J., S. Wieland, H.E. Blum and F. von Weizsacker, 1998, Duck hepatitis B virus nucleocapsids formed by N-terminally extended or C-terminally truncated core proteins disintegrate during viral DNA maturation, J Virol 72, 9116.
- Kung, L., T.D. Batiuk, S. Palomo-Pinon, J. Noujaim, L.M. Helms and P.F. Halloran, 2001, Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine, Am J Transplant 1, 325.
- Lai, M.M., P.E. Burnett, H. Wolosker, S. Blackshaw and S.H. Snyder, 1998, Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin, J Biol Chem 273, 18325.
- Lan, Y.T., J. Li, W. Liao and J. Ou, 1999, Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication, Virology 259, 342.

- Lara-Pezzi, E., A.L. Armesilla, P.L. Majano, J.M. Redondo and M. Lopez-Cabrera, 1998, The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway, Embo J 17, 7066.
- Lechward, K., O.S. Awotunde, W. Swiatek and G. Muszynska, 2001, Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions, Acta Biochim Pol 48, 921.
- Lee, J.Y., J.G. Culvenor, P. Angus, R. Smallwood, A. Nicoll and S. Locarnini, 2001, Duck hepatitis B virus replication in primary bile duct epithelial cells, J Virol 75, 7651.
- Liao, W. and J.H. Ou, 1995, Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs, J Virol 69, 1025.
- Limmer, A., J. Ohl, C. Kurts, H.G. Ljunggren, Y. Reiss, M. Groettrup, F. Momburg, B. Arnold and P.A. Knolle, 2000, Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance, Nat Med 6, 1348.
- Lin, X. and D.L. Barber, 1996, A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange, Proc Natl Acad Sci U S A 93, 12631.
- Liu, N., R. Tian and D.D. Loeb, 2003, Base pairing among three cis-acting sequences contributes to template switching during hepadnavirus reverse transcription, Proc Natl Acad Sci U S A 100, 1984.
- Lu, X., T.M. Block and W.H. Gerlich, 1996, Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line, J Virol 70, 2277.
- Mabit, H., K.M. Breiner, A. Knaust, B. Zachmann-Brand and H. Schaller, 2001, Signals for bidirectional nucleocytoplasmic transport in the duck hepatitis B virus capsid protein, J Virol 75, 1968.
- Mabit, H., A. Knaust, K.M. Breiner and H. Schaller, 2003, Nuclear localization of the duck hepatitis B virus capsid protein: detection and functional implications of distinct subnuclear bodies in a compartment associated with RNA synthesis and maturation, J Virol 77, 2157.
- Mabit, H. and H. Schaller, 2000, Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding, J Virol 74, 11472.
- Machida, A., H. Ohnuma, F. Tsuda, A. Yoshikawa, Y. Hoshi, T. Tanaka, S. Kishimoto, Y. Akahane, Y. Miyakawa and M. Mayumi, 1991, Phosphorylation in the carboxyl-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody, J Virol 65, 6024.
- Maeda, H. and T. Akaike, 1998, Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer, Biochemistry (Mosc) 63, 854.
- Mandart, E., A. Kay and F. Galibert, 1984, Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences, J Virol 49, 782.
- Mason, W.S., G. Seal and J. Summers, 1980, Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus, J Virol 36, 829.
- McCaul, T.F., K.N. Tsiquaye and A.J. Zuckerman, 1985, Studies by electron microscopy on the assembly of duck hepatitis B virus in the liver, J Med Virol 16, 77.
- Meier, P., C.A. Scougall, H. Will, C.J. Burrell and A.R. Jilbert, 2003, A duck hepatitis B virus strain with a knockout mutation in the putative X ORF shows similar infectivity and in vivo growth characteristics to wild-type virus, Virology 317, 291.
- Melegari, M., S.K. Wolf and R.J. Schneider, 2005, Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression, J Virol 79, 9810.

- Melton, D.A., P.A. Krieg, M.R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn and M.R. Green, 1984, Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter, Nucleic Acids Res 12, 7035.
- Milan, D., J. Griffith, M. Su, E.R. Price and F. McKeon, 1994, The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation, Cell 79, 437.
- Milich, D.R., M.K. Chen, J.L. Hughes and J.E. Jones, 1998, The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence, J Immunol 160, 2013.
- Millward, T.A., S. Zolnierowicz and B.A. Hemmings, 1999, Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A, Trends Biochem Sci 24, 186.
- Miskin, J.E., C.C. Abrams, L.C. Goatley and L.K. Dixon, 1998, A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin, Science 281, 562.
- Moriya, M., K. Fujinaga, M. Yazawa and C. Katagiri, 1995, Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei, Cell Tissue Res 281, 273.
- Muramatsu, T., P.R. Giri, S. Higuchi and R.L. Kincaid, 1992, Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme, Proc Natl Acad Sci U S A 89, 529.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane and J. Sato, 1982, Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium, Cancer Res 42, 3858.
- Nassal, M., 1992, The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly, J Virol 66, 4107.
- Nassal, M. and H. Schaller, 1993, Hepatitis B virus replication, Trends Microbiol 1, 221.
- Oess, S. and E. Hildt, 2000, Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens, Gene Ther 7, 750.
- Offensperger, W.B., S. Offensperger, E. Walter, H.E. Blum and W. Gerok, 1991, Sulfated polyanions do not inhibit duck hepatitis B virus infection, Antimicrob Agents Chemother 35, 2431.
- Okaji, Y., N.H. Tsuno, J. Kitayama, S. Saito, T. Takahashi, K. Kawai, K. Yazawa, M. Asakage, T. Tsuchiya, D. Sakurai, N. Tsuchiya, K. Tokunaga, K. Takahashi and H. Nagawa, 2004, A novel method for isolation of endothelial cells and macrophages from murine tumors based on Ac-LDL uptake and CD16 expression, J Immunol Methods 295, 183.
- Pallas, D.C., L.K. Shahrik, B.L. Martin, S. Jaspers, T.B. Miller, D.L. Brautigan and T.M. Roberts, 1990, Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A, Cell 60, 167.
- Pallen, C.J., K.A. Valentine, J.H. Wang and M.D. Hollenberg, 1985, Calcineurin-mediated dephosphorylation of the human placental membrane receptor for epidermal growth factor urogastrone, Biochemistry 24, 4727.

