

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Berit Erbes
aus Rüsselsheim

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Analyse der
L-Protein-vermittelten Superinfektionsresistenz
bei der
DHBV-Infektion

Gutachter: Prof. Dr. Stephan Urban
Prof. Dr. Ursula Klingmüller

für Nora und Kurt

Inhaltsverzeichnis	
Zusammenfassung	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis B Virus	1
1.1.1 Klassifizierung der Hepadnaviren	2
1.1.2 Morphologie viraler Partikeltypen	4
1.1.3 Genomorganisation und Genprodukte	6
1.1.4 Virale Hüllproteine und ihre Topologie	10
1.1.5 Der hepadnavirale Lebenszyklus	13
1.1.6 Die experimentelle HBV-Infektion	15
1.2 DHBV als Modellsystem	18
1.2.1 Das DHBV-Infektionssystem	18
1.2.2 Frühe Schritte im Replikationszyklus von DHBV	19
1.2.3 Ausschluss einer Superinfektion im Infektionszyklus von DHBV	23
1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	24
2 Ergebnisse	25
2.1 Klonierung, Nachweis und kinetische Analyse zur heterologen L-Expression	25
2.1.1 Klonierung und Expressionsnachweis von Ad-DuL	25
2.1.2 Analyse zur Kinetik der L-Expression in Hepatozyten	28
2.2 Quantitative Studie zum Einfluss von L auf die Infektionseffizienz von DHBV	30
2.2.1 Versuchsaufbau und Quantifizierung der Infektionskontrollen	30
2.2.2 Infizierbarkeit von Ad-GFP-transduzierten Zellkulturen	34
2.2.3 Infizierbarkeit von Ad-DuL-transduzierten Zellkulturen	36
2.3 Quantifizierung des Einflusses der L-Expression auf eine Superinfektion	38
2.3.1 Etablierung einer Methode zur Quantifizierung des L-vermittelten Infektionsausschluss	38
2.3.2 Quantitative Analyse der Akzeptanz L-exprimierender Hepatozyten für eine Superinfektion	41
2.3.3 Untersuchung zur zeitlichen Korrelation von L-Expression und Infektionsausschluss.	46
2.4 Analyse des Einflusses von L auf die initiale Interaktion von DHBV mit seiner Wirtszelle	48

2.4.1	<i>Etablierung einer real-time PCR-Methode zur Quantifizierung der viralen Zellassoziation</i>	48
2.4.2	<i>Kompetitionsstudie zur Wirkungsweise von Suramin</i>	53
2.4.3	<i>Quantifizierung des Einflusses der L-Expression auf die Zellassoziation von DHBV</i>	56
2.5	<i>Analyse potentieller SIR-Determinanten im L-Protein</i>	58
2.5.1	<i>Analyse des Einflusses von DHBV S auf den Superinfektionsausschluss</i>	58
2.5.2	<i>Mutationsanalyse zur Identifizierung von SIR-Determinanten in pre-S</i>	60
3	Diskussion	94
3.1	<i>Quantitative Evaluierung der L-vermittelten SIR</i>	96
3.2	<i>Quantifizierung der Zellbindung an L-exprimierende Hepatozyten</i>	100
3.2.1	<i>Quantifizierungsmethode und Kompetitionsstudie mit Suramin</i>	102
3.2.2	<i>Die SIR findet erst nach Aufnahme des superinfizierenden Virus in die Zelle statt</i>	111
3.3	<i>Mutationsanalyse zur Identifizierung von SIR-Determinanten in L</i>	113
3.3.1	<i>Die SIR funktioniert speziesspezifisch und kann weder von DHBV S noch von pre-S alleine vermittelt werden</i>	113
3.3.2	<i>Die duCPD/pre-S-Interaktion spielt für den SIR-Mechanismus keine Rolle</i>	117
3.3.3	<i>L muss weder myristoyliert oder phosphoryliert, noch proteolytisch geschnitten werden, um eine SIR zu vermitteln</i>	119
3.3.4	<i>N-teminal verkürztes L ist nicht in der Lage eine effiziente SIR zu vermitteln</i>	121
3.3.5	<i>Die SIR-Determinante kolokalisiert mit der Matrixdomäne in pre-S</i>	122
4	Material und Methoden	128
4.1	<i>Material</i>	128
4.1.1	<i>Puffer und Lösungen</i>	128
4.1.2	<i>Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien</i>	131
4.1.3	<i>Bakterienstämme</i>	131
4.1.4	<i>Antikörper</i>	132
4.1.5	<i>Enzyme</i>	133
4.1.6	<i>Kits</i>	133
4.2	<i>Methoden</i>	134
4.2.1	<i>Zellkultur</i>	134
4.2.2	<i>Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien</i>	138
4.2.3	<i>Topologische Analyse von pre-S in DuL und in der Chimäre Dupre-S/HuS</i>	138

4.2.4	<i>Klonierung adenoviraler Konstrukte und Herstellung rekombinanter Adenoviren</i>	140
4.3	Analysen und Nachweisverfahren	147
4.3.1	<i>Quantitativer Nachweis viraler DNA im DNA-Dotblot</i>	147
4.3.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	148
4.3.3	<i>Quantifizierung der Virsubindung an Zellen mittels qRT-PCR</i>	149
4.3.4	<i>Sequenzierung von Plasmid-DNA</i>	152
4.4	Proteinbiochemische Methoden	153
4.4.1	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970²⁷⁴)</i>	153
4.4.2	<i>Western Blot Analyse</i>	153
4.5	Immunfluoreszenzanalyse	154
5	Anhang	156
5.1	Statistik zu den Titrationsstudien aus Abschnitt 2.2	156
5.1.1	<i>Regressionsanalyse zu den Infektionskontrollen aus Titrationsanalyse 1</i>	156
5.1.2	<i>Regressionsanalysen zur Abhängigkeit der Infektionseffizienz von der Rate Ad-GFP- und Ad-DuL-transduzierter Zellen</i>	160
5.2	Abbildungsverzeichnis	166
5.3	Tabellenverzeichnis	166
6	Literaturverzeichnis	168

Publikationen

Danksagung

Zusammenfassung

Superinfektionsresistenz (SIR) bezeichnet das Phänomen, dass eine bereits infizierte Zelle gegenüber einer weiteren Infektion durch ein homologes Virus resistent ist. Dieser Pathogenvermittelte Zustand ist für zahlreiche Viren beschrieben, die zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei ebenso vielseitig, oft wird der zelluläre Rezeptor herabreguliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Phänomen für die hepadnavirale Infektion am Tiermodell des Enten Hepatitis B Virus (DHBV) untersucht. Ziel war es 1) die SIR quantitativ zu evaluieren und 2) den zugrunde liegenden SIR-Mechanismus näher zu charakterisieren. Da diese zelluläre Resistenz bei DHBV bekanntermaßen allein durch die Expression des großen Hüllproteins (L) induziert wird, galt es verantwortliche Determinanten in L zu identifizieren.

Bevor L hierfür einer umfangreichen Mutationsanalyse unterzogen wurde, wurde quantitativ der Einfluss der heterologen L-Proteinexpression auf die Infektionseffizienz von DHBV untersucht. Um eine valide Quantifizierung zu gewährleisten, wurde eine fundierte Auszähl- und Kalkulationstechnik auf Einzelzellebene etabliert. Diese ermöglichte es, Messdaten von Hepatozyten aus unterschiedlichen Leberzellpräparationen sowie die SIR-Phänotypen von Wildtyp L und L-Mutanten vergleichbar zu machen. Die Infizierbarkeit L-exprimierender Zellen stellte sich im Resultat eindeutig als ein von der L-Konzentration abhängiges, aber von der DHBV-Menge im Inokulum unabhängiges Phänomen dar. Selbst bei hoher DHBV-Konzentration waren L-exprimierende Zellen noch in der Lage eine Superinfektion effektiv auszuschließen.

Mit dem Ziel die SIR-Kompetenz von L einem definierten Sequenzabschnitt im Hüllprotein zuzuordnen, wurden L-Mutanten generiert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, eine DHBV-Superinfektion von Hepatozyten verhindern zu können. Hierbei zeigte sich, dass weder die Modifizierung von L durch i) Myristoylierung oder Phosphorylierung, noch ii) seine proteolytische Prozessierung oder iii) seine Interaktion mit dem DHBV-Rezeptor Carboxypeptidase D in den SIR-Mechanismus involviert sind. Dass der etablierten Resistenz im Zuge einer DHBV-Infektion ein unmittelbar hemmender Effekt von L auf den viralen Rezeptor zugrunde liegt, ist somit ausgeschlossen.

Im Gegensatz dazu resultierte aus Deletionen im Sequenzbereich zwischen den Resten 118-149 in der pre-S Subdomäne eine signifikante und drastische Beeinträchtigung von L eine Superinfektion verhindern zu können. Dem Sequenzabschnitt konnte eindeutig die Funktion zugeordnet werden, die L-vermittelte SIR zu verantworten. Die so identifizierte SIR-Determinante überlappt mit der Kapsidbinderegion in pre-S, die während der Partikelmorphogenese mit dem viralen Kapsid in Kontakt tritt. Da eine Bindeanalyse des Weiteren offenbarten, dass die Infektionsblockade erst nach der Aufnahme des superinfizierenden Virus in die Zelle zum Tragen kommt, geht das entwickelte Modell zum SIR-Mechanismus davon aus, dass Virus aus einer Zweitinfektion zwar noch ungehindert an Zellen bindet und in diese aufgenommen wird, die ins Zytosol freigesetzten Kapside superinfizierender Viren werden aber sofort durch L-Moleküle aus der Initialinfektion abgefangen, erneut umhüllt und –möglicherweise sogar als infektiöse Partikel- wieder aus der Zelle geschleust.

Abstract

Superinfection resistance (SIR) is a phenomenon whereby a cell infected with a virus is resistant to an additional infection by a homologous virus. This pathogen-mediated status is observed during infections by a broad range of viruses. The underlying mechanisms are multifarious; often a downregulation of the viral receptor is involved. In this study the SIR-phenomenon was investigated for the hepadnaviral infection using the duck hepatitis B virus (DHBV) animal model. One aim of the study was to quantitatively evaluate the SIR of already infected hepatocytes. In fact it is known that the SIR in DHBV infection is exclusively induced by the large envelope protein (L). However the exact region of L mediating this property has not yet been determined. To address this question an extensive mutational analysis was performed to identify responsible SIR-determinants within L to gain insights into the underlying SIR-mechanism.

In a first approach, the influence of heterologous L-protein expression on the efficiency of DHBV infection was quantitatively analysed. To this end, a quantification assay based on substantiated enumeration- and calculation-techniques on a single cell level was established. This method allowed a comparison of data derived from cells of different liver cell preparations on one hand and of SIR-phenotypes mediated either by wildtype L or mutant L on the other hand. The results of the quantitative analysis demonstrated that the susceptibility of L-expressing hepatocytes was explicitly L-dose dependent in efficiently preventing superinfection but independent of the virus concentration in the inoculum.

To further characterise the underlying SIR-mechanism, mutant L-protein was cloned and analysed for its competence to prevent superinfection of hepatocytes. The data showed that the exclusion does neither depend on i) modification of L by myristoylation or phosphorylation, nor on ii) a proteolytic processing of L. Furthermore, it was shown that iii) the interaction of L with the DHBV receptor carboxypeptidase D is dispensable for the SIR, despite being uncontroversially essential for the infection process *per se*. On the basis of these findings, receptor downmodulation as the underlying SIR-mechanism for DHBV is definitely excluded.

In contrast, deletions of the residues 118-149 within in the pre-S subdomain of L resulted in a significant and drastic loss of L-function in mediating SIR indicating that this region harbors the SIR-determinant. Based on the fact that the SIR-determinant overlaps with the capsid binding region of L and due to the results of a binding study which showed that the superinfecting virus is blocked at a step downstream of uptake, the following model was developed: the superinfecting virus particle binds to hepatocytes and even enters the host cell; however its capsid, which is released into the cytosol, is directly caught by L (derived from the initially infecting virus), is enveloped once more and is subsequently secreted - possibly even as an infectious particle.

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis B Virus

Hepatitis B Viren werden in der Familie *Hepadnaviridae* zusammengefasst, wobei das humane Hepatitis B Virus (HBV) als Prototyp dieser Gruppe zu nennen ist. Zum einen umschreibt diese Bezeichnung die Entzündung der Leber (griechisch = *hepatitis*) als eine charakteristische Folge einer HBV-Infektion. Zum anderen benennt sie die Desoxyribonukleinsäure als Träger der genetischen Information dieser Virus-Familie. Neben einem ausgeprägten Lebertropismus zeichnen sich Vertreter dieser Gruppe kleiner, umhüllter DNA-Viren durch eine hohe Wirtsspezifität aus. Die Eigenschaft, ihr Genom über einen reversen Transkriptionsschritt zu replizieren, weist die evolutionäre Verwandtschaft zur Familie der Retroviren auf. Im Gegensatz zu Retroviren enthalten extrazelluläre HBV-Partikel DNA statt RNA und eine Integration der viralen DNA in das zelluläre Genom ist kein obligatorischer Schritt im Infektionszyklus von HBV.

Das humane Hepatitis B Virus zählt zu den weltweit am weitesten verbreiteten Pathogenen. Generell kann eine HBV-Infektion einen transienten oder chronischen Verlauf nehmen. Bei mehr als 2 Milliarden Menschen lassen sich Zeichen einer durchlaufenen HBV-Infektion finden. Davon sind 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert und erkranken demnach mit einem signifikant erhöhten Risiko an Leberzirrhose oder einem hepatozellulären Karzinom (HCC, *hepatocellular carcinoma*)^{1,2,3,4}. Die Leberschädigung entsteht hierbei nicht durch das Virus selbst - HBV ist nicht zytopathisch - sondern durch die virusinduzierte Immunantwort des Wirtes⁵. Trotz der Möglichkeit einer effizienten aktiven Immunisierung mit rekombinant in Hefekulturen hergestellten HBV-Hüllproteinen (HBsAg) seit Anfang der 1980er Jahre, steigt die Zahl chronisch infizierter Patienten jährlich an⁶. Die perinatale Übertragung einer HBV-Infektion, die in mindestens 90 % der Fälle einen persistierenden Verlauf nimmt, spiegelt die Problematik wider^{7,8,9,10}. Neben der vertikalen Übertragung, von der Mutter auf das Kind, kann eine Übertragung horizontal, primär durch Kontakt mit Blut, Blutprodukten oder durch Sexualverkehr erfolgen. HBV wird als 50-100-fach infektiöser eingestuft als HIV¹¹. Über 600 000 Menschen versterben jährlich an den Folgen einer akuten oder chronischen HBV-Infektion.

Ziel der konventionellen Therapie chronisch Infizierter ist es, eine Progression der Lebererkrankung mit akuter und chronischer Organinsuffizienz, Leberzirrhose sowie die

Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms zu verhindern und somit eine Verbesserung der Prognose zu bewirken. Eine kurative Behandlung der chronischen Hepatitis B, sprich die vollständige Eliminierung des Erregers, ist bis heute nicht möglich. Aktuelle Therapieansätze für chronisch Infizierte sind ein Erfolg, aber noch nicht zufriedenstellend. Die nebenwirkungsreiche Interferon- α -Therapie wurde mittlerweile weitgehend von Nukleosid- und Nukleotidanaloga wie Lamivudin und Adefovir abgelöst, welche die virale Transkriptase hemmen¹². Problematisch ist gerade bei der Therapie mit Lamivudin das gehäufte Auftreten von Resistenzen (bis zu 70 % nach vierjähriger Therapie)^{13,14}. Vom pre-S-Teil des großen viralen Hüllproteins (siehe 1.2.2) abgeleitete myristoylierte Peptide, die höchst effizient den Eintritt viraler Partikel in Hepatozyten inhibieren, und ihre Wirkung bereits in *in vitro*-Untersuchungen, als auch in prä-klinischen Studien unter Beweis stellten, könnten eine neue Generation HBV-Therapeutika (Myrcludex B®) darstellen^{15,16,17}.

Auf globaler Ebene stellt in Entwicklungs- und Schwellenländern in Asien und Afrika, in denen die HBV-Infektion endemisch auftritt, die ungenügende Verfügbarkeit der Immunprophylaxe eines der Hauptprobleme dar^{2,11}. Diese und weitere Aspekte machen HBV zu einem der größten globalen Gesundheitsprobleme. Um sowohl vorhandene Therapieansätze, als auch die HBV-Prophylaxe weiter zu optimieren, ist es unabdingbar, neben der klinischen Erforschung der Pathogenese, die molekularen Grundlagen einer HBV-Infektion weiter zu ergründen und aufzuklären.

1.1.1 Klassifizierung der Hepadnaviren

Nach dem Klonieren und Sequenzieren des Genoms des humanen HBV¹⁸ wurden schnell weitere verwandte Viren in Waldmurmeltieren (WHV), Erdhörnchen (GSHV) sowie in Vögeln wie der Pekingente (DHBV) gefunden. Im Anschluss erfolgte die Isolierung weiterer Spezies bei Säugern und Vögeln. Taxonomisch wird somit zwischen den Genera *Orthohepadnaviren*, welche Säuger als Wirte nutzen, und *Avihepadnaviren*, welche Vögel infizieren, unterschieden (siehe Tabelle 1-1 und Abbildung 1-1).

Vermeintlich neue Hepadnaviren wurden des Weiteren aus allen großen Altweltaffen (Schimpanse (*Pan troglodytes*)¹⁹, Gibbon (*Hylobates lar*)²⁰, Gorilla (*Gorilla gorilla*)²¹ und Orang-Utan (*Pongo pygmaeus*)²²) und aus *Lagothrix lagotricha* (Wollaffe), einem Neuweltaffen, isoliert und sequenziert. Isolate aus Menschenaffen werden zum Genotyp HBV gezählt, wobei man in ihrer Nomenklatur der Bezeichnung des entsprechenden Wirtes folgt, z.B. HBVcpz für Schimpansen HBV.

Tabelle 1-1 Übersicht zu Avi- und Orthohepadnaviren und ihren Wirten.

Avihepadnavirus	Wirt	Erstbeschreibung
Duck Hepatitis B Virus (DHBV)	Pekingente (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Mason <i>et al.</i> , 1980 ²³
Heron Hepatitis B Virus (HHBV)	Graureiher (<i>Ardea cinerea</i>)	Sprengel <i>et al.</i> , 1988 ²⁴
Stork Hepatitis B Virus (STHBV)	Weißer Storch (<i>Ciconia ciconia</i>)	Pult <i>et al.</i> , 2001 ²⁵
Crane Hepatitis B Virus (CHBV)	Grauer Kronenkranich (<i>Balearica regulorum</i>) Jungfernkranich (<i>Anthropoides virgo</i>)	Prassolov <i>et al.</i> , 2003 ²⁶
Ross Goose Hepatitis B Virus (RGHBV)	Zwergschneegans (<i>Anser rossii</i>)	Chang <i>et al.</i> , 1999 ²⁷
Snow Goose Hepatitis Virus (SGHBV)	Schneegans (<i>Anser caerulescens</i>)	Chang <i>et al.</i> , 1999 ²⁷
Endogenous Zebra Finch Hepatitis B Viruses (eZHBVs)	Zebrafink (<i>Taeniopygia guttata</i>)	Feschotte und Gilbert, 2010 ²⁸
Orthohepadnavirus	Wirt	Erstbeschreibung
Human Hepatitis B Virus (HBV)	Mensch	Dane <i>et al.</i> , 1970 ²⁹
Chimpanzee Hepatitis B Virus (HBVcpz)	Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	Vaudin <i>et al.</i> , 1988 ¹⁹
Gibbon Hepatitis B Virus (HBVgbn)	Gibbon (<i>Hylobates lar</i>)	Norder <i>et al.</i> , 1996 ²⁰
Orang-Utan Hepatitis B Virus (HBVoru)	Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	Warren <i>et al.</i> , 1999 ²²
Gorilla Hepatitis B Virus (HBVcpz)	Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	Grethe <i>et al.</i> , 2000 ²¹
Woolly Monkey Hepatitis B Virus (WMHBV)	Wollaffe (<i>Lagothrix lagotricha</i>)	Lanford <i>et al.</i> , 1998 ³⁰
Woodchuck Hepatitis B Virus (WHV)	Östl. Waldmurmeltier (<i>Marmota monax</i>)	Summers <i>et al.</i> , 1978 ³¹
Ground Squirrel Hepatitis B Virus (GSHV)	Kalif. Buchen-Erdhörnchen (<i>Spermophilus beecheyi</i>)	Marion <i>et al.</i> , 1980 ³²
Arctic Ground Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	Arkt. Erdhörnchen (<i>Spermophilus parryi kennicotti</i>)	Testut <i>et al.</i> , 1996 ³³
Bat Hepatitis B Virus (BtHBV)	Fledermaus	Drexler <i>et al.</i> , 2013 ³⁴

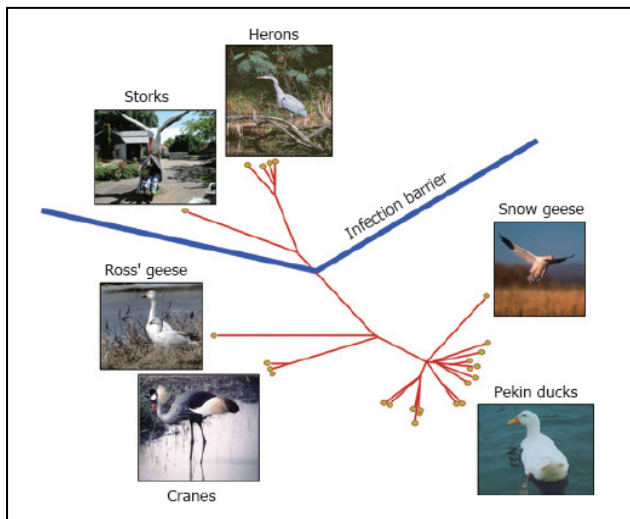


Abbildung 1-1 Phylogenetischer Stammbaum der Avihepadnaviren.

Dargestellt ist die phylogenetische Beziehung bereits isolierter Avihepadnaviren basierend auf der Sequenz des großen Hüllproteins pre-S/S. Die entsprechenden natürlichen Wirte sind ebenfalls präsentiert. Aus ³⁵.