- Patzer, E.J., G.R. Nakamura, C.C. Simonsen, A.D. Levinson and R. Brands, 1986, Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum, J Virol 58, 884.
- Perlman, D. and J. Hu, 2003, Duck hepatitis B virus virion secretion requires a double-stranded DNA genome, J Virol 77, 2287.
- Perlman, D.H., E.A. Berg, B. O'Connor P, C.E. Costello and J. Hu, 2005, Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids, Proc Natl Acad Sci U S A 102, 9020.
- Perrino, B.A., A.J. Wilson, P. Ellison and L.H. Clapp, 2002, Substrate selectivity and sensitivity to inhibition by FK506 and cyclosporin A of calcineurin heterodimers composed of the alpha or beta catalytic subunit, Eur J Biochem 269, 3540.
- Pikarsky, E., R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun and Y. Ben-Neriah, 2004, NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, Nature 431, 461.
- Pinna, L.A. and A. Donella-Deana, 1994, Phosphorylated synthetic peptides as tools for studying protein phosphatases, Biochim Biophys Acta 1222, 415.
- Politino, M. and M.M. King, 1987, Calcium- and calmodulin-sensitive interactions of calcineurin with phospholipids, J Biol Chem 262, 10109.
- Pugh, J., A. Zweidler and J. Summers, 1989, Characterization of the major duck hepatitis B virus core particle protein, J Virol 63, 1371.
- Pugh, J.C., J.J. Sninsky, J.W. Summers and E. Schaeffer, 1987, Characterization of a pre-S polypeptide on the surfaces of infectious avian hepadnavirus particles, J Virol 61, 1384.
- Pugh, J.C., K. Yaginuma, K. Koike and J. Summers, 1988, Duck hepatitis B virus (DHBV) particles produced by transient expression of DHBV DNA in a human hepatoma cell line are infectious in vitro, J Virol 62, 3513.
- Pumpens, P., E. Grens and M. Nassal, 2002, Molecular epidemiology and immunology of hepatitis B virus infection an update, Intervirology 45, 218.
- Qiao, M., C.A. Scougall, A. Duszynski and C.J. Burrell, 1999, Kinetics of early molecular events in duck hepatitis B virus replication in primary duck hepatocytes, J Gen Virol 80 (Pt 8), 2127.
- Rabe, B., A. Vlachou, N. Pante, A. Helenius and M. Kann, 2003, Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome, Proc Natl Acad Sci U S A 100, 9849.
- Rao, A., C. Luo and P.G. Hogan, 1997, Transcription factors of the NFAT family: regulation and function, Annu Rev Immunol 15, 707.
- Reiter, T.A., R.T. Abraham, M. Choi and F. Rusnak, 1999, Redox regulation of calcineurin in T-lymphocytes, J Biol Inorg Chem 4, 632.
- Rothmann, K., M. Schnolzer, G. Radziwill, E. Hildt, K. Moelling and H. Schaller, 1998, Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling, J Virol 72, 10138.
- Rusnak, F. and P. Mertz, 2000, Calcineurin: form and function, Physiol Rev 80, 1483.
- Saito, T., H. Shima, Y. Osawa, M. Nagao, B.A. Hemmings, T. Kishimoto and S. Hisanaga, 1995, Neurofilament-associated protein phosphatase 2A: its possible role in preserving neurofilaments in filamentous states, Biochemistry 34, 7376.

- Satoh, O., H. Imai, T. Yoneyama, T. Miyamura, H. Utsumi, K. Inoue and M. Umeda, 2000, Membrane structure of the hepatitis B virus surface antigen particle, J Biochem (Tokyo) 127, 543.
- Satoh, O., M. Umeda, H. Imai, H. Tunoo and K. Inoue, 1990, Lipid composition of hepatitis B virus surface antigen particles and the particle-producing human hepatoma cell lines, J Lipid Res 31, 1293.
- Schlicht, H.J., 1991, Biosynthesis of the secretory core protein of duck hepatitis B virus: intracellular transport, proteolytic processing, and membrane expression of the precore protein, J Virol 65, 3489.
- Schlicht, H.J., R. Bartenschlager and H. Schaller, 1989, The duck hepatitis B virus core protein contains a highly phosphorylated C terminus that is essential for replication but not for RNA packaging, J Virol 63, 2995.
- Schlicht, H.J., J. Salfeld and H. Schaller, 1987, The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation, J Virol 61, 3701.
- Schneider, R., D. Fernholz, G. Wildner and H. Will, 1991, Mechanism, kinetics, and role of duck hepatitis B virus e-antigen expression in vivo, Virology 182, 503.
- Schultz, U., E. Grgacic and M. Nassal, 2004, Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection, Adv Virus Res 63, 1.
- Seeger, C., E.H. Leber, L.K. Wiens and J. Hu, 1996, Mutagenesis of a hepatitis B virus reverse transcriptase yields temperature-sensitive virus, Virology 222, 430.
- Sells, M.A., M.L. Chen and G. Acs, 1987, 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, 1005.
- Shibasaki, F., E.R. Price, D. Milan and F. McKeon, 1996, Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4, Nature 382, 370.
- Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G.S. Bloom and M.C. Mumby, 1995, A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle, J Cell Biol 128, 1131.
- Sprengel, R., C. Kuhn, H. Will and H. Schaller, 1985, Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes, J Med Virol 15, 323.
- Sprengel, R., R. Schneider, P.L. Marion, D. Fernholz, G. Wildner and H. Will, 1991, Comparative sequence analysis of defective and infectious avian hepadnaviruses, Nucleic Acids Res 19, 4289.
- Sprengel, R., H.E. Varmus and D. Ganem, 1987, Homologous recombination between hepadnaviral genomes following in vivo DNA transfection: implications for studies of viral infectivity, Virology 159, 454.
- Stanssens, P., C. Opsomer, Y.M. McKeown, W. Kramer, M. Zabeau and H.J. Fritz, 1989, Efficient oligonucleotide-directed construction of mutations in expression vectors by the gapped duplex DNA method using alternating selectable markers, Nucleic Acids Res 17, 4441.
- Stemmer, P.M. and C.B. Klee, 1994, Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B, Biochemistry 33, 6859.
- Stoeckl, L., A. Funk, A. Kopitzki, B. Brandenburg, S. Oess, H. Will, H. Sirma and E. Hildt, 2006, Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses, Proc Natl Acad Sci U S A 103, 6730.
- Strack, S., B.E. Wadzinski and F.F. Ebner, 1996, Localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the hindbrain and spinal cord of the rat, J Comp Neurol 375, 66.

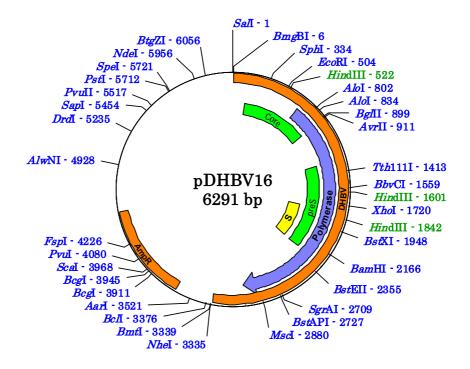
- Su, Q., M. Zhao, E. Weber, H.P. Eugster and B. Ryffel, 1995, Distribution and activity of calcineurin in rat tissues. Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin B, Eur J Biochem 230, 469.
- Summers, J. and W.S. Mason, 1982, Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate, Cell 29, 403.
- Summers, J., P.M. Smith and A.L. Horwich, 1990, Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification, J Virol 64, 2819.
- Summers, J., P.M. Smith, M.J. Huang and M.S. Yu, 1991, Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus, J Virol 65, 1310.
- Swameye, I. and H. Schaller, 1997, Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing pre-S translocation and glycosylation, J Virol 71, 9434.
- Takebe, Y., M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida and N. Arai, 1988, SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat, Mol Cell Biol 8, 466.
- Tang, H., L. Delgermaa, F. Huang, N. Oishi, L. Liu, F. He, L. Zhao and S. Murakami, 2005, The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication, J Virol 79, 5548.
- Thermet, A., M. Robaczewska, C. Rollier, O. Hantz, C. Trepo, G. Deleage and L. Cova, 2004, Identification of antigenic regions of duck hepatitis B virus core protein with antibodies elicited by DNA immunization and chronic infection, J Virol 78, 1945.
- Tumlin, J.A., 1997, Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport, Am J Kidney Dis 30, 884.
- Tung, H.Y., H. De Rocquigny, L.J. Zhao, X. Cayla, B.P. Roques and R. Ozon, 1997, Direct activation of protein phosphatase-2A0 by HIV-1 encoded protein complex NCp7:vpr, FEBS Lett 401, 197.
- Turowski, P., A. Fernandez, B. Favre, N.J. Lamb and B.A. Hemmings, 1995, Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression, J Cell Biol 129, 397.
- Tuttleman, J.S., C. Pourcel and J. Summers, 1986, Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells, Cell 47, 451.
- Tytell, M., 2005, Release of heat shock proteins (Hsps) and the effects of extracellular Hsps on neural cells and tissues, Int J Hyperthermia 21, 445.
- Urban, M.K., A.P. O'Connell and W.T. London, 1985, Sequence of events in natural infection of Pekin duck embryos with duck hepatitis B virus, J Virol 55, 16.
- Urban, S., K.M. Breiner, F. Fehler, U. Klingmuller and H. Schaller, 1998, Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180, J Virol 72, 8089.
- Urban, S., C. Schwarz, U.C. Marx, H. Zentgraf, H. Schaller and G. Multhaup, 2000, Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction, Embo J 19, 1217.
- Virshup, D.M., 2000, Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes, Curr Opin Cell Biol 12, 180.