Als entferntere, aber noch zur Gattung der Orthohepadnaviren gehörend, weisen WHV und GSHV eine genomische Divergenz von 17 % zu HBV auf. Avihepadnaviren zeigen mit einer Sequenzhomologie von nur 40 % die entfernteste Verwandtschaft zum humanen Virus. Aufgrund divergenter Nukleotidsequenzen über den gesamten Genombereich werden beim humanen HBV 8 (A-H), bei den nicht-humanen Primaten 3, bei GSHV und WHV nur 1 und bei DHBV 2 (chinesischer bzw. westlicher Typ) verschiedene Genotypen unterschieden.

Erst 2005 wurden fünf neue Avihepadnaviren aus exotischen Enten und Gänsen wie der Mandarinente, der Chilenischen Pfeifente und der Graukopfgans kloniert³⁶. Die erst kürzlich gemachte Entdeckung fossiler endogener Avihepadnaviren in heute lebenden Sperlingsvögeln wie den Zebrafinken, zeigt erstmalig die wahrscheinlich über 19 Millionen Jahre alte Abstammungsgeschichte von Hepadnaviren auf, viel älter als bisher angenommen²⁸.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem DHBV-Modellsystem gearbeitet. In den nächsten Abschnitten wird daher vergleichend auf die Molekularbiologie der viralen Partikeltypen und Genprodukte sowie auf die Genomorganisation eingegangen. Nach der allgemeinen Vorstellung von Infektionsmodellen für Hepadnaviren (1.1.6) wird in Abschnitt 1.2 das DHBV-Infektionssystem näher vorgestellt.

1.1.2 Morphologie viraler Partikeltypen

In die Hüllmembran viraler HBV-Partikel sind 3 verwandte Glykoproteine eingelagert, das große (LHBs = L-Protein, L für *large*), das mittlere (MHBs = M-Protein, M für *middle*) und das kleine (SHBs = S-Protein, S für *small*) Oberflächenantigen (HBsAg). In infektiösen Virionen liegen die 3 Proteine im Verhältnis 1:1:4 vor.

Virionen erscheinen im Elektronenmikroskop als sphärische, doppelschalige Partikel mit einem Durchmesser von etwa 42 nm²⁹. Die ersten Schritte zur Identifizierung des Hepatitis B Erregers wurden durch die Pionierarbeiten von Baruch S. Blumberg in den frühen 1960er Jahren zu erblichen Blutproteinvarianten gemacht³⁷. Akribische Studien führten dabei zur Identifizierung des sogenannten *Australia Antigens*, welches zunächst fälschlicherweise als ein Polymorphismus von Serumproteinen mit einer Prädisposition zu Leukämieerkrankungen interpretiert wurde. Erst nachfolgende Studien konnten den Zusammenhang zum Erreger einer Hepatitis vom Typ B aufzeigen. 1970 gelang Dane die elektronenmikroskopische Darstellung von Virionen aus dem Serum chronisch infizierter Patienten. Ihm zu Ehren werden infektiöse Virionen auch als „Dane-Partikel“ bezeichnet²⁹.

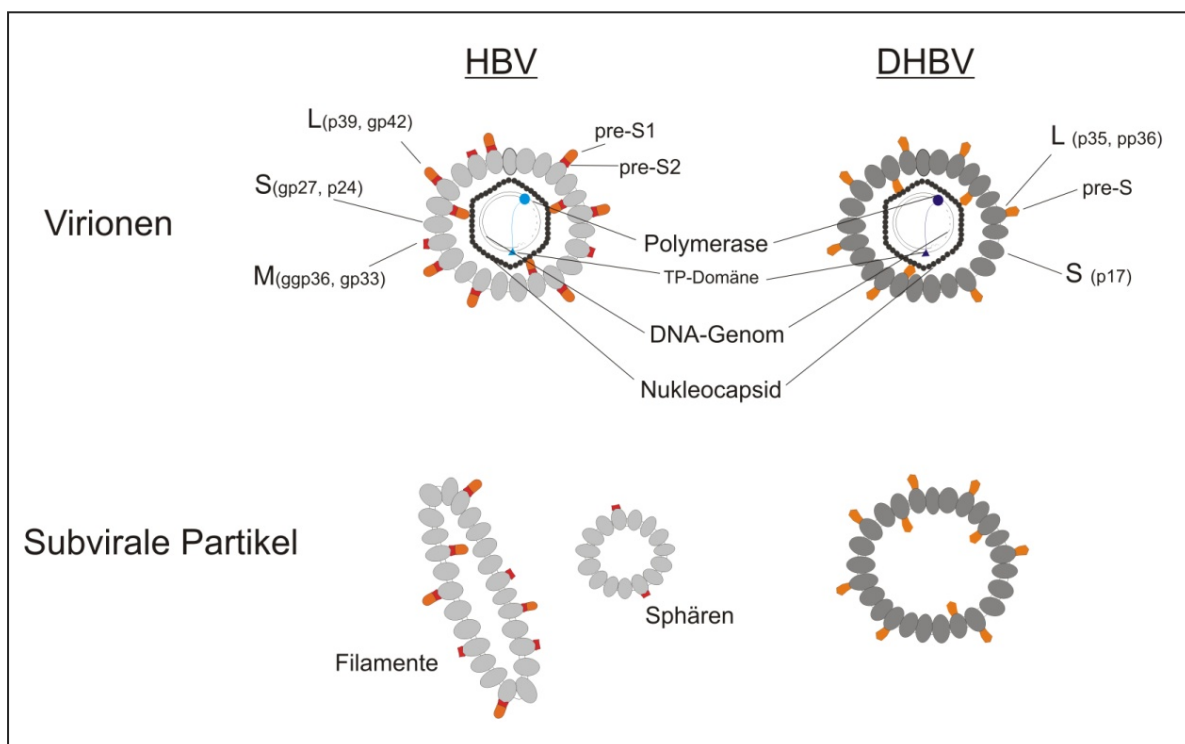


Abbildung 1-2 Morphologie und Aufbau von Virionen und subviralen Partikeln von HBV und DHBV.

Das partiell doppelsträngige virale Genom ist mit *Core*-Proteinen zu einem Nukleokapsid assoziiert. Die virale Polymerase ist über ihr terminales Protein (TP) kovalent an den Negativ-Strang der DNA gebunden. In die Lipidmembran infektiöser Virionen sind die viralen Oberflächenantigene eingebettet. Bei HBV sind dies die Proteine L (*large*), M (*middle*) und S (*small*), bei DHBV fehlt ein Protein mittlerer Größe. Die subviralen Partikel enthalten kein Nukleokapsid. Im Gegensatz zu HBV haben subvirale Partikel und Virionen von DHBV eine ähnliche Größe und Morphologie. (gp = glykosyliertes Protein, ggp= 2-fach glykosyliertes Protein, pp = phosphoryliertes Protein; Angaben in kDa).

Eine Besonderheit der hepadnaviralen Infektion ist, dass aus infizierten Zellen neben infektiösen Viren konstitutiv eine Sekretion leerer Hüllen, sogenannter subviraler Partikel (SVPs), erfolgt. Da sie kein Nukleokapsid enthalten sind SVPs nicht infektiös. Im Serum chronisch infizierter Patienten kann der Titer infektiöser Partikel bei bis zu 10^9 Partikeln pro ml liegen. SVPs liegen dabei typischer Weise in einem 1.000- bis 100.000-fachem Überschuss vor^{38,4}. HBV SVPs haben einen Durchmesser von etwa 20 nm und sind wie Virionen von sphärischer Gestalt oder sie haben eine filamentöse Form mit variabler Länge. Während subvirale Sphären fast ausschließlich aus S-Protein bestehen und fast kein L-Protein in ihrer Lipoproteinhülle tragen, findet man L in Filamenten, ebenso wie in Virionen, angereichert.

In die Hüllmembran infektiöser DHBV-Virionen sind nur 2 Proteintypen, ein kleines (SDHBs) und ein großes (LDHBs) Oberflächenantigen, eingelagert. Das Verhältnis von L- zu S-Protein liegt auch hier bei etwa 1:4³⁹. Im Serum infizierter Enten findet man bis zu 10^{11} Virionen pro ml und SVPs in einem etwa 1.000-fachen Überschuss. Im Gegensatz zu HBV erscheinen DHBV SVPs nur als pleomorphe Sphären mit einem Durchmesser von 55-60 nm. Sowohl in ihrer Größe, als auch hinsichtlich der Proteinzusammensetzung der Hülle sind sich Virionen und SVPs bei DHBV sehr ähnlich^{40,23,41}. Abbildung 1-2 zeigt eine Gegenüberstellung der genannten DHBV- und HBV-Partikeltypen.

1.1.3 Genomorganisation und Genprodukte

Mit einer Genomgröße von nur etwa 3 kb gehören Hepadnaviren zu den kleinsten animalen DNA-Viren. Ihr Genom weist eine komplexe Organisation von ausgeprägter Kompaktheit auf, was nur die Expression einer limitierten Anzahl von Genprodukten erlaubt. Jedes Nukleotid steht mindestens in einem kodierenden Kontext, die Hälfte wird für mehr als einen offenen Leserahmen (*open reading frame* (ORF)) genutzt⁴². Zusätzlich überlappen alle regulatorischen Elemente wie Promotoren, Enhancer und cis-Elemente mit kodierenden Sequenzen. Bei ähnlicher Organisation, aber nur sehr geringer Sequenzhomologie sind von allen Mitgliedern der Virusfamilie die Unterschiede zwischen Ortho- und Avihepadnaviren auf genomischer Ebene am größten. Abbildung 1-3 zeigt die Genomorganisation von HBV und DHBV im Vergleich. Das knapp 3,2 kb große HBV Genom weist vier teilweise überlappende ORFs auf: pre-C/C, P, pre-S1/S2/S und X. Das im Vergleich dazu kleinere DHBV Genom (etwa 3 kb) hat nur 3 Leserahmen, ein analoges X-Gen fehlt. Beiden zirkulären Genomen gemein ist die partiell doppelsträngige Struktur. Die zirkuläre

Konformation wird durch die überlappenden, kohäsiven 5'-Enden der beiden DNA-Stränge erreicht. Die virale Polymerase ist kovalent über ihre terminale Proteindomäne (TP) an das 5'-Ende des Negativstrangs gebunden. Als Komplement zu den viralen Transkripten ist der Negativstrang vollständig und weist eine kurze terminale Redundanz auf, ist aber nicht kovalent geschlossen. Der komplementäre Plusstrang ist unvollständig, wobei die Größe der einzelsträngigen Lücke zwischen den verschiedenen Hepadnaviren deutlich variiert (50-85 % bei Orthohepadnaviren), bei DHBV ist sie am kleinsten, bzw. weisen die meisten der infektiösen Partikel einen vollständigen Plusstrang auf⁴³.

Die im Zuge der viralen Genexpression entstehenden viralen Transkripte umfassen genomische und 3 (bzw. 2 bei Avihepadnaviren) subgenomische RNAs. Alle tragen eine 5'-Cap-Struktur und sind am 3'-Ende polyadenyliert.

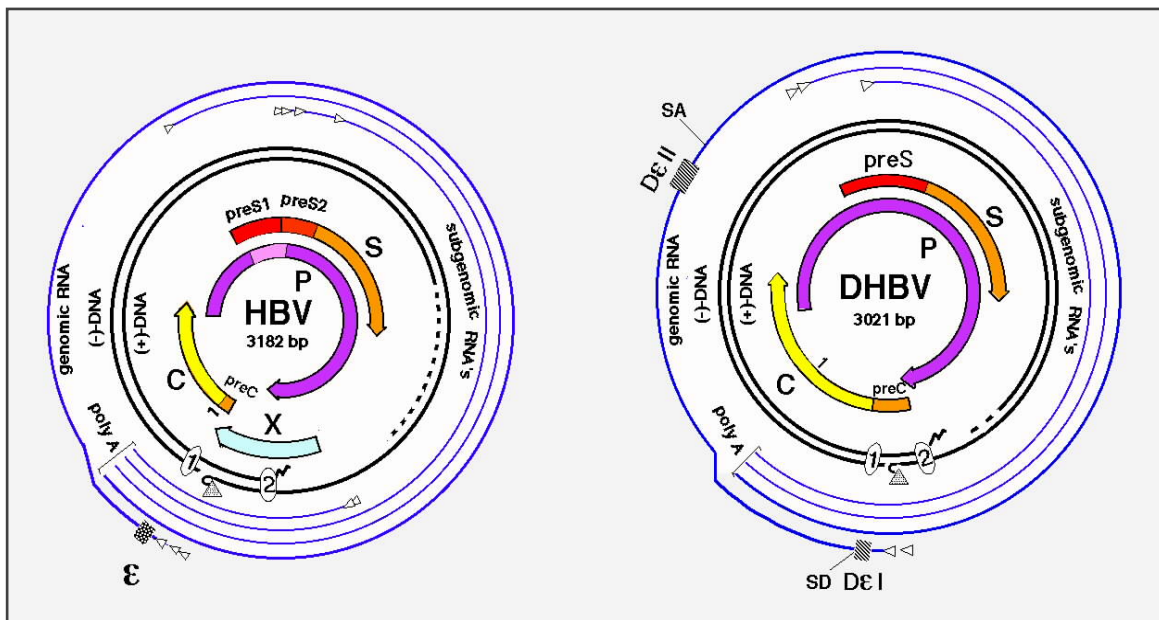


Abbildung 1-3 Genomorganisation von HBV und DHBV.

Von außen nach innen: Blaue Linien = genomische RNAs (3,5 kb pre-C und C/Pol mRNAs) mit ϵ -Signalstruktur(en) (graue Kästchen) und subgenomische RNAs (2,4 kb pre-S1 bzw. pre-S mRNA, 2,1 kb pre-S2/S bzw. S mRNAs, 0,9 kb X mRNA). Kleine Pfeile markieren die Initiationsstellen. Das den mRNAs gemeinsame Polyadenylierungssignal (poly A) ist aufgezeigt. Schwarze Linien = partiell doppelsträngige DNA-Genom mit *direct repeat* Sequenzen DR1 und DR2. Das am kompletten Negativstrang kovalent gebundene Terminale Protein (TP) ist durch ein Dreieck symbolisiert, die Schlangenlinie am unvollständigen Plusstrang stellt den RNA-Primer dar. Farbige Pfeile: 4 HBV bzw. 3 DHBV offene Leserahmen (pre-C/C, P, pre-S(1)/ (pre-S2)/ S, (X)). Die Nummerierung entspricht für HBV der nach Pasek *et al.* und beginnt am Startcodon der Core-Gens⁴⁴. Die Nukleotidpositionen für DHBV-16 sind nach Mandart *et al.* angegeben⁴⁵. Abbildung freundlicherweise von C. Kuhn zur Verfügung gestellt.

Die 3,5 kb lange genomische RNA dient sowohl als Matrize für die reverse Transkription (prägenomische RNA) als auch als mRNA für die Expression der Core-Genprodukte und der viralen Polymerase. Die subgenomischen Transkripte unterschiedlicher Länge kodieren für die Hüllproteine und X.

Bei HBV wird die Synthese viraler RNA-Transkripte durch die Aktivität von vier Promotoren (pre-S1, pre-S2/S, pre-C/C und X) und 2 Enhancern dirigiert⁴⁶. Durch Bindestellen für leberspezifische Transkriptionsfaktoren tragen diese regulatorischen Elemente auf Ebene der Genexpression zusätzlich zum Lebertropismus der Hepadnaviren bei^{47,48,49}.

Der pre-C/C-ORF kodiert für das Strukturprotein des ikosaedrischen Nukleokapsids, das C-Protein (Core bzw. HBcAg, HBV 21 kDa (183 oder 185 Aminosäuren (aa)), DHBV 32 kDa (262 aa)), als auch für das sogenannte e-Antigen (pre-Core bzw. HBeAg), welches im Zuge einer Infektion ins Blut Infizierter sezerniert wird, nachdem es N- und C-terminal prozessiert wurde. Beide Genprodukte werden durch die Nutzung heterogener Initiationsstellen von der 3,5 kb langen genomischen RNA synthetisiert. Für das e-Antigen wird eine immunmodulatorische Funktion angenommen, die für die Etablierung einer chronischen Infektion maßgeblich sein soll⁵⁰. Für die *in vivo* Infektion *per se*, sowie für die Bildung infektiöser Partikel spielt die Expression des Proteins keine Rolle^{51,52}. Homodimere Untereinheiten des C-Proteins lagern sich spontan zu Kapsiden mit ikosaedrischer Symmetrie zusammen, die aus 120 (T=4), seltener aus 90 (T=3) Dimeren bestehen^{53,54,55}. Während die N-terminale Domäne des Proteins die Schale des Nukleokapsids ausbildet, interagiert die C-terminale Domäne mit der Nukleinsäure und ragt dementsprechend ins Innere des Kapsids^{56,57,58}.

Der P-ORF, der fast 80 % des Genoms einnimmt, kodiert für die virale Polymerase (etwa 90 kDa, HBV 830 aa, DHBV 790 aa), welche sich aus 3 Domänen zusammensetzt, (i) dem terminalen Protein (TP), über welches die Polymerase kovalent an das virale Genom assoziiert ist, (ii) einer Polymerase/Transkriptase und (iii) einer RnaseH^{59,60}. Dieser Aufbau spiegelt die zentrale Rolle der RNA- und gleichzeitig DNA-abhängigen DNA-Polymerase in der viralen Replikation an einem RNA-Intermediat wider. Das P-Protein wird wie das C-Protein als zweites Cistron von einem internen Initiationscodon derselben genomischen RNA translatiert, obwohl beide ein unterschiedliches Leseraster benutzen^{61,62}. Dies erklärt auch, dass ein eigenes Promotorelement für das P-Gen fehlt.

Die Hüllproteine von HBV werden vom pre-S1/pre-S2/S-ORF kodiert, welcher analog zum pre-C/C-ORF verschiedene Initiationsstellen innerhalb eines Leserasters besitzt. Auch hier

resultieren Transkripte mit unterschiedlichen 5'-Enden. Das L-Protein wird von subgenomischer RNA mit einer Länge von 2,4 kb, das M- und das S-Protein werden von 2,1 kb langen Transkripten translatiert⁴⁶. Die Translation der S-RNA alleine resultiert in der Expression des S-Proteins, eine Kotranslation von pre-S2/S führt zur Expression von M, während eine Transkription des gesamten ORFs unter Kontrolle des pre-S1-Promotors in der Translation des großen Hüllproteins resultiert.

Der vierte Leserahmen im hepdnaviralen Genom kodiert das X-Protein, welches von einer subgenomischen 0,9 kb RNA translatiert wird. Als gewebespezifischer Transaktivator sowohl für Wirts- als auch für virale Gene *in vitro* ist die natürliche Funktion des X-Proteins bislang weitgehend ungeklärt^{46,63,64,65,66}. Allerdings konnte seine essentielle Funktion bei der Etablierung einer Infektion *in vivo* im WHV-System gezeigt werden⁶⁷.

Bei den Avihepadnaviren entstehen neben der genomischen RNA nur 2 subgenomische mRNAs. Im Vergleich zu HBV besteht aber trotz großer Abweichung bezüglich der Sequenzhomologie eine ähnliche Genomorganisation. Das pre-C/C-Gen im DHBV-System kodiert für ein etwas längeres Kapsid-Protein, die typische 2-Domänen-Struktur scheint aber konserviert⁶⁸. Durch heterogene Initiationsstellen entsteht auch hier das analoge Genprodukt DHBsAg. Da nur 2 Oberflächenproteine in die Hülle viraler DHBV-Partikel eingelagert sind, weist der pre-S/S-ORF auch nur eine S- und eine pre-S-Region auf. Diese werden von korrespondierenden subgenomischen Transkripten mit 2,35 kb bzw. 2,13 kb als LDHBsAg bzw. SDHBsAg exprimiert⁶⁹.

Gespleißte Transkripte sind beschrieben, die genaue Funktion prozessierter Transkripte ist für die hepdnavirale Genexpression aber noch nicht bekannt bzw. scheint ihre Funktion nicht maßgeblich^{70,71}. Das Auftreten defekter HBV-Partikel, die durch reverse Transkription gespleißter RNA hervorgehen, scheint allerdings einen negativen Einfluss auf die Pathogenese zu haben^{72,73}.

Im DHBV-Modellsystem zeigte sich eine Spleiß-Variante der pgRNA funktionell als zweite pre-S mRNA und als essentiell für eine erfolgreiche virale Replikation *in vivo*. Obwohl die genaue Funktion noch ungeklärt scheint, lässt die Beobachtung, dass die Bildung neuer Viruspartikel in transfizierten Zellen unbeeinträchtigt von dieser L-RNA Variante ist, eine Rolle dieses alternativen Synthesewegs für L während früher Schritte im Infektionszyklus vermuten⁷⁴.

1.1.4 Virale Hüllproteine und ihre Topologie

Aufgrund der Genomorganisation teilen sich alle Hüllproteine (siehe Schema in Abbildung 1-4) C-terminal die hydrophobe S-Domäne, welche in ihrer Sequenz dem S-Protein entspricht. Sie setzt sich aus 226, bei DHBV aus 167 Resten zusammen. Das HBV M-Protein ist mit 281 aa N-terminal um die 55 aa lange hydrophile pre-S2-Region erweitert. L ist N-terminal um weitere 108 bzw. 119 aa (je nach Subtyp) um die sogenannte pre-S1-Region verlängert. Analog dazu befindet sich beim DHBV L-Protein N-terminal zu S eine 161 aa lange pre-S Domäne, eine weitere Domäne fehlt. Während bei HBV alle Oberflächenproteine N-glykosyliert vorliegen können, bleiben die Hüllproteine von DHBV, trotz potentieller N-Glykosylierungsstellen in S und pre-S, unglykosyliert.

SHBs ist die Hauptstrukturkomponente viraler Partikel. Es besitzt an Asn146 eine fakultative N-Glykosylierungsstelle, wobei sich etwa die Hälfte aller S, M und L-Proteine an dieser Stelle ihrer S-Domäne modifiziert zeigen⁷⁵. Für SHBsAg lässt sich ein Molekulargewicht von 24 kDa (p24), bei Glykosylierung von 27 kDa (gp27) detektieren, SDHBsAg liegt bei einer Größe von 17 kDa (p17). Aus Serumpartikeln sowie aus Membranen infizierter Hepatozyten konnte bei DHBV des Weiteren eine C-terminal verkürzte Variante des S-Proteins (S_t , *truncated*) isoliert werden. S_t hat ein Molekulargewicht von etwa 8 kDa und stellt einen signifikanten Bestandteil viraler Partikel dar^{76,77}. Für **MHBs** kommt mit pre-S2 eine obligate N-Glykosylierungsstelle (Asn4) hinzu, was zur Detektion von Proteinspezies mit 33 kDa (einfach glykosyliert/gp33) und 36 kDa (2-fach glykosyliert/ggp36) führt⁷⁸. Das Modifizierungsmuster von **LHBs** zeigt, dass L fakultativ nur in seiner S-Domäne glykosyliert wird (Asn146), woraus die Varianten p39 und gp42 resultieren. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen in pre-S1 und pre-S2 werden nicht genutzt⁷⁹.