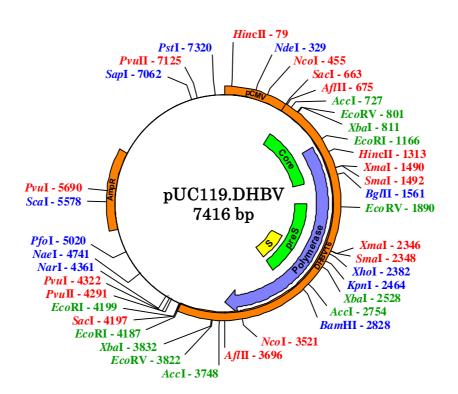
- von Weizsacker, F., S. Wieland and H.E. Blum, 1995, Identification of two separable modules in the duck hepatitis B virus core protein, J Virol 69, 2704.
- Wadzinski, B.E., B.J. Eisfelder, L.F. Peruski, Jr., M.C. Mumby and G.L. Johnson, 1992, NH2-terminal modification of the phosphatase 2A catalytic subunit allows functional expression in mammalian cells, J Biol Chem 267, 16883.
- Walter, E., K. Teubner, H.E. Blum, W.B. Offensperger, S. Offensperger and W. Gerok, 1991, Duck hepatitis B virus infection of non-hepatocytes, Liver 11, 53.
- Webster, C.R., C. Blanch and M.S. Anwer, 2002, Role of PP2B in cAMP-induced dephosphorylation and translocation of NTCP, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283, G44.
- Wei, Y., J.E. Tavis and D. Ganem, 1996, Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses, J Virol 70, 6455.
- Wu, J., H.Y. Xie, G.P. Jiang, X. Xu and S.S. Zheng, 2003, The effect of mycophenolate acid on hepatitis B virus replication in vitro, Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2, 410.
- Xia, W.L., Y. Shen and S.S. Zheng, 2005, Inhibitory effect of cyclosporine A on hepatitis B virus replication in vitro and its possible mechanisms, Hepatobiliary Pancreat Dis Int 4, 18.
- Yakel, J.L., 1997, Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription, Trends Pharmacol Sci 18, 124.
- Yang, W., J. Guo, Z. Ying, S. Hua, W. Dong and H. Chen, 1994, Capsid assembly and involved function analysis of twelve core protein mutants of duck hepatitis B virus, J Virol 68, 338.
- Yu, M. and J. Summers, 1994a, Multiple functions of capsid protein phosphorylation in duck hepatitis B virus replication, J Virol 68, 4341.
- Yu, M. and J. Summers, 1994b, Phosphorylation of the duck hepatitis B virus capsid protein associated with conformational changes in the C terminus, J Virol 68, 2965.
- Zhang, Y.Y. and J. Summers, 1999, Enrichment of a precore-minus mutant of duck hepatitis B virus in experimental mixed infections, J Virol 73, 3616.

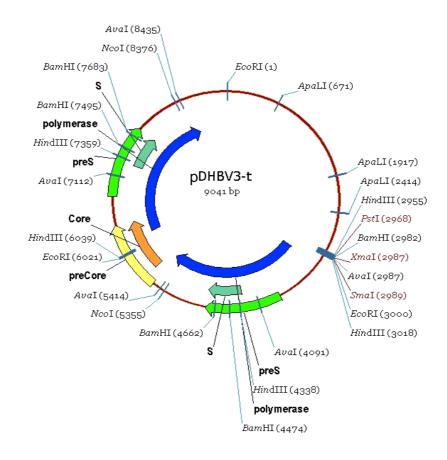
7 Anhang

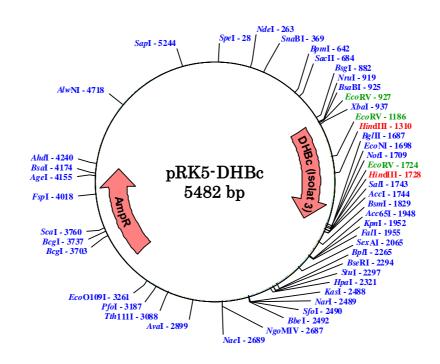
7.1 Plasmide

7.1.1 DHBV-Expressionsplasmide



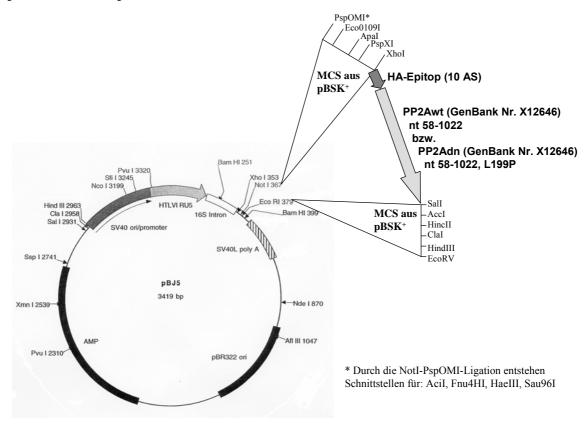




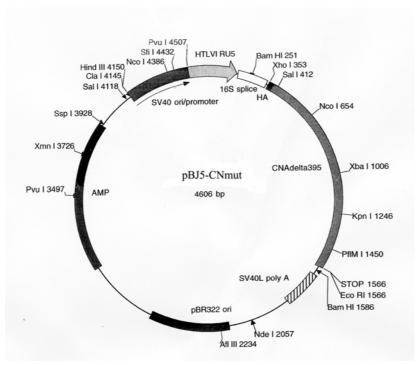


7.1.2 Plasmide für die Expression der Phosphatasen

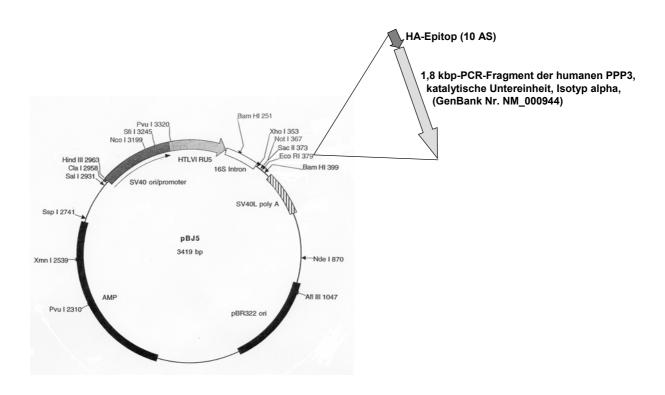
pBJ5-PP2Awt und pBJ5-PP2Adn:



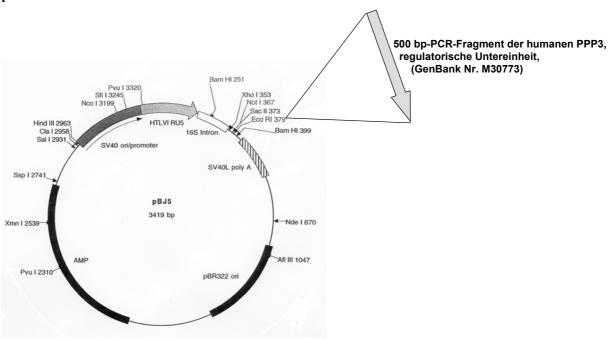
pBJ5-CNmut:



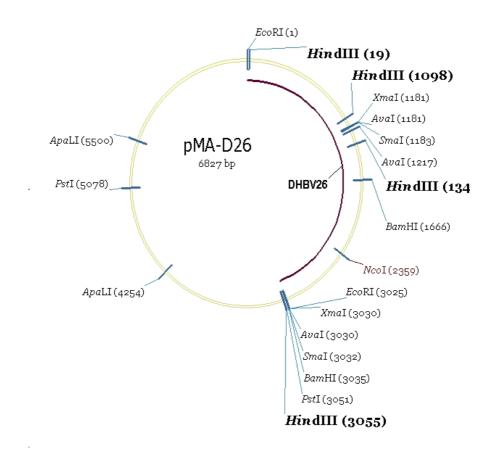
pBJ5-CNA:



pBJ5-CNB:



7.1.3 Plasmid für die Herstellung der DHBV-Sonde



183

7.2 Sequenz-Vergleich hepadnaviraler Kapsidproteine

Alignment der Präcore- und Core-Proteinsequenzen verschiedener Vogelhepadnaviren:

	gil[3] gil[4530352 gil4636572 gil40786833 gil7932895 Consensus		gil[3] gil[4530352 gil48696572 gil40786833 gil7932895 Consensus		gil[13] gil[16] gil4530352 gil48696572 gil40786833 gil9626720 gil17932895 Consensus
₩-	A HE	131		261	
10	TTPLSFGR TTPLSFGR TTPLSFGR TTPLSFGR TTPLSFGR TTPSFFGR TTPSFFGR	140	HOGGETP HEGGETP HEGGETP HEGGETP HEGGETP HASCHETP HASCHETP HASCHETP	270	TVYGRRS TVYYGRRS TVYYGRRS TVYYGRRS TVYYGRRS TVYYGRRS TVYYGRRS
20	HAIR RITPLSFGARCGGIFTSTLLLSCV HAIR RITPLSFGARCGGIFTSTLLLSCV HAIR RITPLSFGARCGGIFTSTLLLSCL HAIR RITPLSFGARCGGIFTSTLLLFV HOLR LHPSPFGARCGGIFTSSLLLFV HAS RLHPSPFGARCGGIFTSSLLFV HAS RLHPSPFGARCGGIFTSTSLLFV	150	SYLIQHDEREETPLGOLFKHQEERIYSE SYLIQHDEREETPLGOLFKHQEERIYSE SYLIQHDEREETPLGOLFKHQEERIYSE SYLIQHEEREETPLGOLFKHQEERIYSE SFLIQHEEREETPLGOLFKHQEERIYSE SFLITHSEREETPLNOLFYNGEERIYNE SYLISHNERQELPLNOLFYNGEERIYNE	280	KVTTVVTGRRSKSRERRAPTDQRGGS KVKTTVVTGRRSKSRERRAPTPQRAGS KVKTTVVTGRRSKSRDRRAPSPQRAGSI KVKTTVVTGRRSKSRDRRAPSPQRAGSI KVKTTVVTGRRSKSRERRAPTPQRAGSI KVKTTVVTGRRSKSRGRRSSPSQRAGSI KVKTTVVTGRRSKSRGRRSSPSQRAGSI KVKTTVVTGRRSKSRGRRSSPSQRAGSI
30	TLLSCYTV TLLSCYTV TLLSCYTV TLLSCTYV TLLFFYTV SLLLFFYTV SLLFFYTV SLLFFYTV TSLLFFYTV TSLLFFYTV TSLLFFYTV		ERIVSTQP ERIVSTQP ERIVSTQP ERIVSTQP ERIVNTQP ERIVNTQP ERIVNTQP	290	TPQRAGSPL SPQRAGSPL SPQRAGSPL PQRAGSPL PQRAGSPL SQRAGSPL SQRAGSPL PQRAGSPL
	TYPLYCTTYYDSCLYNDINASRALANYOLPODFFPKIDOLYROAKOALEPYNRSDSIKKHYLIATHFYOLIEDFHQTTQGMHEIAFALRAYIPPTTTPYPORTY TYPLYCTTYYDSCLYNDINASRALANYOLPODFFPKIDOLYROAKOALEPYNRSDSIKKHYLIATHFYOLIEDFHQTTQGMHEIAFALRAYIPPTTTPYPORTY TYPLYCTTYYDTCLYNDYNASRALANYOLPODFFPKIEDLYROAKOALEPYNRSDSIKKHYLIATHFYOLIEDFHQTTQGMHEIAFALRAYIPPTTAPPPTTYPYPORTTYYDY CHANYOLPODFFPKIDOLYROAKOALEPYNRSESIKKHYLIATHFYOLIEDFHQTTQGMHEIAFALRAYIPPTTTPYPPPTTYPYPOSCLCHOINASRALANYOLPODFFPKIDOLYROAKOALEPYNROSIKKHYLIATHFYOLIEDFHQTTQGMHEIAFALRAYIPPTTTPYPPPTTYPYPOSCLYNDYNASRALANYOLPODFFPQTODLYROAKOALEPYNRAFTIKKHYLIATHFYOLIEDFHQTTQGMSQTAAALRAYIPPTTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPOLIEDFHQTTQGMSQTAARAYIPPTTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPOLIEDFHQTTQGMSQTAARAYIPPTTTYPYPDTTYPYPOLIEDFHQTTQGMSQTAARAYIPPTTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPOLIEDFHQTTQGMSTAARAYIPPTTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPDTTYPYPDTTYPPTTYPPTTYPYPDTTYPYPDTTYPPTTYPYPDTTYPPTTYPPTTYPPTTYPTTY	170	QPOYPITARIHAHLKAYAKINEESLOBARRILLUHHYNCLLUGEANYTNYISRLRIHLSTPERYRGROAPTIEALITRYIQYAQGGRKTTSGTRKPRGLEPRRR QPOYPITARIHAHLKAYAKINEESLOBARRILLUHHYNCLLUGEAQYTNYISRLRIHLSTPEKYRGROAPTIEALITRYIQYAQGGRKTSTATRKPRGLEPRRR QPOYPITARIHAHLKAYAKINEESLOBARRILUHHYNCLLUGEANYTNYISRLRIHLSTPEKYRGROAPTIEALITRYIQYAQGGRKTSTATRKPRGLQPRRR QPOYPITARIHAHLKAYAKINEESLOBARRILUHHYNCLLUGEANYTNYISRLRIHLSTPRYRGROAPTIEALITRYIQYAQGGRWITTGTRKPRGLEPRRR