Das Molekulargewicht von DHBV L liegt bei 35 kDa. Da das Hüllprotein jedoch teilweise phosphoryliert wird, präferentiell an Ser118, resultiert eine zweite L-Spezies (p36). Eine weitere Modifizierung ist die kovalente N-Myristoylierung an Gly2. Neben einer essentiellen Rolle für die Infektiosität scheint der Fettsäurerest für die Verankerung des Polypeptids in der Membran verantwortlich zu sein^{80,81,82}.

Die hepadnaviralen Transmembranproteine werden am rauen ER synthetisiert und durchspannen mit mehreren Segmenten die Membran. Das Modell zur Topologie von S geht von vier hydrophoben Bereichen, sogenannten Transmembrandomänen (TM) aus, die als α -Helices die Membran durchspannen.

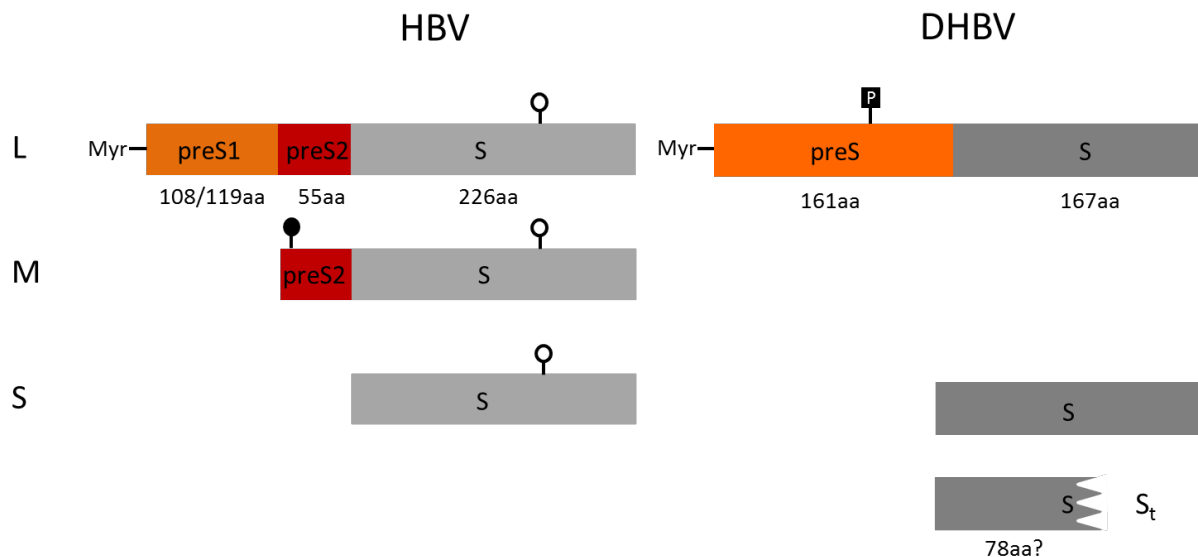


Abbildung 1-4 Hüllproteine von HBV und DHBV.

Lineare Präsentation der Hüllproteine von HBV und DHBV. Allen 3 bzw. 2 Typen ist die jeweils C-terminale Sequenz, die sogenannte S-Domäne, gleich. M- und L-Protein sind jeweils N-terminal um 1 bzw. 2 hydrophile pre-S-Domänen verlängert, bei DHBV schließt sich beim großen Hüllprotein nur eine pre-S-Region an. Beide L-Proteine sind an Gly2 myristoyliert (Myr-). HBV M ist obligat N-glykosyliert, die S-Domäne aller 3 Proteine ist partiell glykosyliert (ausgefüllte bzw. nicht ausgefüllte Kreise). Die DHBV Proteine bleiben unglykosyliert, L wird aber an S118 phosphoryliert (P). Die S-Protein Variante S_t in der DHBV Hüllmembran ist ebenfalls dargestellt. Abbildung nach ⁸³.

Da die S-Domäne bei den 3 bzw. 2 Transmembranproteinen gleich ist, ist sie neben der Verankerung auch für die jeweilige Topologie der Hüllproteine verantwortlich^{59,84}. Die Lage der ersten beiden α -helikalen Bereiche (TM-1 und -2) findet sich bei allen hepadnaviralen Oberflächenproteinen konserviert⁸⁵. Dieser Bereich wird in das raue ER transloziert, wobei er als N-terminales Signalpeptid bzw. Stop-Transfersequenz fungiert. Diese kotranslationale Insertion ermöglicht des Weiteren die Insertion N- bzw. C-terminal gelegener Sequenzen in die Membran^{86,87,88}. Das immundominante Oberflächenepitop (a-Determinante) und die N-Glykosylierungsstelle (Asn146) kommen auf einer Schleifen-Struktur, welche in das ER-Lumen ragt, zu liegen⁷⁵. Die finale Topologie des Transmembranbereichs von SHBsAg und MHBsAg ist identisch und wird kotranslational erreicht.

Für HBV L konnte gezeigt werden, dass die pre-S1- und pre-S2 Regionen initial auf zyttoplasmatischer Seite liegen und nicht kotranslational in das ER-Lumen transloziert werden. Eine Glykosylierung der pre-S-Regionen entfällt folglich. Während eines Reifungsprozesses verlagert die Hälfte der L-Proteine ihre N-terminalen pre-S Teile sowie TM-1 über die Membran. Pre-S liegt danach exponiert auf der Virusoberfläche, so dass in

reifen Virionen eine duale Topologie des L-Proteins detektierbar ist^{89,90,91,90,91}. Diese zytoplasmatische bzw. luminale Lokalisation von pre-S reflektiert die duale Funktion von L, nämlich die Umhüllung viraler Nukleokapside und die spezifische Interaktion mit der Wirtszelle. Interessanterweise kommt eine aktuelle Studie zu dem Resultat, dass die viralen Partikel zunächst mit innen liegendem pre-S sezerniert und erst durch einen weiteren Reifungsschritt, bei dem pre-S transloziert wird, langsam infektiös werden⁹².

Für das L-Protein der Avihepadnaviren konnte eine analoge duale Topologie und Multifunktion bestätigt werden (Abbildung 1-5)^{93,94}. Als Ergebnis der posttranslationalen Translokation kann pre-S zusammen mit TM-1 3 Topologien annehmen. Bei der internen Konformation (*i-pre-S*) verbleibt die gesamte pre-S-Region zytoplasmatisch und kommt in der Folge auf der Innenseite der Partikel zu liegen. *i-pre-S* ist so in der Lage mit dem Nukleokapsid zu interagieren, außerdem kann es regulatorische Funktionen übernehmen^{95,96,97}. Alternativ kann die externe Konformation (*e-pre-S*) erreicht werden. In der Folge liegt pre-S exponiert auf der Außenseite des Partikels, bereit für die spezifische Interaktion mit einem zellulären Rezeptor^{93,98,99}.

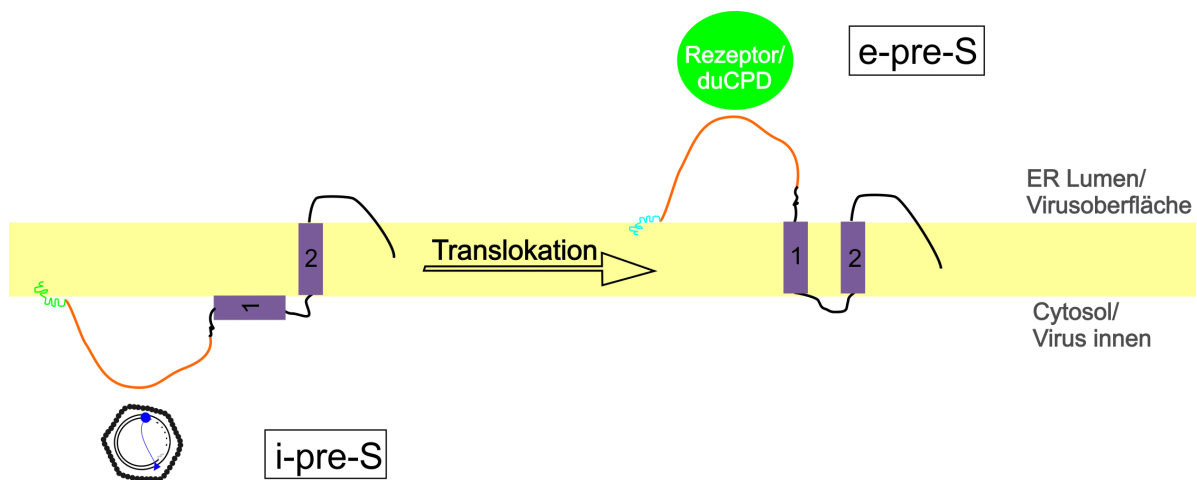


Abbildung 1-5 Duale Topologie und Funktion von DHBV pre-S.

Die S-Domäne von LDHBsAg wird kotranslational in die Membran des ER inseriert und durchspannt mehrfach die Membran. Die hydrophile pre-S Domäne (orange) trägt N-terminal einen Myristoylrest (blau), der sie an die Membran assoziiert. Initial sind pre-S und TM-1 zytosolisch lokalisiert (*i-pre-S* Konformation, *i* = *internal*) und stellen so die Matrix für die Kapsidassemblierung dar. Bei der Hälfte der Moleküle wird pre-S posttranslational über die Membran transloziert, liegt final auf der Virusoberfläche und steht für eine Interaktion mit zellulären Rezeptormolekülen (wie duCPD) zur Verfügung (*e-pre-S* Konformation, *e* = *external*).

Für eine intermediäre Topologie, welche eine pre-S/TM-1 Orientierung zwischen interner und externer Topologie annimmt, wird eine Vorstufe für eine Konformationsänderung von L mit Rolle im Fusionsprozess postuliert^{94,100,101}. Der zugrunde liegende Translokationsmechanismus ist bisher nicht bekannt; dass zytoplasmatische Bindepartner wie Hsc70 reprimierend auf eine kotranslationale Translokation von pre-S wirken könnten, wird diskutiert^{102,103,104}. Luminale Chaperone, die an die e-pre-S Struktur binden, könnten hierbei unterstützend wirken¹⁰⁵. Auch wird die mögliche Oligomerisierung von S-Domänen zur Ausbildung eines hydrophilen Translokationskanals diskutiert^{85,106}.

Während bei HBV die posttranslationale Translokation von L von Sequenzen in TM-2, nicht aber vom S-Protein abhängig ist, ist bei DHBV die Anwesenheit von SDHBsAg notwendig^{84,107,108}. S_t scheint hierbei Chaperonfunktion zu übernehmen⁷⁷. Diese Punkte legen nahe, dass HBV und DHBV unterschiedliche Translokationsmechanismen entwickelt haben. Die Tatsache, dass sich avi- und orthohepadnavirale Partikel nicht mit Hüllproteinen des jeweils anderen Typs pseudotypisieren lassen, verdeutlicht dies zusätzlich¹⁰⁹.

1.1.5 Der hepadnavirale Lebenszyklus

Abbildung 1-6 zeigt ein Modell vom hepadnaviralen Replikationszyklus. Die Hepatozyten des entsprechenden Wirtes stellen den präferentiellen Ort für die Replikation und Virusvermehrung dar. Diese Gewebe- und Wirtsspezifität impliziert, dass neben der Regulation auf Ebene der Genexpression auch die notwendige Interaktion mit einem spezifischen zellulären Rezeptor eine selektive Barriere darstellt. Bis heute sind die sehr frühen Schritte im Lebenszyklus der Hepadnaviren wie die Anheftung an die Wirtszelle und die Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor nur teilweise verstanden (siehe 1.2.2). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl HBV als auch DHBV über ihre pre-S1- bzw. pre-S-Domäne ihres L-Oberflächenproteins an die Wirtszelle binden^{110,99}.

Das Virus gelangt durch Endozytose in die Zelle. Vermittelt durch Kernlokalisierungssignale im C-Protein wird das Nukleokapsid nach seiner Freisetzung ins Zytoplasma zum Zellkern transportiert, wo das nur teilweise doppelsträngige, nicht kovalent geschlossene Genom (rcDNA, *relaxed circular*) in eine kovalent geschlossene, zirkuläre DNA (cccDNA; *covalently closed circular DNA*) konvertiert wird, welche dann bei der viralen Genexpression als Matrize dient^{111,112,113,114}. Nach Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II werden subgenomische und genomische RNAs aus dem Kern exportiert und dienen dann im Zytoplasma als mRNAs¹¹⁵. Eine besondere Rolle übernimmt hierbei die genomische RNA,

die neben der Kodierung der viralen Polymerase und des C-Proteins auch noch die prägenomische RNA (pgRNA) repräsentiert. Sind ausreichende Mengen an C-Protein und Polymerase sowie pgRNA im Zytoplasma akkumuliert, treten die 3 Komponenten spezifisch in Kontakt. Über eine 5' gelegene Sekundärstruktur auf der pgRNA (DεI, Abbildung 1-3) interagiert das P-Protein spezifisch und präferentiell mit seiner eigenen mRNA^{116,117,118,119}. Zusätzlich löst dies die Assoziation translatierter Kapsid-Protein-Dimere an den Komplex aus, was die Generierung neuer Kapside zur Folge hat. Bei DHBV zeigte sich ein zweites, weiter 3' gelegenes Verpackungssignal (DεII) als erforderlich¹²⁰. Die P-Protein/ε-Interaktion erfüllt eine zweite Funktion, indem von der gebundenen Sequenz ein kurzer DNA-Primer synthetisiert und so die reverse Transkription im Kapsid initiiert wird¹²¹. Nach der Minusstrang-Synthese an der pgRNA erfolgt die des Plusstranges. Der finale Schritt in der Morphogenese ist das Knospen neugebildeter Kapside in ein pre-Golgi-Kompartiment. Die Oberflächenproteine werden von subgenomischen RNAs translatiert und als integrale Proteine in die Membran des rauen ER inseriert. Als leere, sogenannte subvirale Partikel können sie die Zelle autonom verlassen oder aber sie interagieren mit neugebildeten Nukleokapsiden zu umhüllten Partikeln. Die virale Hüllmembran weicht in ihrer Zusammensetzung vom Aufbau intrazellulärer Membranen ab, was auf einen selektiven Prozess der Lipidzusammensetzung hinweist, wobei das Lipid-Protein-Verhältnis in der Virushülle generell sehr niedrig ist^{122,123}.

Alternativ zur Passage über den sekretorischen Weg werden Kapside mit revers transkribierter Nukleinsäure zurück zum Zellkern transportiert. Die reimportierte DNA dient dort der Etablierung eines cccDNA-Pools, mit etwa 1-20 Molekülen pro Kern bei einer DHBV-Infektion und bis zu 50 Molekülen und mehr bei einer Infektion mit HBV^{124,125,126,127}. Dieser Reinfektionszyklus läuft präferentiell in der Etablierungsphase einer Infektion ab, wenn erst geringe Mengen L-Protein vorhanden sind. Steigt die Konzentration von L, werden präferentiell umhüllte Virionen gebildet und sezerniert, wobei das L-Protein hierbei eine koordinierende Funktion übernimmt^{128,97}. Die Replikation der Hepadnaviren verläuft somit wie bei Retroviren über ein RNA-Intermediat, die reverse Transkription erfolgt aber nicht nach Eintritt in die Wirtszelle und vor Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom, sondern erst spät im Lebenszyklus. Auch liegt die reparierte HBV-DNA im Kern in Form episomaler, viraler Minichromosomen vor¹²⁹.

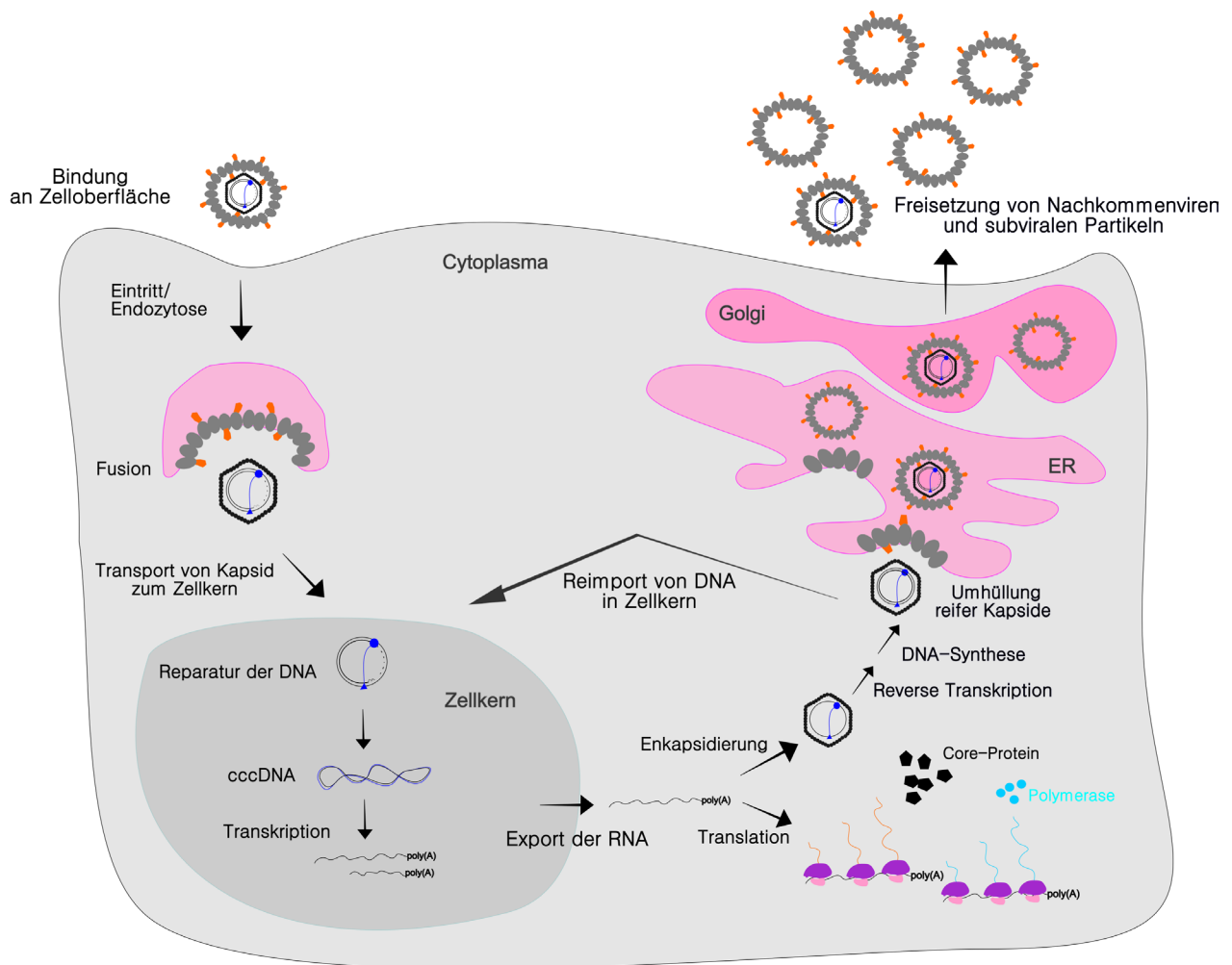


Abbildung 1-6 Schematische Darstellung des hepadnaviralen Replikationszyklus.

Nach Bindung und Aufnahme in die Hepatozyte gelangt das partiell doppelsträngige Genom in den Zellkern, wo es in cccDNA konvertiert wird. Verschiedene RNA-Spezies (subgenomisch und genomisch) werden aus dem Kern exportiert und translatiert bzw. als Prägenom in neue Kapside verpackt. Reife Kapside werden am ER umhüllt und verlassen die Zelle auf dem sekretorischen Weg. Alternativ wird das revers transkribierte Genom in den Kern reimportiert, wo ein cccDNA-Pool angelegt wird. Neben Virionen verlassen im Überschuss Nukleokapsid-freie subvirale Partikel die Zelle.

1.1.6 Die experimentelle HBV-Infektion

Die Tatsache, dass man mit HBV neben dem Menschen nur höhere Primaten wie Schimpansen infizieren kann, demonstriert zum einen das charakteristische und enge Wirtsspektrum von Hepadnaviren, spiegelt zum anderen aber auch die Widrigkeiten in der Erforschung des HBV-Replikationszyklus wider^{130,131}. Lange fehlte ein geeignetes Modellsystem in Form einer stabilen Zelllinie oder eines kleinen Tiermodells, welches die Studie sehr früher Schritte wie Bindung und Eintritt in die Zelle sowie die Freisetzung des

Genoms ermöglicht hätte. Die Durchführung von *In vitro*-Infektionsstudien war daher bis vor etwa 15 Jahren fast ausschließlich auf das Arbeiten mit primären Hepatozyten beschränkt. Die Verwendung primärer humaner Hepatozyten (PHHs) erlaubt dabei zwar eine effiziente Infektion mit HBV, die geringe Verfügbarkeit von gesundem Lebergewebe stellt allerdings einen stark limitierenden Faktor dar. Zusätzlich erschweren der zeitlich begrenzte Differenzierungsstatus, die fehlende Möglichkeit die Zellen zu propagieren und die Heterogenität von PHHs hinsichtlich Qualität und Suszeptibilität das experimentelle Arbeiten^{132,133}. Der Einsatz von Schimpansen als Versuchstiere stellt aus ethischen aber auch aus finanziellen Gründen nur sehr bedingt eine Alternative dar.

Surrogatsysteme wie die Hepatoma-Zelllinien HuH7 und HepG2 stellten lange Zeit eine technische Alternative dar. Zwar zeigen sich die immortalisierten Zellen nicht suszeptibel für eine HBV-Infektion, allerdings erlaubt das Einbringen viraler, replikationskompetenter DNA durch Transfektion das Umgehen initialer Schritte im Replikationszyklus wie Bindung und Aufnahme des Virus und es erfolgt eine Runde der Virusproduktion. Der Ablauf und Mechanismus von Transkription und Replikation konnten für HBV so detailliert analysiert werden^{116,119,134}. Auch stellen die Surrogatsysteme immer noch die Methode der Wahl für die Produktion rekombinanter Hepadnaviren dar^{135,136,137,138}. Die mögliche Komplementierung von HepG2-Zellen mit dem erst kürzlich identifizierten HBV-Rezeptor NTCP (siehe 1.2.2) eröffnet sowohl der weiteren Erforschung des Eintrittsmechanismus und der Freisetzung des viralen Kapsids, als auch therapeutischen Studien völlig neue Optionen¹³⁹.

Infektiöse Virionen werden auch von transfizierten Mausleberzellen produziert und sezerniert, dasselbe gilt für Hepatozyten HBV-transgener Mäuse^{140,141}. Aufgrund der fehlenden Suszeptibilität der Zellen kann die Erforschung früher Schritte der Infektion auch in diesen Systemen nicht adressiert werden. Da in transgenen Mauslebern alle viralen Transkripte an einem integrierten Genom und nicht an cccDNA entstehen, fehlt des Weiteren die Möglichkeit, antivirale Substanzen auf ihre Wirkung hin zu untersuchen, die Virusproduktion vollständig zu inhibieren, was eine Eliminierung des cccDNA-Pools voraussetzen würde.

Die Generierung eines weiteren kleinen Tiermodells, sogenannter uPA/RAG-2-Mäuse, optimierte die Bedingungen weiter. Chimäre d.h. mit humanen, *Woodchuck*- oder *Tupaia*-Hepatozyten (siehe unten) repopulierte Mauslebern erlauben hierbei eine *in vivo* HBV-Infektion^{142,143,15}. Detaillierte Untersuchungen zur hemmenden Wirkung von pre-S-abgeleiteten Peptiden auf den Zelleintritt von HBV wurden bereits durch Petersen und Kollegen durchgeführt¹⁵. Neben einer Infektion mit HBV erlaubt das System zudem die

nähere Charakterisierung einer HBV/HDV-Ko- bzw. Superinfektionen. Im Menschen nimmt eine akute Infektion dieser Art im Vergleich zu einer HBV-Monoinfektion deutlich häufiger einen schweren und fulminanten Verlauf, was die Entwicklung effektiver Therapieansätze dringend erforderlich macht^{144,145}. Indem sie die Interaktion beider Viren studierten und die Etablierung einer HDV-Infektion mit dem von pre-S1 abgeleiteten Lipopeptid Myrcludex-B® effizient unterdrücken konnten, demonstrierten Lütgehetmann und Kollegen eindrücklich den Nutzen des Systems für die Evaluation neuer Therapeutika sogar im Rahmen präklinischer Studien¹⁴⁶. Eine parallele Untersuchung des Immunsystems lässt das System allerdings nicht zu, da die Mäuse versuchsbedingt immunsupprimiert sein müssen. Der große technische Aufwand stellt einen weiteren Nachteil dieses Modellsystems dar. In den Jahren 2001 und 2002 gelang die Etablierung von 2 weiteren vielversprechenden Infektionssystemen für HBV: Obwohl nicht zu den Primaten gehörend, zeigten sich die Hepatozyten des kleinen Säugers *Tupaia belangeri* aus den südostasiatischen Tropen *in vitro*, als auch *in vivo* suszeptibel für eine Infektion durch HBV oder WMHBV^{147,148,149}. Die Effizienz der HBV-Infektion ist hierbei vergleichbar mit der einer analogen Infektion von PHHs, die Verfügbarkeit als auch die Suszeptibilität primärer Tupaia Hepatozyten (PTH) stellen aber keine Einschränkung dar. Im Gegensatz zu einer *in vitro* HBV-Infektion von PHHs oder auch HepaRG-Zellen (siehe unten) verlangt eine optimale Infektion von PTHs keinen Zusatz von Polyethylenglykol (PEG) oder Dimethylsulfoxid (DMSO)^{148,150}. Glebe und Kollegen demonstrierten mittels neutralisierender Antikörper die Spezifität und die pre-S1-Abhängigkeit der *in vitro* HBV-Infektion von PTHs¹⁵¹. *In vivo* hat die Infektion einen selbstlimitierenden Charakter und nimmt keinen chronischen Verlauf¹⁴⁹.

Für eine produktive Infektion ist neben der Wirtsspezifität der Differenzierungszustand kultivierter Leberzellen maßgebend¹⁵². Die Etablierung der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG als ein weiteres Infektionssystem demonstrierte dies eindrücklich¹⁵³. Bis dato ist dies die einzige Zelllinie, die unter speziellen Kultur- und Infektionsbedingungen einen vollständigen HBV-Replikationszyklus unterstützt. Die Suszeptibilität der Zellen wird durch eine mehrwöchige Induktionsphase mit DMSO und Hydrocortison erreicht, wobei die Zellen eine Hepatozyten-ähnliche Morphologie annehmen und eine Vielzahl leberspezifischer Markerproteine exprimieren. In diesem Stadium kann eine Infektion der Zellen erfolgen. Die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) zum Infektionsansatz ist hierbei erforderlich, eine Bedingung, die weder eine Infektion von PTHs, noch von PDHs (siehe unten) erfordert.

1.2 DHBV als Modellsystem

1.2.1 Das DHBV-Infektionssystem

Seit mittlerweile 30 Jahren wird das DHBV-Modellsystem erfolgreich genutzt. Aufgrund der genannten Nachteile der oben beschriebenen Systeme stellt DHBV nach wie vor ein optimal geeignetes Modell dar, um den hepadnaviralen Infektionszyklus zu studieren. Sowohl für *In vivo*- als auch für *In vitro*-Studien erlaubt das Infektionssystem ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Flexibilität. Im Vergleich zu anderen Primärzellsystemen zeigt die Infektion von primären Entenhepatozyten (PDHs) in Abhängigkeit vom eingesetzten Virus-Titer eine Ausbreitung der Infektion auf nahezu alle Zellen der Kultur. Bei einer natürlichen Infektion entwickelt sich, ähnlich wie bei HBV, eine chronische DHBV-Infektion durch vertikale Übertragung vom Muttertier über das Blut auf das Ei bzw. den Embryo. Die Transmissionsrate liegt hier nahezu bei 100 %¹⁵⁴. Natürlicherweise ist bei mindestens 10 % aller Pekingtonen eine DHBV-Infektion nachweisbar^{155,156}. Im Unterschied zu HBV verläuft eine Infektion mit dem Avihepadnavirus allerdings nicht pathologisch, Folgeschäden wie das Auftreten von Entzündungen oder krebsartigen Veränderungen der Leber sind selten.

Da es keine mit DHBV infizierbare Zelllinie gibt, gilt es für *In vitro*-Infektionsstudien auf Primärzellen zurückzugreifen. Die Möglichkeit PDHs experimentell mit DHBV-haltigem Entenserum zu infizieren wurde erstmalig von Tuttleman *et al.* 1986 beschrieben¹⁵⁷. Das Kulturmedium wird mit Insulin und Hydrocortison sowie mit DMSO versetzt, was den Differenzierungszustand und somit die Infizierbarkeit der Zellen aufrechterhält^{158,159}. Da die Suszeptibilität der Zellen bei Zugabe von fötalem Kälberserum schnell verloren geht, wird auf die Zugabe von Serum verzichtet¹⁵⁷. Nachteile des *In vitro*-Kultursystems stellen die zeitaufwändige Präparation der Primärzellen, die fehlende Möglichkeit der Kryokonservierung und der Propagation der Zellen, sowie das kleine Zeitfenster von nur etwa einer Woche, in dem die Zellen effizient mit DHBV infiziert werden können, dar. Analog zum HBV-System können infektiöse Viren entweder aus virushaltigem Serum gewonnen oder aber rekombinant in Leberzelllinien produziert werden. Condreay und Kollegen etablierten die Generierung von DHBV in der Hühner-Hepatomazelllinie LMH (*leghorn male hepatocytes*)¹⁶⁰. Nach Transfektion mit rekombinanter DNA erlauben die Zellen eine Runde der Virusreplikation, was die gezielte Herstellung von Wildtyp DHBV sowie von Mutanten erlaubt.

1.2.2 Frühe Schritte im Replikationszyklus von DHBV

Die initialen Schritte im Replikationszyklus von HBV sind im Detail noch weitgehend unverstanden. Für die Rolle eines spezifischen Rezeptors wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche potentielle Kandidaten präsentiert, bis kürzlich konnte aber keines der Moleküle diese Lücke im Verständnis überzeugend schließen (für Übersichtsartikel siehe Glebe und Urban⁸³). 2012 gelang es Yan und Kollegen das vorwiegend in der Leber exprimierte ~ 65kDa große Glykoprotein *Na⁺-Taurochlorate Cotransporting Polypeptide*, NTCP, als pre-S1-spezifischen Bindepartner auf Leberzellen und eindeutig als funktionellen Rezeptor, sowohl für HBV als auch für HDV, zu identifizieren. Beispielsweise resultiert die heterologe Expression von NTCP in HepG2- oder Huh7-Zellen in der Infizierbarkeit der eigentlich nicht-suszeptiblen Hepatoma-Zelllinien¹³⁹.

Im Allgemeinen geht der spezifischen und meist hochaffinen Rezeptorbindung eines Virus an seine Wirtszelle eine initiale Zellbindung mit reversiblen, weniger affinem Charakter voraus. Die einzelnen Schritte im komplexen Eintrittsmechanismus von HBV sind im Detail zwar noch nicht vollständig geklärt, Schulze *et al.* konnten aber zeigen, dass die Rolle eines ersten Bindepartners auf der Oberfläche von Hepatozyten von zellassoziierten Heparansulfatproteoglykanen übernommen wird, an die HBV in einer L-Protein-abhängigen Art und Weise bindet. Der Viruseintritt wird so initialisiert¹⁶¹. Wie diese initiale Interaktion von DHBV mit der Leberzelle aussieht ist bis dato noch unverstanden. Zwar kann die Zellbindung des Virus ebenso durch das stark negativ geladene Harnstoffderivat Suramin gehemmt werden^{162,163} (siehe 2.4.1), im Gegensatz zu HBV findet aber keine analoge Glykosaminoglykan-abhängige Zellassoziation statt^{eigene unpublizierte Daten}.

Wie bei HBV stellt aber auch bei DHBV die pre-S-Region des großen Hüllproteins die Schlüsselkomponente bei der Rezeptorerkennung auf der Wirtszelle dar^{110,164,165}. Den ersten direkten Beweis für eine pre-S-abhängige Zellassoziation brachten Wettbewerbsstudien mit rekombinanten DHBV SVPs, welche nur das L- bzw. S-Hüllprotein enthielten. Nur die hydrophile pre-S Region des L-Proteins vermittelte dabei eine spezifische Interaktion mit der Wirtszelle⁹⁹. In Mutationsanalysen konnte dann die für die Rezeptorerkennung bzw. -bindung spezifische Subdomäne in pre-S identifiziert werden (Näheres dazu unter 2.5.2.3). Abbildung 1-7 gibt einen Überblick über die bereits determinierten und für diese Arbeit relevanten funktionellen Subdomänen in pre-S.

Der Hypothese folgend, dass pre-S als viraler Ligand einen zellulären Rezeptor bindet, identifizierten Kuroki *et al.* (1994) und Tong *et al.* (1995) unabhängig voneinander ein 180 kDa Glykoprotein, welches eine speziesspezifische und hochaffine Bindung an pre-S zeigte^{166,167}. Entencarboxypeptidase D (duCPD) bzw. gp180 ließ sich als Prototyp einer neuen Klasse regulatorischer, membrangebundener, basischer Carboxypeptidasen charakterisieren^{168,167}. duCPD ist ein Typ I Transmembranprotein und besteht aus den 3 Carboxypeptidase-E-homologen extrazellulären bzw. luminalen Tandemdomänen A, B und C, wobei nur die membrannächste Domäne, die C-Domäne, pre-S bindet (Abbildung 1-8), die Carboxypeptidase-Aktivität ist auf die Domänen A und B beschränkt. Dass sich die C-Domäne beim Vergleich verschiedener Spezies trotz allem hochkonserviert zeigt, weist auf eine wichtige Rolle als Bindepartner für einen pre-S-ähnlichen Faktor hin, entweder im sekretorischen Weg oder assoziiert auf der Zelloberfläche^{168,169,170,171}. Interessanterweise induziert die Ausbildung des pre-S/duCPD-Komplexes nicht nur im viralen Liganden sondern auch im Rezeptor eine Änderung der Konformation⁸³. Neueste Erkenntnisse aus Kristallisationsansätzen weisen darauf hin, dass es in Folge der Interaktion zu einer Trimerisierung des Komplexes kommt^{unpublizierte Daten unseres Labors}.

Wie durch Eng *et al.* (1999) gezeigt, ist der hochkonservierte zytoplasmatische C-Terminus der Peptidase essentiell für eine Lokalisation von duCPD im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und für den Transport zur Plasmamembran und zurück¹⁷². Außerdem ist dieser Bereich involviert in die Internalisierung des Virus über Endozytose und die Etablierung einer Infektion^{173,174}.

Die spezifische Interaktion von duCPD mit pre-S zeigt Eigenschaften auf, die man für einen zellulären Rezeptorkandidaten erwarten würde. An der pre-S/duCPD-Komplexbildung sind innerhalb von pre-S 2 Subdomänen beteiligt¹⁷¹: Die Aminosäurereste 86-115 sind essentiell und unverzichtbar für die Interaktion. Mutationen in diesem Abschnitt führen sowohl in Viren als auch in rekombinanten pre-S Peptiden zu einem Verlust der Rezeptorbindung, ein vollständiger Verlust der Infektiosität bzw. der Fähigkeit eine DHBV-Infektion zu kompetieren ist die Folge^{175,173,176,177}.

Der sich N-terminal anschließende Bereich bis aa 30 (aa 30-85) übernimmt bei der Komplexbildung eine stabilisierende Funktion (siehe Abbildung 1-7).

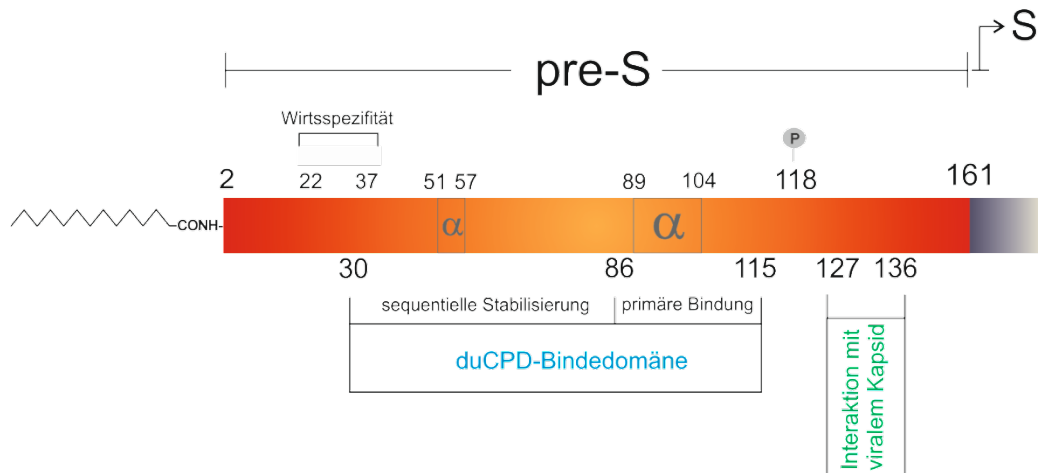


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung funktioneller pre-S Subdomänen im DHBV L-Protein.

Die duCPD-Bindestelle umfasst die Reste aa 30-115 und setzt sich aus einer den pre-S/duCPD-Komplex sequentiell stabilisierenden Region (aa 30-85) und einem für die Interaktion essentiellen Bereich (aa 86-115) zusammen. α -helikale Abschnitte (aa 51-57 und aa 89-104) der Subdomäne sind aufgezeigt. Essentiell wichtig für die Bildung neuer umhüllter Viruspartikel ist der Bereich zwischen aa 127 und aa 136. Des Weiteren dargestellte Determinanten: Myristoylrest an Gly2, Sequenzbereich, der die Wirtsspezifität zwischen DHBV und HHBV vermittelt (aa 22-37), Phosphorylierungsstelle an aa 118. Die S-Domäne schließt sich N-terminal an.

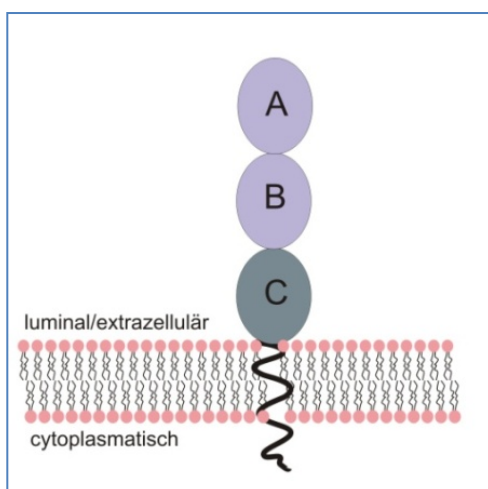


Abbildung 1-8 Schematische Präsentation von gp180/duCPD.

Dargestellt ist die Topologie des Transmembranproteins am TGN bzw. an der Plasmamembran. Die 3 homologen Domänen A, B und C sind luminal lokalisiert. Nur die C-Domäne der Peptidase interagiert mit DHBV pre-S.

Es gibt zahlreiche weitere Beobachtungen, die die bedeutsame Rolle von duCPD für eine produktive DHBV-Infektion unterstützen: (i) Die Expression von duCPD in nicht-suszeptiblen Zellen resultiert in einer selektiven Bindung und Aufnahme viraler Partikel¹⁷³; (ii) Lösliche Varianten sowohl von duCPD (sduCPD, *s* = *soluble*) als auch nur von der C-Domäne^{173,178}, sowie (iii) Antikörper gegen natives duCPD inhibieren effizient eine DHBV-Infektion¹⁷¹; (iv) Zusätzlich wird duCPD in infizierten PDHs *in vitro* und *in vivo* in einer L-Protein-abhängigen Weise herabreguliert^{179,180}.

Andere Daten wiederum stellen die Funktion von duCPD als alleinigen Binde- und Aufnahmerezeptor für DHBV in Frage: (i) Heterolog exprimiertes duCPD vermittelt zwar die Aufnahme viraler Partikel in nicht-permissive Zelllinien, eine duCPD-vermittelte Suszeptibilität der Zellen resultiert daraus aber nicht^{173,181}. (ii) In Wettbewerbsstudien zeigte sich das DHBV pre-S Peptid Dpre-S2-41^{myr} in der Lage eine DHBV-Infektion zu inhibieren, ohne die duCPD-Bindedomäne (aa 30-115) zu enthalten¹⁸², und (iii) obwohl das verwandte HHBV nur äußerst schlecht PDHs und keine Enten infiziert, bindet Heron HBV pre-S ebenfalls an duCPD und inhibiert zusätzlich sehr effizient eine DHBV-Infektion^{24,176,175}. Folglich kann die Carboxypeptidase alleine die Wirtsspezifität nicht erklären. Für eine produktive DHBV-Infektion weist dies auf eine Beteiligung weiterer Faktoren (z.B. wirtsspezifischer Korezeptor, Proteasen) hin.

Auch der Aufnahmeweg von DHBV in seine Wirtszelle ist noch nicht eindeutig aufgeklärt. Dass sowohl die Verwendung Energie-depletierender Agenzien als auch eine Expression Endozytose-defizienter duCPD-Mutanten eine produktive DHBV-Infektion verhindern demonstriert, dass DHBV nach der Interaktion mit duCPD über endozytotische Transportwege in die Zelle gelangt^{183,173,174}. Chojnacki *et al.* gelang es, mittels einer hochsensitiven fluoreszenzmikroskopischen Methode DHBV-Partikel zu visualisieren und eindrücklich zu zeigen, dass die Passage viraler Partikel vom frühen zum späten Endosom für eine produktive Infektion erforderlich ist¹⁰⁰. Vorangehende Untersuchungen hatten bereits aufzeigen können, dass schon eine kurze Behandlung von Viruspartikeln mit einem milden pH von 6,5 eine drastische Konformationsänderung in L induziert. Die sonst verborgene hydrophobe TM-1-Domäne wird unter diesen Bedingungen an der Oberfläche der Partikel exponiert und könnte so als Fusionspeptid fungieren¹⁰¹. Anhand von L- und S-Mutanten mit reduzierter TM-1-Hydrophobizität wurde demonstriert, dass der hydrophobe Charakter von TM-1 in L, nicht aber in S, essentiell für die Infektiosität viraler Partikel ist und zwar zu einem Zeitpunkt nach Bindung des Rezeptors und Aufnahme des Virus in die Zelle. Die Daten von Chojnacki und anderen bestätigen zwar, dass ein niedriger pH für die DHBV-Infektion nicht strikt notwendig ist, zeigen aber auf, dass die Kinetik des Fusionsprozesses unter Bedingungen wie sie im späten Endosom vorherrschen, entscheidend beeinflusst werden könnte^{100,184}. Die Möglichkeit DHBV TM-1 durch analoge HBV-Sequenzen zu komplementieren, deutet auf einen für Hepadnaviren allgemeingültigen Fusionsmechanismus hin. Als einen weiteren und notwendigen Teilschritt im viralen Eintrittsmechanismus wird

außerdem die proteolytische Prozessierung von L bzw. pre-S kurz vor oder während des Fusionsprozesses vermutet (Näheres dazu unter Abschnitt 2.5.2)¹⁷⁷.

1.2.3 Ausschluss einer Superinfektion im Infektionszyklus von DHBV

Als Superinfektionsresistenz (SIR) wird der virusinduzierte Mechanismus bezeichnet, der sich nach der Primärinfektion in einer Zelle etabliert und eine weitere Infektion, d.h. eine Superinfektion (SI) derselben Zelle, durch ein homologes Virus ausschließt. Dieses Phänomen ist auch für DHBV mehrfach beschrieben worden^{185,186,187}. Protzer *et al.* zeigten beispielsweise, dass eine bereits etablierte DHBV-Infektion eine SI durch rekombinante DHBV-Partikel deutlich limitiert¹⁸⁸.