QPOYPITARIHAHLKAYAKINEESLOBARRILUHHYNCLLUGEAQYTNYISRLRIHLSTPEKYRGROAPTIEALITRYIQYAQGGRWITTGTRKPRGLEPRRR QPOYPITARIHAHLRYYTKLNEGALOKARRILUHHYNCLLUGESNYTNYISRLRIHLSTPEKYRGKOAPTIEALIRPIQYAQGGRWOTKGVRRGLEPRRR QPOYPITARIHAHLKAYAKLNEGALOKARRILUHHYNCLLUGESNYTNYISRLRIHLSTPEKYRGKOAPTIEALIRPIQYAQGGRNOTKGVRRGLEPRRR QPOYPITARIHAHLKAYAKLNEGALOKARRILUHHYNCLLUGESNYTNYISRLRIHLSTPEKYRGKOAPTIEALIRPIQYAQGGRNOTKGVRRGLEPRRR		VKTTVVYGRRESKSRERRPTPQRAGSPLPRSSSSHIRSPSPRK (VKTTVYYGRRESKSRERRAPTPQRAGSPLPRSSSSHIRSPSPRK (VKTTVYYGRRESKSRERRASSPQRAGSPLPRSSSSHIRSPSPRK (VKTTVYYGRRESKSRERRAPTPQRAGSPLPRSTSHIRSPSPRK (VKTTVYYGRRESKSRERRAPTPQRAGSPLPRSSSSHIRSPSPRK (VKTTVYYGRRESKSRGRRSSPSQRAGSPLPRNKGNQTRSPSPRE (VKTTVYYGRRESKSRGRRSSPSQRAGSPLPRNKENQSRSSSPRE (VKTTVYYGRRESKSRSRSSPSQRAGSPLPRNKENQSRSSSPRE
	CLYNDINGSRA CLYNDVNASRA CLYNDVNASRA CLCHDINGSRA CLYNDVNASRA CLYNDVNASRA CLYNDVNASRA CLYNDVNASRA	180	HLKRYRKI HLKRYRKI HLKRYRKI HLKRYRKI HLKRYTKL HLKYTKL HLKYTKL	305	PSPR PSPR PSPR PSPR PSPR SSPR SSPR
50	SRALANVYI SRALANVYI SRALANVYI SRALANVYI SRALANVYI	œ.	TESLORA TESLORA TESLORA TESLORA TEGALORA EGALORA EGALORA ESLORA		
	0.000FPR 0.000FPR 0.000FPR 0.000FPR 0.000FPR 0.000FPR	190	RELLUHYN RELLUHYN RELUHYN RELUHYN RELUHYN RELUHYN		
92.	KIDDL VRORK KIEDL VRORK KIDDL VRORK KIDDL VRORK KIDDL VRORK KIDDL VRORK KI #DL VRORK	200	LLKGERNY LLKGERTY LLKGERTY LLKGERNY LLKGERTY LLKGERTY LLKGESNY		
8.	ORLEPYR ORLEPYR ORLEPYR ORLEPYR ORLEPYR ORLEPYR ORLEPYR		THYTSELR THYTSELR THYTSELR THYTSELR THYTSELR THYTSELR		
96	SDSIKKHYL SDSIKKHYL SESIKKHYL SESIKKHYL NDSIKKHYL RETIKKHYL RETIKKHYL RETIKKHYL		THESTPER THESTPER THESTPER THESTPER THESTPER THESTPER		
	INTHEVOL INTHEVOL INTHEVOL INTHEVOL INTHEVOL INTHEVOL	230	TALSTPERYKGROAPTIEATIRPIQYAGGKKTISGTKKPRGLEPRRI TALSTPEKYRGROAPTIEATIRPIQYAGGGKKTISTATKKPRGLEPRRI TALSTPEKYRGROAPTIEATIRPIQYAGGGRNKTQGSRKPRGLQPRRI TALSTPEKYRGROAPTIEATIRPIQYAGGGRNKTGGSRKPRGLQPRRI TALSTPEKYRGROAPTIEATIRPIQYAGGGRKTTGTRKPRGLEPRRI TALSTPEKYRGROAPTIEATIRPIQYAGGSRNQTKGYRKRRGLEPRRI TALSTPEKYRGROAPTIEATIRPIQYAGGSRNQTKGYRKRGLEPRRI TALSTPEKYRGROAPTIEATIRPIQYAGGSRNQTKGYRKRRGLEPRRI		
0	THE VOL LEDFINQTT GGMET THE VOL LEDFINQT GGMET THE VOL LEDFINQT GGMET THE VOL LEDFINGT GGMET GGMET THE VOL LEDFINGT GGMET THE VOL LEDFINGT GGMET GGMET THE VOL LEDFINGT GGMET GG		ENTERPLO ENTERPLO ENTERPLO ENTERPLO ENTERPLO ENTERPLO ENTERPLO		
	CONTERES CONTERES CONTERES CONTERES CONTERES CONTERES CONTERES CONTERES	240	AQGGRKTT AQGGRKTT AQGGRKTS AQGGRNKT AQGGRNKT AQGGRNQT AQGGRNQT		
120	REALRAYIPPTT RESLERVIPPTT REALRAVIPPTT REALRAVIPPTT ROALRAVIPPTT RAIRRAVIPPTT	250	SGTRPRGG TGTRPRGG TGTRPRGG TGTRPRGG KGTRPRGG KGVRPRGG		
130	TPVP0	560	# EPRRR EPRR # BRRR EPRR # BRRR EPRRR EPRRR EPRRR EPRRR EPRRR EPRRR EPRR EPR		

```
gi | 3 DHBV3
gi | 16 DHBV16
gi | 4530352 RgHBV
gi | 4869572 SgHBV
gi | 40786833 ShgHBV
gi | 9626720 HHBV
gi | 17932895 StHBV
```

D = duck (Ente)
Rg = Ross's Goose (Zwergschneegans)
Sg = Snow Goose (Schneegans)
Shg= Sheldgoose (Andengans)
H = Heron (Graureiher)
St= Stork (Storch)
HBV = Hepatitis B-Virus

7.3 Abkürzungsverzeichnis

% Prozent
°C Grad Celcius
μg Mikrogramm
μJ Mikrojoule
μl Mikroliter
μm Mikrometer
2D zweidimensional

APS Ammoniumperoxodisulfat

AS Aminosäure

BSA engl.: bovine serum albumin/ Rinderserumalbumin

bzw. beziehungsweise

ca. circa

Cant Cantharidinsäure

CIP engl.: calf intestine phosphatase / alkalische Phosphatase

cm Zentimeter
CN Calcineurin
CsA Cyclosporin A
CypA Cyclophilin A

dCTP Desoxy-Cytidinphosphat ddH₂O doppelt destilliertes Wasser

DHBC Kapsidprotein des Entenhepatitis B Virus
DHBL großes Hüllprotein des Entenhepatitis B Virus
DMEM Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium

DNA Desoxyribonukleinsäure DNase Desoxyribonuklease

dNTPs Desoxyribonukleotidtriphosphate

DTT Dithiothreitol eAg e-Antigen

ECL engl.: enhanced chemoluminescence/ verstärke Chemolumineszenz

EDTA Ethylendiamintetraacetat

ELISA engl.: enzyme-linked immunosorbent assay/ enzymgekoppelter Immunnachweis

ER Endoplasmatisches Retikulum

FCS fötales Kälberserum g Erdbeschleunigung

g Gramm

GAPDH Glycerinaldehyd-Dehydrogenase

GFP engl.: green fluorescent protein/ grün fluoreszierendes Protein

 $\begin{array}{ll} h & Stunde/n \\ H_2O & Wasser \end{array}$

HA Hämagglutinin HE Hämatoxilin-Eosin

HIV Engl.: human immunodeficiency virus/ menschliches Immundefizienz-Virus

HPI Heinrich-Pette-Institut

HRPO engl.: horse radish peroxidase / Meerrettichperoxidase

IC₅₀ Konzentration eines Inhibitors, die 50% einer Enzymaktivität *in vitro* hemmt

IEF isoelektrische Fokussierung IP Immunpräzipitation

IPTG Isopropylthio-β-galactosid

kD Kilodalton kg Kilogramm

KLH engl.: keyhole limpet hemocyanin/ Protein aus der Hämolymphe der

Schlüssellochschnecke, 8-32 Millionen Dalton

Anhang

1 Liter

LB Luria Bertoni Broth Medium

LDL engl: low density lipoprotein/Lipoprotein geringer Dichte

LSEC engl.: liver sinusoidal endothelial cell/ Endothelzelle der Lebersinusoide

M molar
mA Milliampere
mCi Millicurie
mg Milligramm
min Minute/n
ml Milliliter
mM millimolar

MW Molekulargewicht

NEB Firma: New England Biolabs

NFAT engl.: nuclear factor of activated T cells/ Zellkernprotein aktivierter T-Zellen

NS Normalserum
OA Okadainsäure
OD optische Dichte

OPD O-Phenylendiamindihydrochlorid

P Prolin

PAA Polyacrylamid

PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese

PanZ Pansorbin-Zellen

PBS engl.: phosphate buffered saline / Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PDH engl.: primary duck hepatocytes / Primäre Entenhepatozyten PDLCs engl.: primary duck liver cells/ primäre Entenleberzellen

pH potentia Hydrogenii PI Proteasominhibitoren

PMA engl.: phorbol myristyl acetate

PP Proteinphosphatase
PVDF Polyvinylidenfluorid
RNA Ribonukleinsäure
RNase Ribonuklease

rpm engl.: revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute

RT reverse Transkription

S Serin

SDS engl.: sodium dodecyl sulfate

sek Sekunde/n SVP subviraler Partikel

T Threonin

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U engl.: unit/s - Einheit/en

Ü Überstand

UKE Universitätsklinikum Eppendorf

 $\begin{array}{ccc} UV & & ultraviolett \\ V & & Volt \\ Vol & & Volumen \\ WE & & Williams E \\ x & & mal \end{array}$

z.B. zum Beispiel z.T. zum Teil

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Hans Will für die Überlassung des Themas, die fortwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft und die produktiven Diskussionen während der gesamten Promotionszeit bedanken.

Herrn Professor Dr. H.-P. Mühlbach möchte ich danken, dass er sich sofort bereit gefunden hat, ein Gutachten zu meiner extern angefertigten Arbeit zu erstellen.

Herrn Dr. Bruns danke ich für die gute Zusammenarbeit, die ständige Bereitschaft zum wissenschaftlichen Austausch und die vielen Denkanstöße.

Für die Synthese der phospho-Peptidsequenzen und die widerstandslose Bereitschaft zur Durchführung unzähliger 2-D-Gelelektrophoresen möchte ich Herrn Dr. Jochen Heukeshofen danken. Herrn Dr. Peter Henklein gilt mein Dank für die schnelle Synthese der Nicht-Phosphopeptidsequenzen, nachdem das Schicksal die Peptidsynthese am HPI ganz plötzlich zum Erliegen brachte. Kerstin Reumann danke ich für die Unterstützung bei den ELISAs. Für die Hilfe bei der c-DNA-Synthese danke ich Herrn Dr. Cagatay Günes.

Herrn Dr. G. Crabtree möchte ich für die Bereitstellung der Plasmide zur Expression von Calcineurin danken, Herrn Professor Dr. Dr. E. Serfling danke ich für die NFAT-Expressionskonstrukte und Herrn Dr. B. Hemmings für die Bereitstellung der Plasmide für die PP2A-Expression.

Bei Anneli Saga, Britta van Veen, bei Johanna Schütz und Christine Kranig möchte ich mich für die freundschaftliche und problemlose Hand-in-Hand-Arbeit im Labor bedanken. Wir haben viel mit- und voneinander lernen können.

Bei allen anderen Mitarbeitern des HPI und vor allem der Abteilung "Allgemeine Virologie" bedanke ich mich für die nette Atmosphäre und konkurrenzfreie Kooperation in der Forschung. Für die kritische Durchsicht des Manuskripts danke ich Dr. Anneke Funk und Dr. Hüseyin Sirma.

Und mein ganz besonderer Dank gilt der Unterstützung durch meine Familie, darunter Oleg Mänz für selbstlose Chauffeurdienste, sein uneingeschränktes Vertrauen und nicht zuletzt für das "Zuhause".