Die Herabregulierung der Rezeptorkomponente duCPD im Verlauf einer DHBV-Infektion wäre ein möglicher Erklärungsansatz für den zugrunde liegenden Mechanismus¹⁷⁹. Sowohl in DHBV-infizierten Entenlebern als auch in kultivierten und infizierten Hepatozyten sind deutlich reduzierte duCPD-Level nachweisbar. Zudem korrelieren diese verminderten Rezeptormengen eindeutig mit dem Ausmaß der Expression der viralen Genprodukte, wobei die alleinige Synthese von L ausreicht, um die Herabregulierung zu vermitteln. Die duCPD-Proteinsyntheserate ist davon *per se* nicht betroffen, allerdings resultiert eine unvollständige Prozessierung von duCPD, d.h. die Reifung der 170 kDa Vorstufe zum reifen 180 kDa Glykoprotein findet nicht mehr statt. Zusätzlich wirkt sich L fördernd auf den intrazellulären Abbau des Rezeptormoleküls aus. Mikroskopische Analysen zeigten, dass duCPD nicht länger im Golgi-Apparat lokalisiert ist, sondern in Assoziation mit L in einem perinukleären Kompartiment detektiert werden kann¹⁷⁹.

Tatsächlich konnten weiterführende Untersuchungen eindrücklich den Zusammenhang von L-Expression und dem Ausschluss einer SI demonstrieren: In PCR-basierten Analysen zeigten Walters und Kollegen, dass die Resistenz infizierter Hepatozyten gegenüber einer DHBV-SI, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, allein abhängig von der Expression von L ist¹⁸⁰. Überraschenderweise war in ihren Studien mutiertes L, welches nicht mehr mit duCPD interagieren konnte, ebenfalls in der Lage eine SI auszuschließen. Tendenziell argumentiert diese Beobachtung zwar in Richtung eines duCPD-unabhängigen SIR-Mechanismus, wie dieser aber funktioniert, welche Domäne in L diesem zugrunde liegt, falls es tatsächlich nicht die duCPD-Binderegion ist, und wie und wann L im Infektionszyklus die Blockade für eine SI induziert, war zu diesem Zeitpunkt noch unbeantwortet.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Superinfektion einer Leberzelle wird durch eine bereits etablierte DHBV-Infektion drastisch limitiert, der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings noch unverstanden. Zwar konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression des viralen L-Proteins ausreicht, um die zelluläre Resistenz gegenüber einer zweiten Infektion zu induzieren, welche Region des großen Hüllproteins diese Funktion übernimmt, wurde noch nicht bestimmt. Ziel dieser Arbeit war es, Determinanten in L zu identifizieren, welche die SIR bei DHBV verantworten. Primär sollte der Fokus auf definierte Subregionen in pre-S und ihre mögliche Rolle im SIR gerichtet werden. Die Myristoylierungs- und Phosphorylierungsstelle sowie der Bereich, der die Umhüllung von Kapsiden koordiniert, galt es in Mutationsanalysen gezielt zu adressieren. Um die postulierte duCPD-Unabhängigkeit der L-Protein-vermittelten SIR auf Einzelzellebene zu validieren (siehe 1.2.3), war auch die Rezeptor-Binderegion Bestandteil der Analyse. Den potentiell synergistischen Beitrag der S-Domäne von L galt es in der Studie ebenfalls zu berücksichtigen.

Der Einfluss der generierten L-Mutanten auf eine nachfolgende DHBV-Infektion wurde an Transgen-exprimierenden PDHs studiert. Für die Bewertung der Mutanten in ihrer Kompetenz eine Infektion zu limitieren, sowie einen quantitativen Vergleich dieser Kompetenzen, galt es im Vorfeld eine geeignete und valide Quantifizierungsmethode zu entwickeln. Ein hohes Maß an Genauigkeit und Sensitivität sollte durch eine Einzelzellanalyse garantiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten somit auf qualitative und gleichzeitig quantitative Weise Aufschluss über die Involvierung einzelner Sequenzelemente im L-Protein-vermittelten Infektionsausschluss geben.

2 Ergebnisse

Der Ausschluss einer SI wird bei einer DHBV-Infektion allein durch die Expression des großen Hüllproteins vermittelt. Mit dem Ziel, die dafür verantwortliche(n) Domäne(n) in L zu identifizieren, wurde L transgen in PDHs exprimiert und zunächst die Effizienz und Kinetik der heterologen L-Expression studiert und optimiert. Dies stellte die Grundlage dar, um im nächsten Schritt analytisch das Potential von L untersuchen zu können, restriktiv auf eine nachfolgende DHBV-Infektion zu wirken. Nachdem die Suszeptibilität L-exprimierender Zellkulturen quantitativ ermittelt worden war, konnte der Einfluss von L auf eine Überinfektion der Zellen mit DHBV auf Einzelzellebene gemessen werden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen boten eine fundierte Basis, um im Rahmen einer umfangreichen Mutationsanalyse die Kompetenz mutierter L-Proteine eine SI immer noch auszuschließen, quantitativ zu bewerten.

2.1 Klonierung, Nachweis und kinetische Analyse zur heterologen L-Expression

Für die heterologe Genexpression musste zunächst ein für PDHs geeignetes Expressionssystem gewählt werden. L wurde hierfür in ein virales Transduktionssystem kloniert und die Proteinexpression biochemisch sowie auf Einzelzellebene analysiert. Im Anschluss diente eine Analyse zur Kinetik der L-Expression der Etablierung der Versuchsbedingungen für die dann folgende quantitative Untersuchung der L-vermittelten Inhibition der DHBV-Infektion (Abschnitte 2.2 und 2.3).

2.1.1 Klonierung und Expressionsnachweis von Ad-DuL

Für die Expression von DHBV L in PDHs galt es ein Expressionssystem zu wählen, welches eine effiziente und über den gesamten Beobachtungszeitraum stabile Expression des Transgens erlaubt. Aufgrund der schlechten Transfizierbarkeit von PDHs wurde sich für ein adenovirales Transduktionssystem, basierend auf dem AdEasy-System (siehe 4.2.4), entschieden^{189,190}. Rekombinante Adenoviren erlauben eine hocheffiziente Transduktion primärer Hepatozyten^{174,191}. Das in Abbildung 2-1 dargestellte adenovirale Konstrukt wurde kloniert, wobei die Expression von L, als auch die des Reporterproteins GFP (*green fluorescent protein*), unter der Kontrolle separater CMV-Promotoren stand. Ein Konstrukt, welches nur für GFP kodierte diente als Kontrolle. Die an dieser Stelle generierten Viren werden im Folgenden nur als Ad-DuL bzw. Ad-GFP bezeichnet.

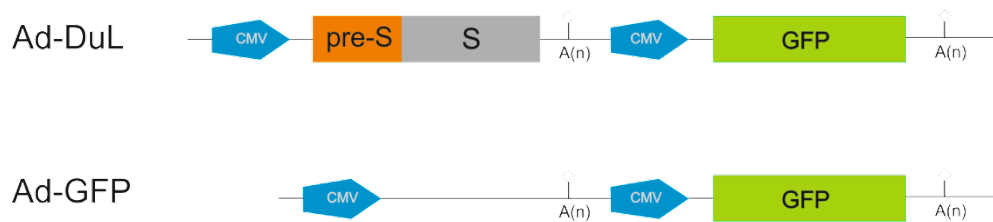


Abbildung 2-1 Schematischer Aufbau der Expressionskassetten für DHBV L und GFP im AdEasy-Vektor.

Ad-DuL kodiert neben dem DHBV L-Protein für GFP. Beide Gene stehen unter Kontrolle eines separaten Cytomegalovirus-Promotors (= CMV). Das Konstrukt Ad-GFP kodiert nur für das Reporterprotein. A(n) = poly-Adenylierungssignale.

Die aus der Transduktion von Hepatozyten resultierende Proteinexpression wurde im Western Blot und einer Immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse (IFA) nachgewiesen, GFP-positive Zellen wurden via Fluoreszenzmikroskopie detektiert und ausgezählt. Abbildung 2-2 und Abbildung 2-3 zeigen Ergebnisse der 3 Analysemethoden. Zwischen Tag 2 und 15 nach Transduktion (post Transduktion, p.Tr.) waren allgemein hohe Expressionslevel des L-Proteins im Western Blot (Abbildung 2-2 B) sowie des Reporterproteins im Mikroskop (Abbildung 2-2 A) nachweisbar. Abbildung 2-2 A zeigt das Ergebnis einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse von PDHs 15 Tage p.Tr.. Die Transduktionseffizienzen von mindestens 44 % (Ad-GFP) und 31 % (Ad-DuL) resultierten aus Inkubationen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 150 (Ad-GFP) bzw. 100 (Ad-DuL), wobei der Prozentsatz transduzierter Zellen und die Konzentration der entsprechenden Adenoviren eindeutig korrelierten (Faktor 1,5: MOI 150 → 100; Faktor 1,42: Transduktionseffizienz 44 % → 31 %). Im Immunoblot (Abbildung 2-2 B) wurde L wie erwartet mit einem Molekulargewicht von 35 kDa detektiert.

Um in Ad-DuL-transduzierten Zellen die Menge von L bzw. des Reporterproteins differenzierter beurteilen zu können, erfolgte noch ein spezifischer Nachweis auf GFP im Western Blot. Der MOI-bedingte Anstieg in der Transduktionseffizienz (Abbildung 2-2 A, Ad-DuL[1] = 21 %, Ad-DuL[2]=31 % → Faktor 1,48 Anstieg Transduktion) ließ sich hierbei auf Proteinebene bestätigen: Bei jeweils analogen Ausgangsmengen von L bzw. GFP in Ad-DuL[1] ergab die Quantifizierung pre-S- bzw. GFP-spezifischer Proteinbanden, dass ein Anstieg der Viruskonzentration (Ad-DuL[1] → Ad-DuL[2]) zu einem analogen Anstieg der Expression von L sowie des Reporterproteins führte (Faktor 1,2) (Abbildung 2-2 B, Spur 3 und 4, Quantifizierung nicht gezeigt). Der biochemische Nachweis der Transgenexpression

wurde um eine Untersuchung auf Einzelzellebene ergänzt (Abbildung 2-2). Mikroskopisch ließ sich in Ad-DuL-transduzierten Zellen eindeutig nachweisen, dass GFP-positive Zellen ebenfalls positiv für die Expression des Hüllproteins waren. In allen GFP-positiven Zellen konnte L mit einem S-spezifischen Antikörper detektiert werden. Der Nachweis mit einem α -pre-S Antikörper verifizizierte das Ergebnis. Das Resultat aus der Western Blot Analyse (siehe oben) findet hier Bestätigung.

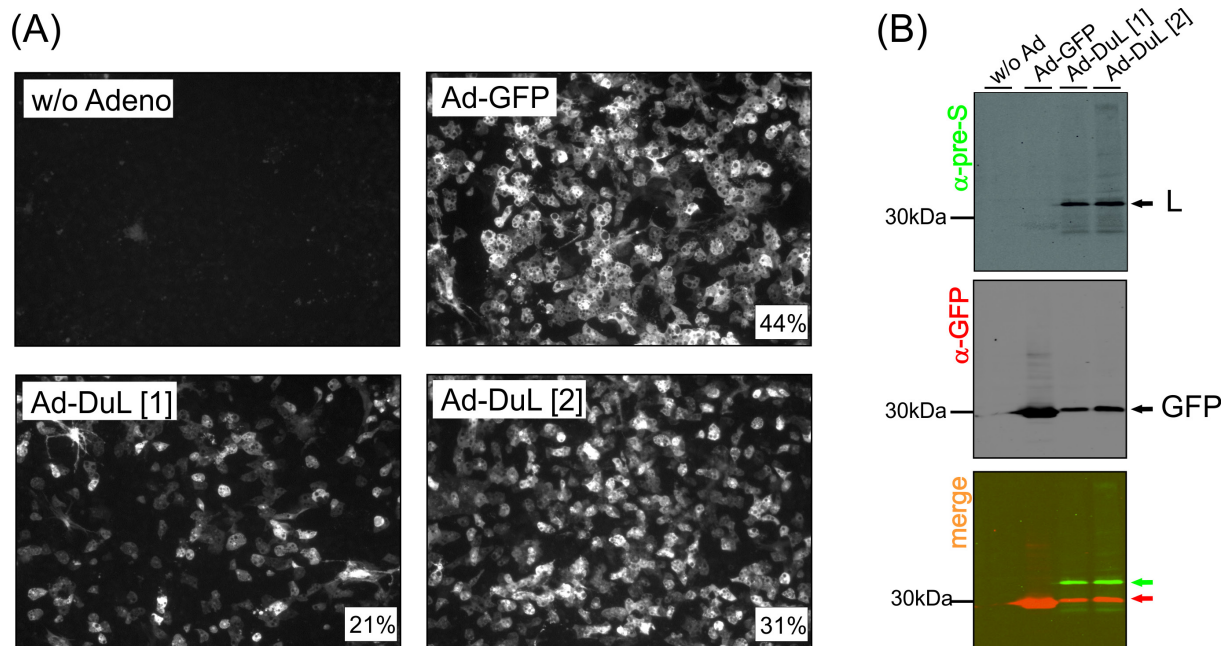


Abbildung 2-2 Detektion der Expression von L und GFP in transduzierten PDHs.

(A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Reportergenexpression in Ad-GFP- bzw. Ad-DuL-transduzierten PDHs nach 15 Tagen. PDHs wurden mit rekombinanten Adenoviren transduziert. Für Ad-DuL-transduzierte PDHs sind 2, für Ad-GFP-transduzierte Zellen ist eine exemplarische mikroskopische Aufnahme gezeigt (Vergrößerung: 100-fach). Transduktionseffizienzen (weiße Kästchen) von 44 % für Ad-GFP und 31 % Ad-DuL resultieren aus MOIs von 150 (Ad-GFP) bzw. 100 (Ad-DuL). Nicht-transduzierte PDHs (w/o Adeno) dienen als Kontrolle. (B) Zu (A) korrespondierende Expressionsanalyse im Western Blot. Die L- bzw. GFP-Expression wurde mit einem α -pre-S- (oben) und einem α -GFP (Mitte)-Antikörper detektiert. Die Zweitantikörper lagen Fluorophor-gekoppelt vor. Mit 35 (L) bzw. 27 kDa (GFP) entspricht das Laufverhalten der Proteine jeweils den Erwartungen. Die übereinander gelagerte Darstellung (*merge*) zeigt die Größen- und quantitativen Unterschiede beider Proteine.

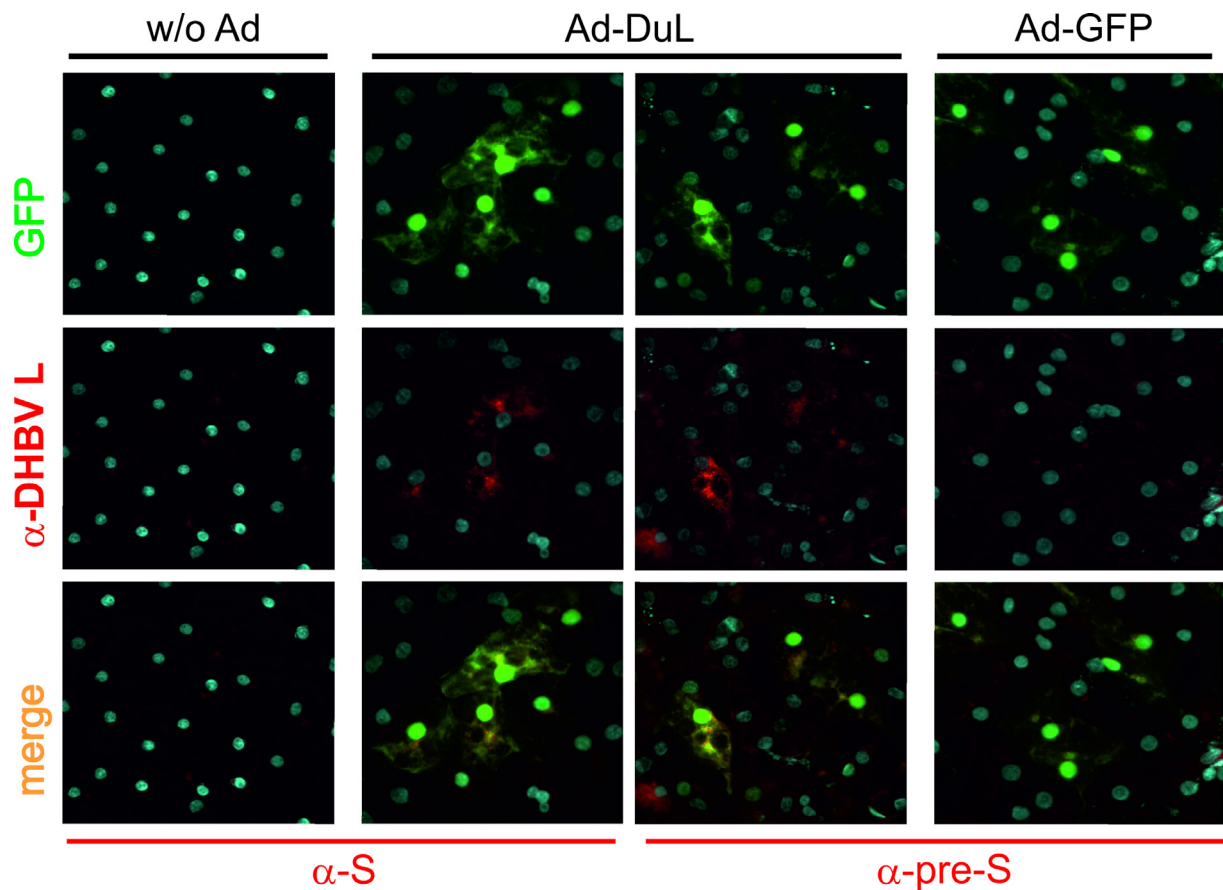


Abbildung 2-3 Koexpression von L und GFP in Ad-DuL-transduzierten PDHs.

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der L-Proteinexpression in PDHs 4 Tage p.Tr. mit monoklonalen α -pre-S- und α -S-Erstantikörpern. Die Zweitantikörper waren Alexa546-gekoppelt (rot). Untransduzierte (w/o Ad) und Ad-GFP transduzierte PDHs dienten als Kontrollen. Die jeweils entsprechende GFP-Fluoreszenz (grün) sowie übereinander gelagerte Darstellungen (*merge*, gelb) sind ebenfalls gezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau) (Vergrößerung: 200-fach).

Zusammengefasst ließ sich feststellen, dass sich PDHs mit dem gewählten Expressionssystem effizient und reproduzierbar transduzieren ließen und die Methodik war somit geeignet für weiterführende Untersuchungen. Da in Ad-DuL-transduzierten Zellen die Expression von L eindeutig mit der Reportergenexpression korrelierte, wurde in den nachfolgenden Analysen auf Einzelzellebene auf einen separaten Nachweis von L verzichtet und nur die Expression des Reporters berücksichtigt bzw. quantifiziert.

2.1.2 Analyse zur Kinetik der L-Expression in Hepatozyten

Für eine Untersuchung der Kinetik der L-Expression wurden PDHs zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transduktion lysiert und im Western Blot untersucht. Dies sollte sowohl eine Abschätzung der intrazellulären Menge als auch der Stabilität von L zu einem gegebenen Zeitpunkt im Versuchsablauf erlauben. Ziel war es die optimalen Bedingungen für eine

Überinfektion transduzierter Zellen mit DHBV festzulegen. Schematisch ist der Versuchsablauf in Abbildung 2-4 A präsentiert.

Das Ergebnis zeigt, dass bereits 8 h p.Tr. (Abbildung 2-4 B, Spur 3) eine spezifische Detektion des L-Proteins (P35) möglich war. In analogen Untersuchungen ließ sich dies reproduzieren bzw. es zeigte sich, dass das L-Protein via Immunoblot und die korrespondierende Reportergenexpression via Fluoreszenzmikroskopie spätestens 12 h p.Tr. nachweisbar waren. Nach 72 h tauchte neben der 35 kDa-L-Spezies eine weitere L-spezifische Bande auf, welche der phosphorylierten Variante von L mit einem apparenten Molekulargewicht von 36 kDa (P36) entspricht¹⁹².

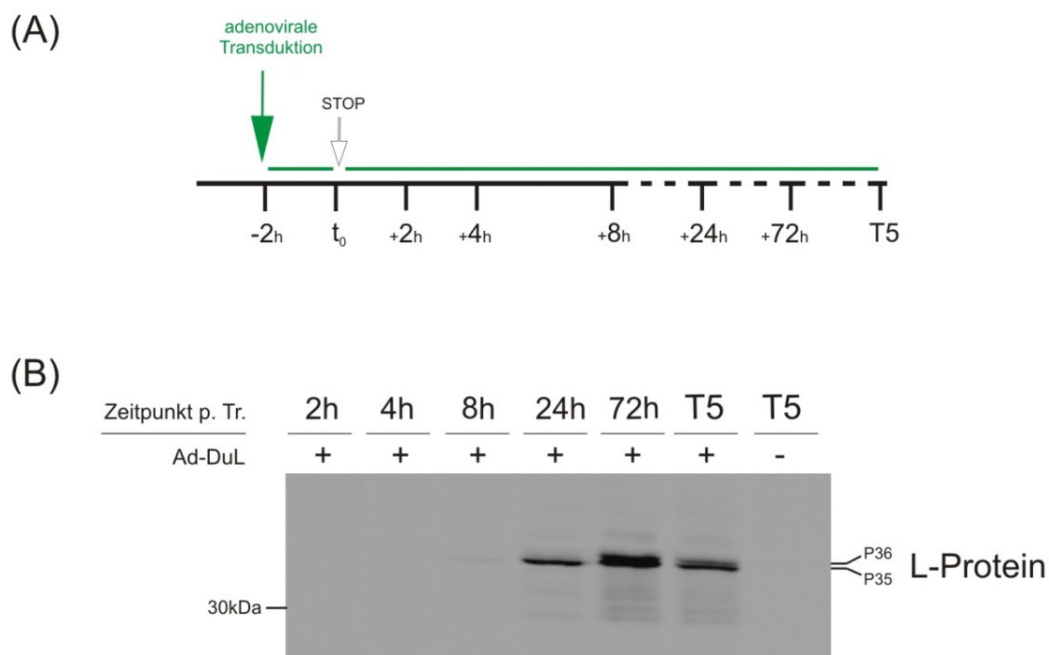


Abbildung 2-4 Kinetik der L-Proteinexpression in PDHs.

(A) Schema zum zeitlichen Ablauf der Kinetik-Studie. PDHs wurden für 2 Stunden mit L-kodierenden Adenoviren inkubiert. Die Transduktionseffizienz lag bei $\geq 44\%$. Nach Beendigung der Inkubation durch Waschen der Zellen (STOP), wurden die Hepatozyten zu den aufgezeigten Zeitpunkten zwischen 2 Stunden (2 h) und 5 Tagen (T5) p.Tr. lysiert und einer Western Blot Analyse unterzogen (B). Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen α -pre-S Antikörper. Neben transduzierten Zellen (+) wurden auch Lysate untransduzierter Zellen (-) auf mögliche Kreuzreaktionen der Antikörper hin getestet.

Die Quantifizierung der Proteinmengen ergab folgendes Ergebnis: Zwischen 8 und 24 h p.Tr. stieg die Menge an L um das 20- bis 30-fache an. Bis 72 h p.Tr. war eine weitere, aber deutlich geringere Zunahme messbar (Faktor 2,5). Ab diesem Zeitpunkt sank das Level wieder leicht ab (Faktor 2 gegenüber dem Maximum). Zum einen ist dies mit der begrenzten

Überlebensdauer primärer Hepatozyten in der Zellkultur zu erklären. Zum anderen lässt die Replikationsdefizienz der Adenoviren eine zeitlich limitierte Genexpression erwarten.

Um in den nachfolgenden Experimenten die Rolle der L-Expression auf eine DHBV-Infektion bzw. -Superinfektion zu untersuchen, wurden PDHs 2 Tage vor einer Infektion unter den hier etablierten Bedingungen transduziert. Zum Zeitpunkt der Überinfektion mit DHBV sollte so ein optimales Expressionslevel des Transgens gewährleistet sein.

2.2 Quantitative Studie zum Einfluss von L auf die Infektionseffizienz von DHBV

Bevor die Superinfizierbarkeit der einzelnen L-exprimierenden Hepatozyte untersucht wurde (Abschnitt 2.3), galt es die Auswirkungen von L auf die absolute Suszeptibilität von PDHs für eine DHBV-Infektion zu ermitteln. Mit der transgenen L-Expression wurde folglich eine produktive DHBV-Infektion von PDHs simuliert. Im nächsten Schritt wurden diese Zellen mit DHBV-haltigem Serum überinfiziert und die resultierende Infektionseffizienz analysiert. Eine Untersuchung in Form einer Titrationsanalyse sollte dabei quantitativ den Zusammenhang zwischen der Anzahl L-exprimierender Zellen und der Infizierbarkeit einer entsprechenden Zellkultur aufzeigen. Durch Auszählung GFP-positiver Hepatozyten wurden die Transduktionseffizienzen ermittelt, die Quantifizierung DHBV Core-positiver Zellen ließ Rückschluss auf die entsprechende Infektionseffizienz zu.

Es ist zu beachten, dass Doppelinfektionen mit den rekombinanten Adenoviren und DHBV (GFP- und gleichzeitig Core-positive Zellen) in dieser Auswertung noch nicht berücksichtigt wurden.

2.2.1 Versuchsaufbau und Quantifizierung der Infektionskontrollen

PDHs wurden anlehnend an 2.1.2 und wie in Abbildung 2-5 schematisch präsentiert, mit unterschiedlichen Mengen rekombinanter Adenoviren ($[C] < [B] < [A]$) transduziert und 2 Tage später mit DHBV-haltigem Serum in ansteigender Konzentration ($[1] < [2] < [3]$) überinfiziert. Der DHBV-Titer wird im Folgenden in Genomäquivalenten pro Zelle (*genome equivalents*, GE/Zelle) angegeben. Um in zukünftigen Untersuchungen einen möglichen Einfluss der adenoviralen Transduktion *per se* bzw. der Expression des Reporterproteins GFP auf eine DHBV-Infektion ausschließen zu können, wurden Ad-GFP-transduzierte PDHs mitgeführt. Die gewählten MOIs für Ad-GFP lagen im Versuch deutlich höher als die von Ad-DuL (Abbildung 2-5 B), ein GFP-vermittelter und dabei potentiell negativer Effekt sollte so sicher feststellbar sein. Als Infektionskontrollen dienten untransduzierte aber infizierte Hepatozyten. Da Ad-GFP und Ad-DuL auf 2 separate Zellkulturplatten titriert wurden,

wurden die Infektionskontrollen auf beiden Platten mitgeführt. Ein Vergleich der Infektionsraten sollte Auskunft zur Schwankungsbreite in der Qualität der Zellen, welche aus einer Leber präpariert aber auf unterschiedlichen Kulturschalen ausgesät wurden, geben. Die via IFA detektierten Infektionsereignisse in den Kontrollen wurden ausgezählt, exemplarische Bilder sind in Abbildung 2-6 A und B (jeweils linke Reihe), die Graphiken zur statistischen Auswertung der Kontrollen sind in Abbildung 2-7 präsentiert, die Daten befinden sich im Anhang (5.1) der Arbeit.

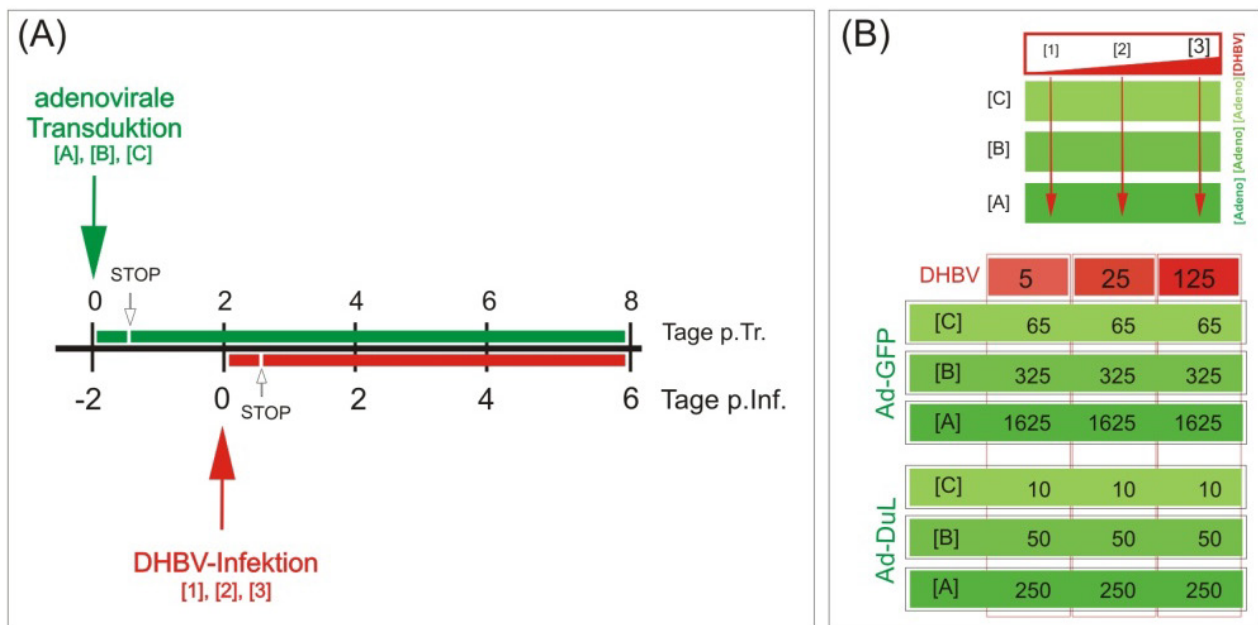


Abbildung 2-5 Titrationanalyse zur Abhängigkeit der Infizierbarkeit von PDHs von der Quantität L- bzw. GFP- exprimierender Zellen.

(A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. PDHs wurden auf 12-well Platten mit je 3 unterschiedlichen Konzentrationen Adenoviren (Ad-GFP oder Ad-DuL) inkubiert ([C] < [B] < [A]). 2 Tage später wurden die transduzierten PDHs mit verschiedenen Mengen DHBV ([1] < [2] < [3]) überinfiziert. 8 Tage p.Tr. bzw. 6 Tage nach DHBV-Infektion (p.Inf.) wurden die Zellen einer IFA unterzogen. (B) (Oben) Schematische Präsentation der in Abhängigkeit voneinander eingesetzten Virusmengen. (Unten) Tabellarische Auflistung der genauen MOIs (grün) bzw. Genomäquivalente pro Zelle (GE/Zelle) (rot). [A] stellt mit einer MOI von 1625 (Ad-GFP) bzw. 250 (Ad-DuL) die höchste Adenovirus-Konzentration. Konzentration DHBV: [1]= 5, [2]= 25 und [3]= 125 GE/Zelle. Für jeden Ansatz wurden 3-10 mikroskopische Bilder quantitativ ausgewertet, entsprechend einer durchschnittlichen Gesamtzellzahl von 960 Zellen pro Ansatz (bzw. 165 Zellen pro Bild).

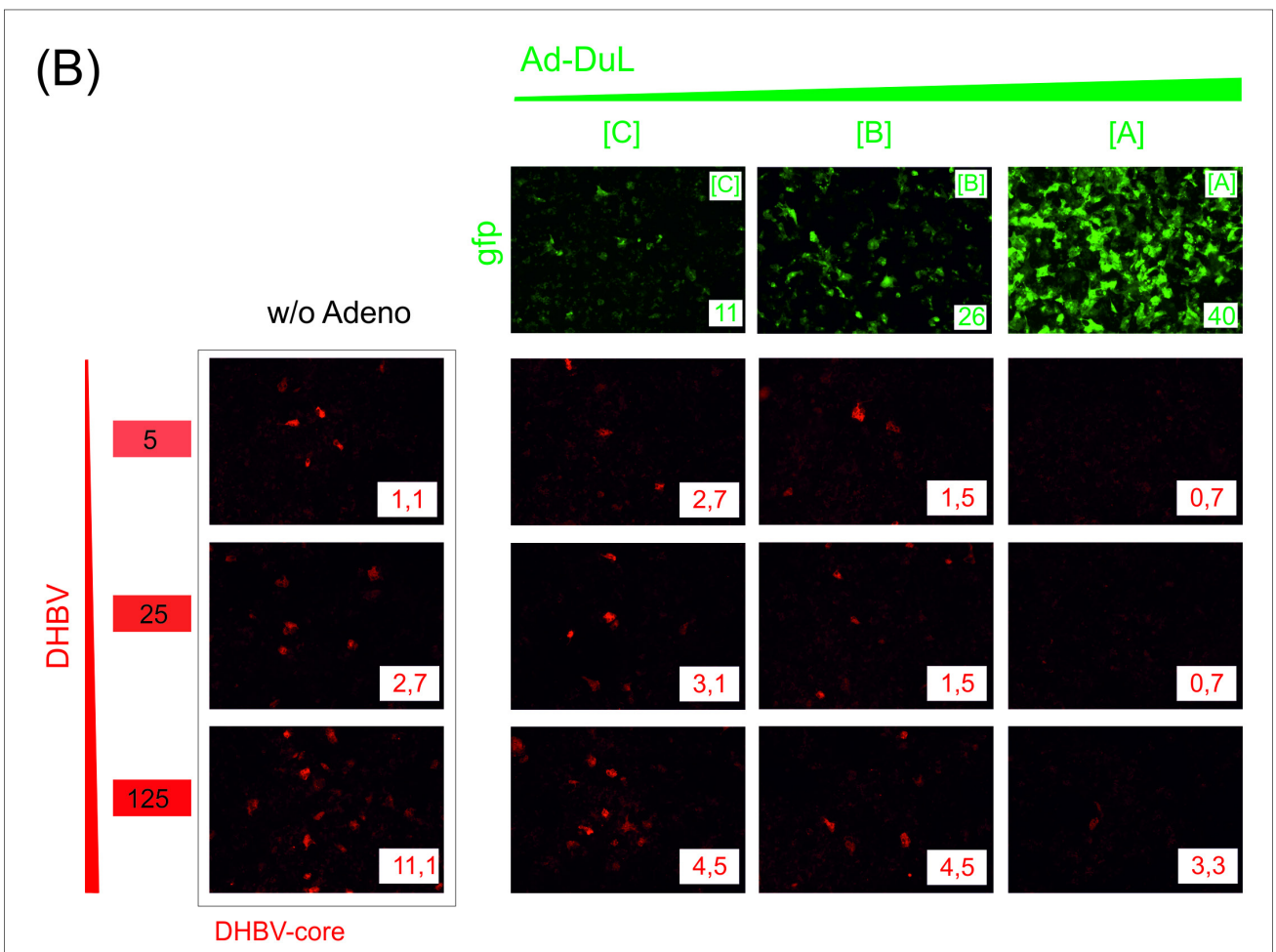
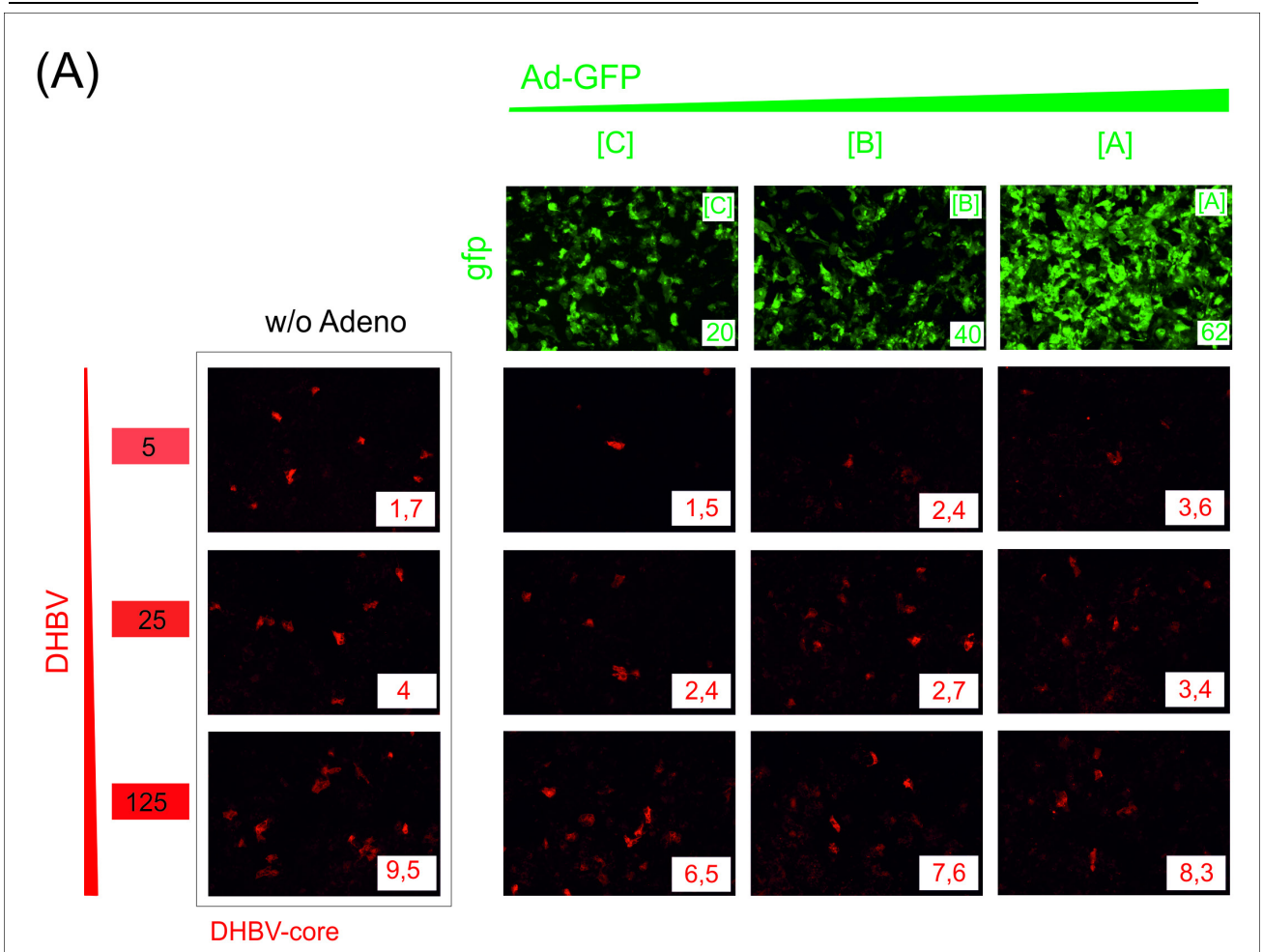


Abbildung 2-6 Die Expression von L, nicht aber die des Reporterproteins oder die adenovirale Transduktion, limitiert signifikant die Infizierbarkeit von PDHs.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Ad-GFP- (A) bzw. Ad-DuL- (B) transduzierten und überinfizierten PDHs. Für den Versuchsaufbau siehe Abbildung 2-5. DHBV-infizierte Zellen (MOI 5, 25 und 125) wurden mit einem α -DHBV-Core Primärantikörper und einem Alexa-konjugierten Zweitantikörper detektiert (rot). Bilder in der ersten Spalte repräsentieren die Infektionskontrollen (DHBV-infizierte, untransduzierte Zellen). Die Detektion von GFP erfolgte parallel durch Fluoreszenzanalyse (grün), exemplarisch sind für alle Adenovirus-Konzentrationen ($[C]$ - $[A]$) GFP-Fluoreszenzbilder dargestellt (Vergrößerung: 100-fach). Als Zahlen in Kästchen sind die mittleren Infektions- (rot) bzw. Transduktionseffizienzen (grün) angegeben.

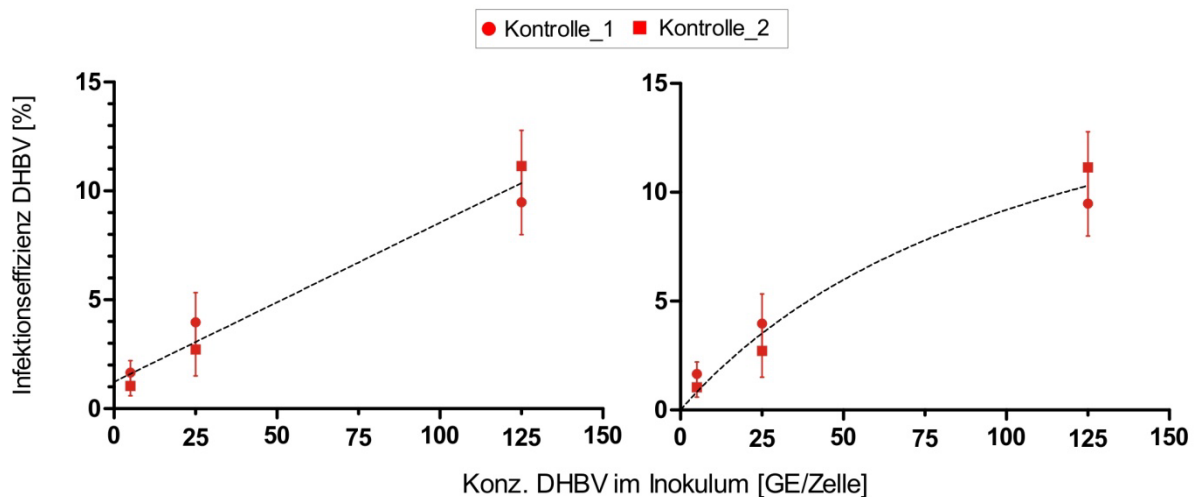


Abbildung 2-7 Die Suszeptibilität von PDHs einer Zellcharge weist keine signifikanten Schwankungen auf.

Graphisch präsentiert sind die Infektionseffizienzen von 2 unabhängigen Kontrollansätzen (untransduziert, DHBV-infiziert) in Abhängigkeit von der DHBV-Konzentration im Inokulum. Die dazu gehörende IFA ist in Abbildung 2-6 gezeigt. PDHs wurden mit 5, 25 bzw. 125 DHBV GE/Zelle infiziert, Core-positive Zellen wurden durch Auszählen ermittelt. Für jeden Ansatz (z.B. 5 GE/Zelle) wurden 3-5 mikroskopische Bilder quantitativ ausgewertet, was einer durchschnittlichen Gesamtzellzahl von 750 Zellen pro Ansatz entspricht. Die Auswertung resultiert jeweils aus Einzelansätzen (1x12-well), die Zellen (Kontrolle_1 bzw. 2) waren aus einer Charge, befanden sich aber auf unterschiedlichen Kulturschalen. (Links) Gemeinsame lineare Regression der Infektionskontrollen. Da beim Vergleich der beiden einzelnen Regressionen keine signifikante Abweichung in der Steigung ($P=0,12$) ausgewiesen wurde, ist das Abhängigkeitsverhältnis von Infektionseffizienz und Titer besser in Form einer gemeinsamen Regressionsgerade, anstelle von 2 separaten Geraden, zu beschreiben. (Rechts) Nicht-lineare Regression zu den Verläufen. Auch hier wies die Analyse eine gemeinsame Regression als präferiertes Modell aus.

Die statistische Analyse zu den Infektionskontrollen (Abbildung 2-7), welche aus der Auszählung DHBV-infizierter Zellen auf beiden Schalen resultierte (Abbildung 2-6 A und B, w/o Adeno), wies eindeutig aus, dass sich beide Datensätze (Kontrolle_1 und Kontrolle_2) nicht signifikant unterschieden und eine gemeinsame Regression zur Beschreibung des Infektionsverlaufs an dieser Stelle legitim und sinnvoll war (statistische Auswertung unter 5.1.1). Die erkennbare aber geringe Variation in der Zunahme infizierter Zellen mit stetig ansteigenden Mengen DHBV im Inokulum (siehe ermittelte Infektionseffizienzen in Abbildung 2-6) stellte folglich keine signifikante Abweichung von der Linearität dar. Im Mittel waren nach einer Infektion mit 5 GE/Zelle 1,3 % der Zellen infiziert, mit 25 GE/Zelle waren es 3,3 %. 10,3 % der Hepatozyten waren nach einer Inokulation mit 125 GE/Zelle positiv für eine DHBV-Infektion. Die Beschreibung der Daten mit einer nicht-linearen Regression (Abbildung 2-7, rechte Graphik) zeigt, dass sich die Infizierbarkeit der Zellen mit zunehmender Menge DHBV im Inokulum an einen Bereich der Sättigung annähert.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Suszeptibilität von PDHs einer Charge gegenüber einer DHBV-Infektion systembedingt zwar kleineren, aber keinen signifikanten Schwankungen unterliegt. Dies wiederum machte im nächsten Schritt den Bezug der Infektionsraten Ad-GFP- bzw. Ad-DuL-transduzierter Zellkulturen zur jeweiligen Kontrollinfektion zulässig.

2.2.2 Infizierbarkeit von Ad-GFP-transduzierten Zellkulturen

Mit ansteigendem Titer Ad-GFP (Abbildung 2-6 A, Bilder obere Reihe, [C]→ [B]→[[A]) ergab die Detektion und Quantifizierung GFP-exprimierender PDHs eine nahezu lineare Zunahme GFP-positiver Zellen ([C]→[B] = Faktor 2 und [B]→[A] = Faktor 1,55). Die Rate DHBV-infizierter PDHs dieser transduzierten Zellkulturen (Abbildung 2-6 A, Bilder Reihen 2-4) fiel mit ansteigendem Adenovirustiter auf den ersten Blick tendenziell geringer aus, als die der entsprechenden untransduzierten Kontrollen (Abbildung 2-6, Bilder linke Reihe). Bei näherer Betrachtung zeigte sich jedoch, dass die Infektionsraten bei mittlerer bzw. höchster DHBV-Konzentration (25 bzw. 125 GE/Zelle) und gleichzeitig niedrigster Transduktionsrate ([C] = 20%) im direkten Vergleich am stärksten von den Kontrollen abwichen (Kontrolle_{25 GE/Zelle} = 4 %, [C]_{25 GE/Zelle} = 2,4 % → Faktor 1,7; Kontrolle_{125 GE/Zelle} = 9,5 %, [C]_{125 GE/Zelle} = 6,5 % → Faktor 1,5). Bei der im Versuch höchsten Transduktionseffizienz ([A] = 62 %) waren die Abweichungen geringer (Kontrolle_{25 GE/Zelle} = 4 %, [A]_{25 GE/Zelle} = 3,4 % → Faktor 0,85 bzw. Kontrolle_{125 GE/Zelle} = 9,5 %, [A]_{125 GE/Zelle} = 8,3 % → Faktor 0,9).

Die graphische Auswertung und Regressionsanalyse dieser Quantifizierung belegt dazu eindeutig, dass die Infizierbarkeit Ad-GFP-transduzierter Zellkulturen mit DHBV nicht von der Suszeptibilität untransduzierter Zellen abweicht (Ergebnisse zur Statistik sind tabellarisch unter 5.1.2 im Anhang der Arbeit präsentiert). Die graphische Darstellung zur resultierenden Infektionseffizienz in Abhängigkeit von der relativen Transduktionsrate ist in Abbildung 2-8 (Ad-GFP, Analyse_1) gezeigt und weist Folgendes aus: In allen 3 Titrationsreihen (Titer Adenoviren) steigt die Rate DHBV-infizierter Zellen systematisch mit dem verwendeten DHBV-Titer an. Für keine der Reihen war ein konzentrationsabhängiger Einfluss der Transduktionsrate auf die Infizierbarkeit der Zellkulturen bei gegebenem DHBV-Titer festzustellen. Dabei weichen die Titrationsreihen weder signifikant von einer Linearität ab, noch zeigt sich eine signifikante Abweichung von der Steigung $m = 0$. Die Unterschiede in den jeweiligen y-Verschiebungen der 3 Titrationsreihen (Infektionseffizienz DHBV) erwiesen sich hingegen als extrem signifikant. Die Reihen lassen sich jeweils mit einer gemeinsamen Regression beschreiben.

Zusammengefasst legen diese Ergebnisse dar, dass Ad-GFP keinen Einfluss auf die Suszeptibilität von PDHs für eine nachfolgende Infektion der Zellen mit DHBV hat. Die Untersuchung wurde analog auf Zellen aus einer anderen Leberzellpräparation wiederholt und das Resultat (Abbildung 2-8, Ad-GFP, Analyse_2) unterstreicht eindrücklich die statistische Relevanz der Daten und demonstriert die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die zu allen Versuchen mit Ad- L_{wt} (und später mit Ad- L_{mut}) jeweils parallel durchgeführte Transduktion der Zellen mit Ad-GFP, stellt diesen Ergebnissen zufolge eine geeignete Kontrolle dar.

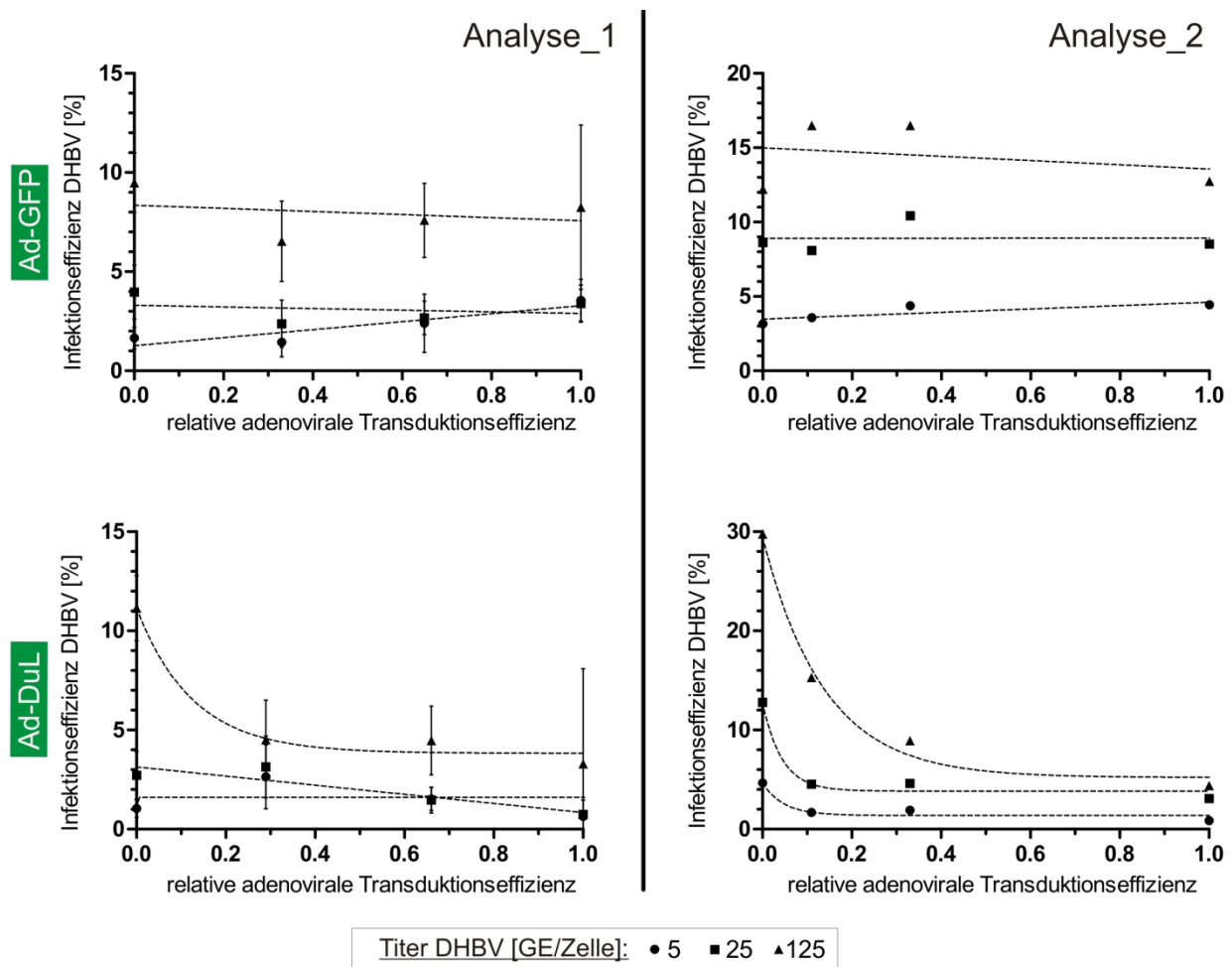


Abbildung 2-8 Die L-Expression beeinträchtigt konzentrationsabhängig eine nachfolgende Infektion.

(Ad-GFP Diagramme) Analyse_1: Graphische Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 2-6 A. Die genaue Versuchsdurchführung und virale Titer sind in Abbildung 2-5 gezeigt. Analyse_2: Ergebnis einer analog durchgeführten Analyse an Hepatozyten aus einer anderen Leberzellpräparation, eingesetzte Ad-GFP-MOIs: [C] = 250, [B] = 750 und [A] = 2250. Resultate beider Studien resultieren aus Einzelansätzen (1x12-well pro Parameterduo). Für Analyse_2 wurden jeweils 1100 Zellen ausgezählt. (Ad-DuL Diagramme) Analysen und Quantifizierungen erfolgten parallel und analog zur Ad-GFP-Studie. Analyse_1: Graphische Auswertung der IFA-basierten Auszählung aus Abbildung 2-6 (B). Eingesetzte Ad-DuL-MOIs in Analyse_2: [C] = 75, [B] = 225 und [A] = 675. Graphisch ist die jeweilige DHBV-Infektionseffizienz in Abhängigkeit zur relativen Transduktionseffizienz aufgetragen. Alle Reihen ließen sich jeweils durch eine gemeinsame Regression beschreiben.

2.2.3 Infizierbarkeit von Ad-DuL-transduzierten Zellkulturen

Die Auswirkung der Expression von L auf eine nachfolgende Infektion mit DHBV wurde quantitativ und analog zu der GFP-Kontrollstudie (siehe vorangehender Abschnitt) untersucht. Bilder der Fluoreszenzmikroskopischen Analyse sind in Abbildung 2-6 B, die graphische Darstellung der entsprechenden statistischen Auswertung (siehe 5.1.2) ist in

Abbildung 2-8 (Ad-DuL, Analyse_1) präsentiert. Auch hier ergab die Quantifizierung, dass mit ansteigendem Adenovirus-Titer (Abbildung 2-6 B, GFP-Fluoreszenz, Bilder obere Reihe) eine nahezu lineare Zunahme GFP-positiver Zellen ($[C] \rightarrow [B] = \text{Faktor } 2,4$ und $[B] \rightarrow [A] = \text{Faktor } 1,5$) resultierte. Mit der höchsten Virus-Konzentration im Inokulum ($[A]$) wurde eine Transduktionseffizienz von 40 % erreicht.

Die Auswirkung der heterologen L-Expression auf die Infizierbarkeit von PDHs (Abbildung 2-6 B, Bilder in Reihe 2-4) war bereits durch eine deutliche Abnahme positiver Infektionsereignisse im Mikroskop augenfällig und korrelierte dabei invers mit der Anzahl L-exprimierender Zellen. Eine steigende Anzahl transduzierter PDHs ($[C] \rightarrow [B] \rightarrow [A]$) ließ bei gleicher Menge DHBV im Inokulum eine stete Abnahme der Suszeptibilität der Zellkulturen für eine nachfolgende Infektion mit DHBV erkennen: Eine Transduktionsrate von 11 % ($[C]$) ließ die Effizienz nach Infektion mit 125 DHBV GE/Zelle im Vergleich zur Kontrollinfektion bereits um den Faktor 2,5 d.h. um 60 % sinken ($\text{Kontrolle}_{125 \text{ GE/Zelle}} = 11,1 \%$, $[C]_{125 \text{ GE/Zelle}} = 4,5 \%$). Ein weiterer Anstieg ließ die Rate DHBV-positiver Hepatozyten stetig weiter sinken ($\text{Kontrolle}_{25 \text{ GE/Zelle}} = 2,7 \%$, $[B]_{25 \text{ GE/Zelle}} = 1,5 \%$, $[A]_{25 \text{ GE/Zelle}} = 0,7 \%$). Exprimierten 40 % der Zellen in Kultur L ($[A]$), ging die Infektionseffizienz insgesamt um bis zu 70 % zurück (Faktor 3,4) ($\text{Kontrolle}_{125 \text{ GE/Zelle}} = 11,1 \%$, $[A]_{125 \text{ GE/Zelle}} = 3,3 \%$).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse (Abbildung 2-8, Ad-DuL, Analyse_1) bestätigte das Beobachtete, wobei der Unterschied zu der Ad-GFP Kontrollanalyse hierbei eindeutig zutage tritt. Besonders die Ergebnisse mit höchstem DHBV-Titer (125 GE/Zelle) spiegeln eindrücklich die negative Korrelation der Infektionseffizienz und der Zahl L-exprimierender Hepatozyten wider. Die Statistik wies für alle 3 DHBV-Konzentrationen eine Limitierung der Hepadnavirusinfektion aus, welche signifikant von der Menge L-exprimierender Zellen abhängig war (siehe 5.1.2). Am Resultat der analog durchgeführten zweiten Studie (Abbildung 2-8, Ad-DuL Analyse_2) war noch eindrucksvoller die kontinuierliche Abnahme detektierbarer Infektionsereignisse mit ansteigender Menge L-exprimierender Zellen zu erkennen. Auch ist dieses Phänomen in der wiederholten Analyse schon bei geringeren Mengen DHBV im Inokulum deutlich zu beobachten.

Die Suszeptibilität von Ad-DuL-transduzierten Zellkulturen stellt sich diesen Resultaten zufolge, als ein eindeutig von der Ad-DuL-Konzentration abhängiges, aber von der DHBV-Menge im Inokulum unabhängiges Phänomen dar. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde im nächsten Schritt überprüft, ob ein ebenso eindeutiger Zusammenhang zwischen der Infizierbarkeit Transgen-exprimierender PDHs und der Superinfizierbarkeit der einzelnen L-

exprimierenden Hepatozyte nachzuweisen ist und, falls ja, ob diese Beziehung quantitativ messbar ist.

2.3 Quantifizierung des Einflusses der L-Expression auf eine Superinfektion

Die unter 2.2 nachgewiesene negative Auswirkung der L-Proteinexpression auf eine nachfolgende DHBV-Infektion wurde in diesem Abschnitt der Arbeit unter dem Gesichtspunkt der Superinfizierbarkeit L-exprimierender Zellen näher untersucht. Zunächst galt es eine Quantifizierungsmethode auszuarbeiten, die eine valide Messung der Superinfektionsresistenz (SIR) einer bereits infizierten (in diesem Fall transduzierten) Zelle ermöglichte. Neben der Korrelation von Transduktions- und Infektionsrate kam somit an dieser Stelle die Superinfizierbarkeit der Zellen als dritter Parameter hinzu. Inwiefern die Kinetik der L-Expression mit dem Zeitpunkt einer einsetzenden SIR korreliert wurde ebenfalls untersucht.

2.3.1 Etablierung einer Methode zur Quantifizierung des L-vermittelten Infektionsausschluss

Für die sachkundige Beurteilung einer möglichen Korrelation von Infektions-, Transduktions- und Superinfektionsereignissen wurde der in Abbildung 2-9 dargestellte Versuchsaufbau ausgearbeitet und eine Methode zur quantitativen Auswertung der Messdaten etabliert. Analog zu den Analysen aus 2.2 wurden PDHs transduziert und überinfiziert und die Raten von adenoviraler Transduktion und DHBV-Infektion ermittelt.

Nach Erhebung dieser Parameter erfolgte durch Übereinanderlegen der mikroskopischen Bilder aus rotem und grünem Kanal eine Zählung der Zellen, die sowohl eindeutig positiv für die Expression des DHBV Core-Proteins als auch positiv für das Transgen (L und/oder GFP) identifiziert werden konnten. Nachfolgend wird diesbezüglich von doppelt- bzw. superinfizierten Zellen gesprochen. In der Regel wurden pro Versuchsansatz 10-20 mikroskopische Bilder für jedes Transgen ausgewertet. Die ermittelte Gesamtzellzahl lag dabei zwischen 100-300 Hepatozyten pro Bild. Abbildung 2-10 gibt einen Überblick über die ermittelten Parameter und Kalkulationen.

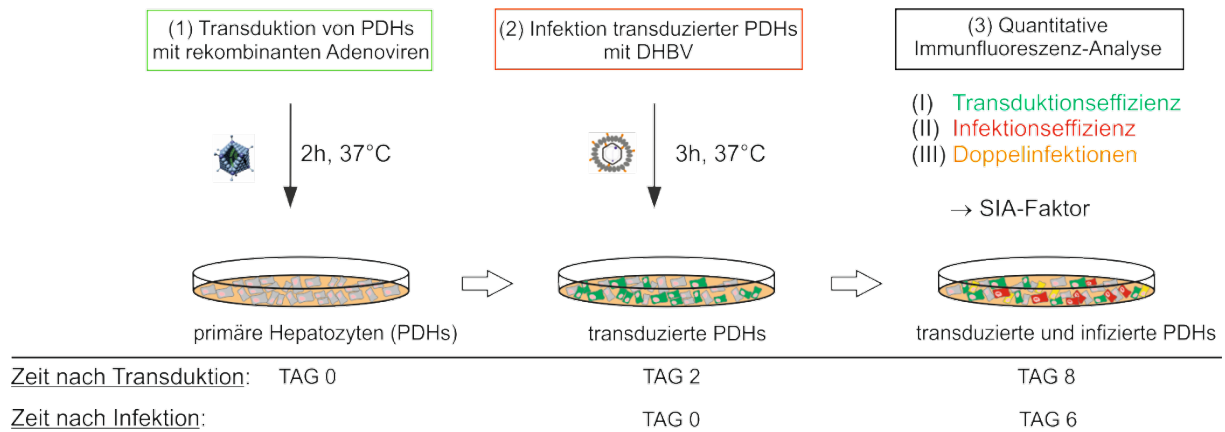


Abbildung 2-9 Versuchsaufbau zur quantitativen Analyse der Superinfizierbarkeit L-exprimierender PDHs.

PDHs wurden mit rekombinanten Adenoviren transduziert (Tag 0). 2 Tage p.Tr. erfolgte die Infektion mit DHBV (Tag 2 (bzw. Tag 0)). Die Inkubationszeiten mit den entsprechenden Viren sind aufgezeigt. 6 Tage p.Inf. wurden die Zellen einer quantitativen IFA unterzogen, wobei die aufgeführten Parameter I-III kalkuliert wurden. Durch Korrelation der ermittelten Parameter wurde der als *Superinfektions-Akzeptanz-Faktor* (= SIA-Faktor) definierte Faktor ermittelt (siehe Text und Abbildung 2-10).

Nach den einzelnen Quantifizierungen wurden (i) die Rate der erwarteten und (ii) die Rate der tatsächlich detektierbaren doppelt positiven Zellen berechnet. Bei Ermittlung der erwarteten Rate doppelt infizierter Hepatozyten ging man von der Annahme aus, dass, falls seitens der Expression des Transgens (GFP bzw. L) kein Einfluss (negativ oder positiv) auf die Superinfizierbarkeit einer Zelle ausgeht, eine transduzierte Zelle mit derselben Wahrscheinlichkeit mit DHBV infiziert werden kann wie eine untransduzierte Zelle.

Wenn die absolute Infektionsrate einer Hepatozytenkultur beispielsweise 0,05 beträgt (entspricht 5 % der Zellen), müssten die Infektionsraten der einzelnen Subpopulationen (transduzierte bzw. untransduzierte Zellen) in Kultur folglich ebenfalls 0,05 betragen.

Durch die Korrelation der jeweils korrespondierenden Raten wurde dann der *Superinfektions-Akzeptanz-Faktor* (=SIA-Faktor) definiert. Ein Faktor von 1 würde per Definition eine Rate tatsächlich superinfizierter Zellen widerspiegeln, die sich zu 100 % mit der erwarteten Rate superinfizierter Zellen deckt. Jeder kalkulierte SIA-Faktor Ad-DuL-exprimierender PDHs wurde final auf die entsprechende GFP-Kontrolle (Ad-GFP transduzierte und mit DHBV überinfizierte PDHs), die dabei 1 gesetzt wurde, normalisiert. Daraus resultierte der sogenannte SIA-Faktor_{Norm}. Per Definition spiegelt ein SIA-Faktor_{Norm} von 1 eine maximale Akzeptanz von Zellen für eine weitere Infektion, ein Faktor von 0 keine Akzeptanz bzw. eine

maximale Resistenz der Zellen gegenüber einer SI wider. Der SIA-Faktor von Transgen (L, S, oder L_{mut}) -exprimierenden Zellen erlaubte es, die transduzierten und überinfizierten Zellen mit einem definierten SIA-Phänotyp zu beschreiben und ermöglichte damit einen quantitativen Vergleich der Phänotypen.

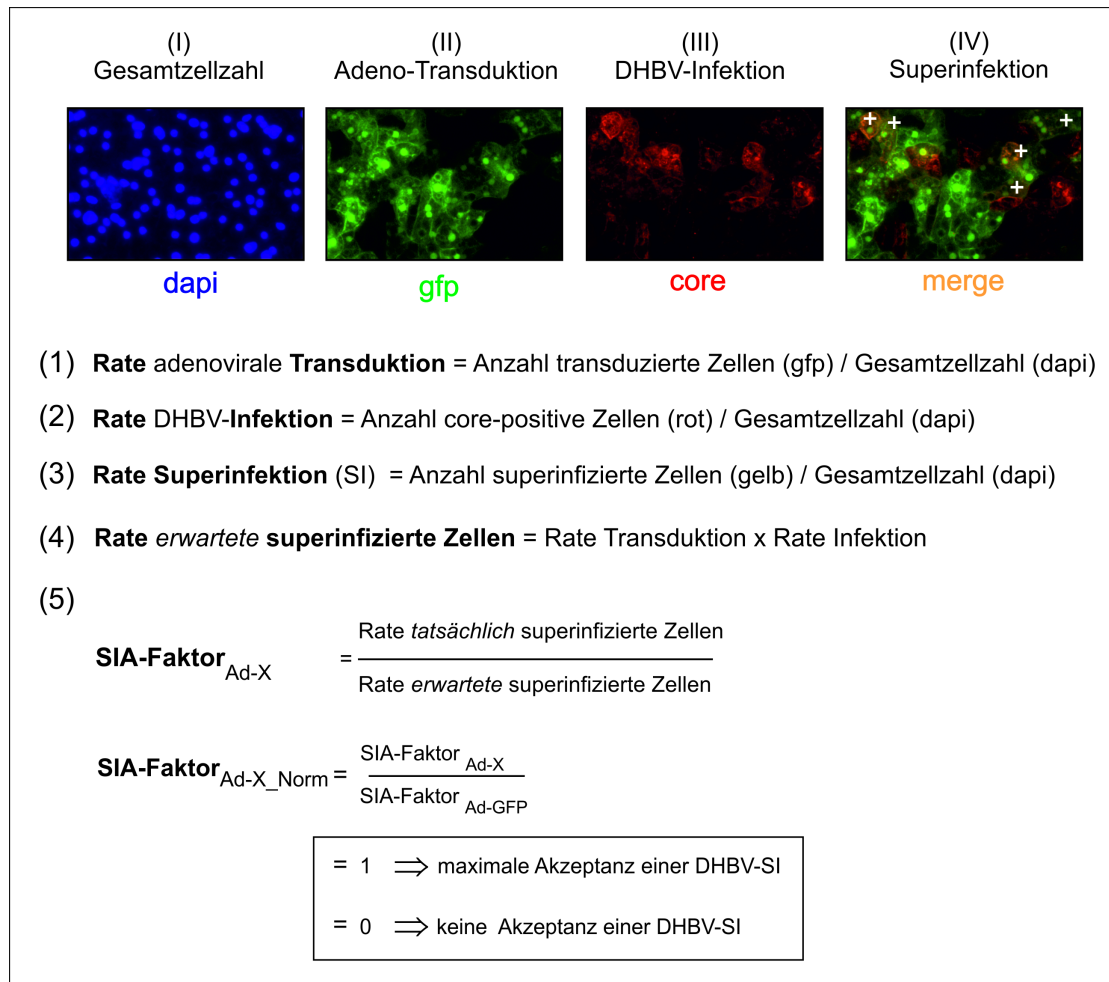


Abbildung 2-10 Etablierung einer Methode zur Quantifizierung DHBV-superinfizierter PDHs.

Die transduzierten und infizierten Zellen wurden nach den unter 4.5 beschriebenen Angaben für eine IFA präpariert. In jedem Ansatz wurden die Parameter I-IV ermittelt. Doppelt infizierte Hepatozyten (IV) wurden durch Übereinanderlegen (= *merge*) der mikroskopischen Bilder aus II und III identifiziert und quantifiziert (3). Exemplarisch sind in den mikroskopischen Aufnahmen superinfizierte Zellen mit weißen Kreuzen (+) markiert. Durch Korrelation der Raten tatsächlich superinfizierter Zellen (3) und erwartet superinfizierter Zellen (4) wurde der *Superinfektions-Akzeptanz-Faktor* (= SIA-Faktor) für transduzierte (allgemein: Ad-X) PDHs ermittelt (5). $\text{SIA-Faktor}_{\text{Ad-X}_{\text{Norm}}}$ beschreibt den auf die jeweilige Kontrolle (Ad-GFP-transduzierte und mit DHBV infizierte PDHs) normalisierten SIA-Faktor.

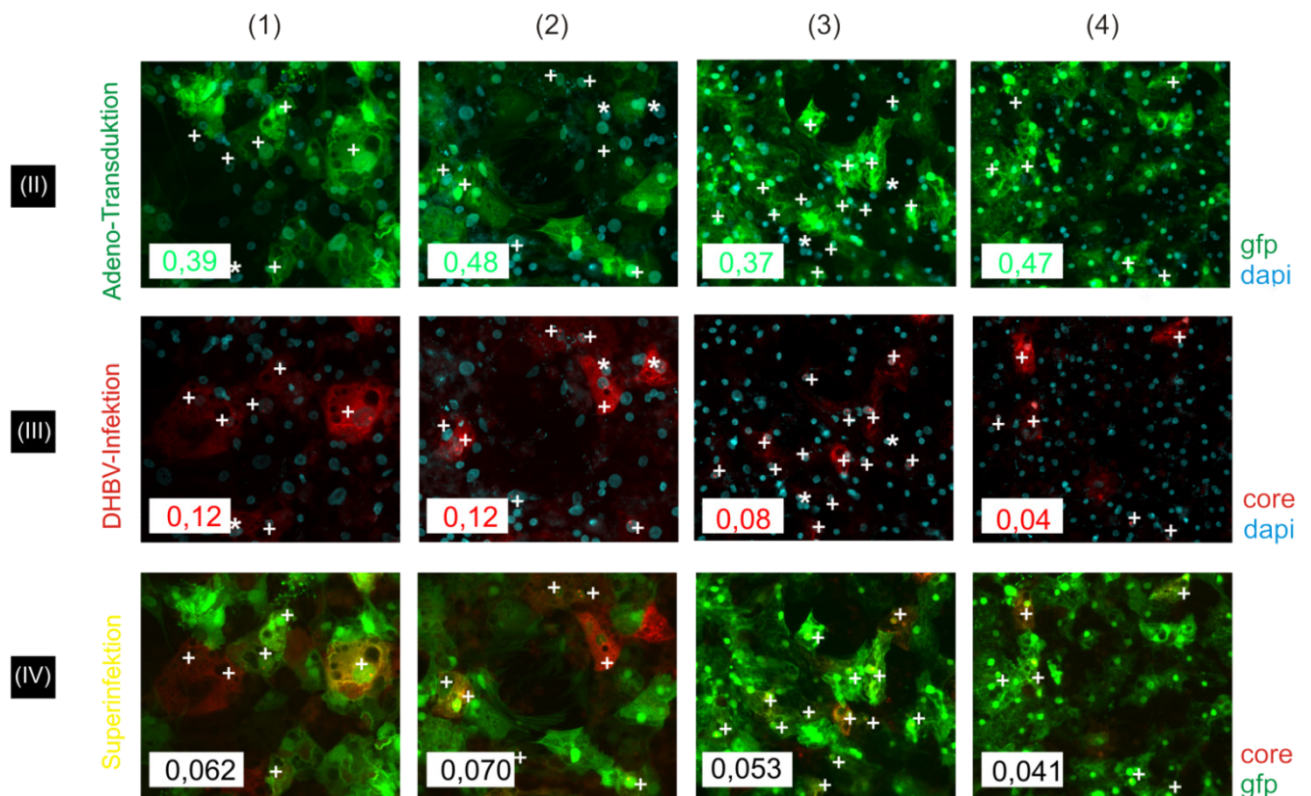
2.3.2 Quantitative Analyse der Akzeptanz L-exprimierender Hepatozyten für eine Superinfektion

Nach Etablierung der Methode zur quantitativen Erfassung und Normalisierung der Superinfizierbarkeit L-exprimierender PDHs wurden 4 Vergleichsanalysen an Hepatozyten aus 3 unabhängigen Leberzellpräparationen durchgeführt. PDHs wurden mit jeweils analogen Mengen an Adenoviren (Ad-GFP bzw. Ad-DuL) transduziert, das Protokoll dazu folgte der Darstellung aus Abbildung 2-9. Nach 6 Tagen wurden die fixierten Zellen einer quantitativen IFA nach dem im letzten Absatz beschriebenen Protokoll (Abschnitt 2.3.1 bzw. Abbildung 2-10) unterzogen. Abbildung 2-11 zeigt die Resultate an Ad-GFP-transduzierten, Abbildung 2-12 die Ergebnisse an Ad-DuL-transduzierten Hepatozyten.

Wie schon in den vorangehenden Auswertungen geschehen, in dieser mikroskopischen Analyse aber schön darstellbar, konnten sowohl Core- als auch GFP-positive Zellen eindeutig identifiziert werden. Wie von Mabit *et al.*¹⁹³ beschrieben, akkumuliert das Kapsid-Protein neben seiner typischen zytoplasmatischen Lokalisation in sogenannten Kern-Körperchen (= *nuclear core bodies*). Diese lokale Konzentration ist schon während der Etablierung einer DHBV-Infektion zu beobachten, wenn erst geringe Mengen des Proteins vorliegen. Ebenso hat GFP die Eigenschaft im Kern einer transduzierten Zelle deutlich und selbst bei nur geringer Gesamtkonzentration detektierbar zu sein. Beide Phänomene sind z.B. in den Bildern in Reihe 1 und 2, Abbildung 2-11 deutlich zu erkennen.

Zunächst die Ergebnisse der Kontrolle betrachtend, resultierte die Transduktion mit Ad-GFP in einer mittleren Effizienz von 43 % (Abbildung 2-11, Transduktionsraten: 0,37-0,48). Die DHBV-Infektionseffizienz schwankte zwischen 4,3 und 12,3 % (Infektionsraten: 0,04-0,12) und lag somit im Mittel bei 9 % der Gesamtzellzahl. Wie nach den Ergebnissen aus 2.2 zu erwarten, korrelierten die Raten GFP-exprimierender Zellen und die Anzahl DHBV-infizierter Zellen nicht, d.h. eine geringere Anzahl an Ad-GFP-transduzierten Zellen hatte keine gesteigerte Infektionseffizienz zur Folge, ebenso wenig war dies umgekehrt der Fall (Vergleich der Parameter II und III).

Die Auszählung doppelt infizierter PDHs erfolgte im Anschluss und brachte folgendes Resultat: Die mittlere Rate superinfizierter Hepatozyten lag gerundet bei 0,06 (Parameter IV: 0,041-0,07), d.h. 6 % aller Zellen bzw. mindestens jede 17 Zelle war doppelt infiziert worden. Rein rechnerisch ($0,043 \times 0,09$) wäre mit einer durchschnittlichen Rate von 0,04 (Rate erwartete SI: 0,02-0,058) erwartungsgemäß sogar nur jede 25. Zelle doppelt infiziert.



Nummer	PDH-Präp (Nr.)	Gesamtzellzahl	mittlere Zellzahl pro Bild (I)	Anzahl Core-positive Zellen	Anzahl GFP-positive Zellen	Anzahl doppel-infizierte Zellen
(1)	1a	577	144	18	55	9
(2)	1b	1111	85	10	40	5
(3)	2	970	243	18	90	13
(4)	3	456	228	10	106	10

Nummer	PDH-Präp (Nr.)	Rate Adeno-Transduktion (II)	Rate DHBV-Infektion (III)	Rate erwartete Superinfektion	Rate Superinfektion (SI)(IV)	Stabw (SI)	SIA-Faktor	Stabw (SIA-Faktor)	SIA _{Norm} -Faktor	Stabw (SIA _{Norm})
(1)	1a	0,39	0,12	0,05	0,06	0,02	1,31	0,70	1	0,54
(2)	1b	0,48	0,12	0,06	0,07	0,03	1,20	0,36	1	0,30
(3)	2	0,37	0,08	0,03	0,05	0,04	1,77	0,32	1	0,18
(4)	3	0,47	0,04	0,02	0,04	0,01	2,07	0,002	1	0,001

Abbildung 2-11 Ad-GFP-transduzierte PDHs zeigen eine maximale Akzeptanz für eine Superinfektion.

PDHs wurden in 4 analog durchgeführten Experimenten (1-4) mit Ad-GFP-transduziert (MOI = 500) und mit DHBV (25 GE/Zelle) überinfiziert (siehe Versuchsablauf in Abbildung 2-9). 6 Tage p.Inf. wurden die Zellen fixiert und der quantitativen IFA unterzogen. Exemplarische Bilder der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung sowie eine tabellarische Zusammenfassung aller Ergebnisse an Zellen aus 3 verschiedenen PDH-Präparationen (1(a, b), 2, 3) sind präsentiert. 1a und 1b stellen Zellen einer Präparation, ausplattiert auf 2 verschiedenen Zellkulturplatten dar. Für die Zellen der Präparationen 1 und 2 wurden Adenoviren derselben, bei den Zellen aus Präparation 3 Viren einer anderen Charge verwendet. Jeweils 2-13 separate Aufnahmen (Vergrößerung: 200-fach) wurden ausgezählt, die jeweils ausgewertete Gesamtzellzahl ist angegeben. Weiße Kreuze (+) markieren

gleichzeitig transduzierte und infizierte Zellen, weiße Sternchen (*) DHBV-Core-positive aber GFP-negative PDHs. Alle Werte stellen gemittelte Werte dar. Zahlen in den Bildern zeigen die Raten zu Transduktion (II), Infektion (III) bzw. Superinfektion (IV) an.

Den Kalkulationen aus Abbildung 2-10 folgend, ergab eine Korrelation von tatsächlicher und erwarteter Menge superinfizierter Zellen einen SIA-Faktor von mindestens 1,2. Der in den Studien maximal erreichte SIA-Faktor übertraf die Erwartungen, bei gleichzeitig sehr geringer Streubreite, sogar um das Doppelte (Faktor $2,065 \pm \text{SD } 0,002$). Setzt man die Anzahl von transduzierten Zellen (40-106 Zellen von insgesamt 175 Zellen) mit der Anzahl von doppelt infizierten PDHs (5-13 Zellen von insgesamt 175 Zellen) ins Verhältnis, zeigt sich, dass 13 % der transduzierten Zellen auch mit DHBV infiziert worden waren. Damit lag der Wert sogar leicht höher als die mittlere Infektionseffizienz von 9 %. Die Bilder der mikroskopischen Analyse in der Abbildung unterstreichen diese Ergebnisse eindrücklich.

Zusammengefasst ergab sich für die 4 analog durchgeführten Experimente ein einheitliches Bild, nämlich das, das sich eine DHBV-Infektion ohne negative Beeinträchtigung in GFP-exprimierenden Hepatozyten etablieren kann, und zwar unabhängig von der Charge der Hepatozyten oder der Adenoviren.

Die parallel und analog durchgeführten Experimente an Ad-DuL-transduzierten PDHs (Abbildung 2-12) ergaben im direkten Vergleich ein völlig konträres Bild. Bei einer mittleren Transduktionseffizienz von 31 % (Parameter II: 0,25-0,34) zeigten sich im Mittel zum einen nur 2,9 % (2,4-3,7 %) der Hepatozyten DHBV-infiziert. Zum anderen wurden gerundet durchschnittlich nur 0,3 % der zuvor transduzierten, und somit L-exprimierenden Zellen, nachfolgend produktiv mit DHBV infiziert (Anzahl doppelt infizierter Zellen: 0-0,33; Anzahl GFP-positive Zellen: 39-113). Dies entspricht wiederum nur einem Zehntel der mittleren Infektionseffizienz von fast 3 % entsprach.

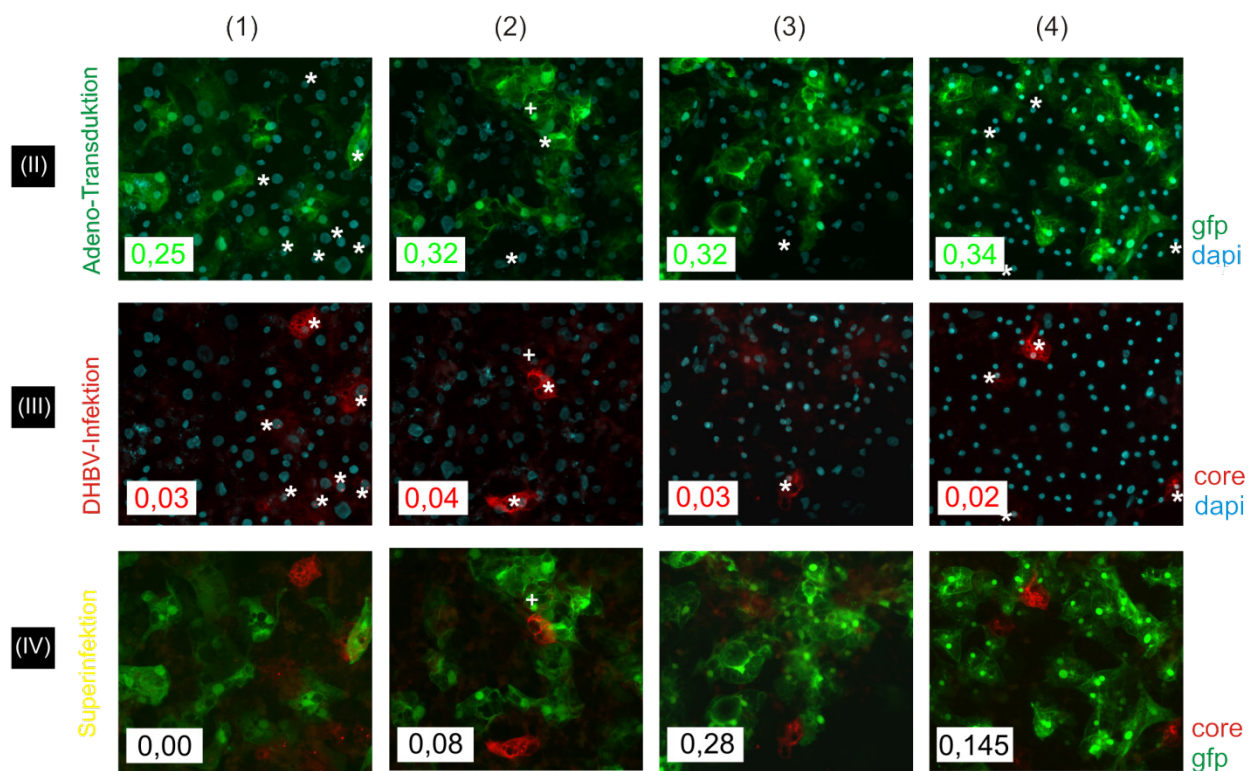
Anhand der Anzahl aller ausgewerteten Zellen (220, mittlere Zellzahl: 157-329) und der durchschnittlichen Rate tatsächlich superinfizierter PDHs von 0,001 (Parameter IV: 0-0,001) lässt sich dieses Ergebnis an konkreten Zellzahlen noch anders verdeutlichen: nur 0,02 von 220 Zellen wurden doppelt infiziert. Hochgerechnet entspricht dies etwa 1 superinfizierten Zelle pro 10 000 Zellen bzw. 0,01 % der Gesamtzellzahl. Erwartungsgemäß müssten allerdings, würde von der Transgenexpression kein negativer Einfluss ausgehen, nach der berechneten Rate von 0,01 (Rate erwartete SI: 0,007-0,012) mindestens 0,2 Zellen pro 220 Zellen bzw. 1 Zelle pro 1000 doppelt infiziert sein. Das Ergebnis unterschreitet die

Erwartungen somit etwa um den Faktor 10. Die Berechnungen unterstreichen den deutlichen Gegensatz zu den Resultaten der Kontrollanalyse.

In den 4 Studien lag der mittlere SIA-Faktor_{Ad-DuL} bei 0,13, maximal ergab sich ein Wert von 0,28. Die Akzeptanz Ad-DuL-exprimierender PDHs für eine SI zeigte sich damit um mindestens zwei Drittel (PDH-Präp 2, SIA-Faktor 0,28) gegenüber der maximal zu erreichenden Akzeptanz (SIA-Faktor = 1) gesenkt. Die teilweise hohen Standardabweichungen (z.B. 0,627) beruhen auf der geringen Gesamtzahl superinfizierter Zellen. In den Experimenten zu den PDH-Präparationen 1b, 2 und 3 wurde bei 162-328 Zellen jeweils nur eine einzige doppelt positive Zelle detektiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder in Abbildung 2-12 verdeutlichen die Beobachtungen.

Die Normalisierung der SIA-Faktoren auf die entsprechenden GFP-Kontrollen ergaben SIA-Faktoren_{Ad-DuL_Norm} zwischen 0,0 und maximal 0,15. Diese Werte spiegeln wider, dass die Akzeptanz Ad-DuL transduzierter PDHs gegenüber einer weiteren DHBV-Infektion korrigiert um mindestens 85 % reduziert war. Die Ergebnisse dieser umfangreichen Vergleichsanalyse zeigen auf quantitative Art und Weise, dass die L-Expression alleine signifikant die DHBV-SI der Zellen limitiert.

Es lässt sich festhalten, dass es die etablierte Quantifizierungsmethode erlaubte, die einzelnen Transgen-exprimierenden Zellkulturen differenziert in ihrer Kompetenz zu bewerten eine SI zuzulassen. Das in Bezug setzen der Raten von tatsächlich und erwartet superinfizierten Zellen machte es an dieser Stelle möglich, die wenigen Ereignisse von Superinfektion vor dem hohen Hintergrund infizierter aber untransduzierter Zellen herauszufiltern und signifikante Effekte sichtbar zu machen.



Nummer	PDH-Präp (Nr.)	Gesamtzellzahl	Mittlere Zellzahl pro Bild (I)	Anzahl Core-positive Zellen	Anzahl GFP-positive Zellen	Anzahl doppel-infizierte Zellen
(1)	1a	1100	157	5	39	0,00
(2)	1b	976	163	6	50	0,17
(3)	2	1167	233	6	72	0,20
(4)	3	986	329	8	113	0,33

Nummer	PDH-Präp (Nr.)	Rate Adeno-Transduktion (II)	Rate DHBV-Infektion (III)	Rate erwartete Superinfektion	Rate Superinfektion (SI)(IV)	Stabw (SI)	SIA-Faktor	Stabw (SIA-Faktor)	SIA _{Norm} -Faktor	Stabw (SIA _{Norm})
(1)	1a	0,25	0,03	0,007	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00
(2)	1b	0,32	0,04	0,012	0,001	0,003	0,08	0,19	0,06	0,15
(3)	2	0,32	0,03	0,009	0,001	0,002	0,28	0,63	0,15	0,34
(4)	3	0,34	0,02	0,008	0,001	0,002	0,15	0,25	0,07	0,12

Abbildung 2-12 Die Expression von L resultiert in einem Verlust der Akzeptanz der Zellen für eine Superinfektion.

Dargestellt sind die Ergebnisse der parallel und analog zu Abbildung 2-11 durchgeführten Analysen an Ad-DuL-transduzierten Hepatozyten. 3-7 separate Bilder (Vergrößerung: 200-fach) aus je einer 12-well Schale wurden der Quantifizierung unterzogen, die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst. Die Werte zu den Parametern und die SIA-Faktoren sind gemittelte Werte. Für die Mengen und Chargen der Virusstocks gilt das gleiche wie für die Ad-GFP-Analyse. SIA-Faktor_{Norm} reflektiert das auf die jeweils korrespondierende Ad-GFP-Kontrolle genormte Ergebnis (siehe SIA-Faktor Abbildung 2-11). Zahlen in den Bildern zeigen die ermittelten Raten zu Transduktion (II), Infektion (III) und Superinfektion (IV).

2.3.3 Untersuchung zur zeitlichen Korrelation von L-Expression und Infektionsausschluss

Mit dem folgenden Experiment wurden kinetische Aspekte der L-Proteinexpression und des Ausschlusses einer SI untersucht. Analog zu 2.1.2 wurden PDHs mit Ad-DuL transduziert, um dann 8, 24, 48 bzw. 72 Stunden später mit DHBV-haltigem Serum überinfiziert zu werden. 6 Tage später wurden Transduktions- und Infektionsraten bestimmt und die SIA-Faktoren kalkuliert, Abbildung 2-13 A gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau und die durchgeführten Quantifizierungen. Um die L-Expression zum jeweiligen Zeitpunkt der Infektion zu bestimmen wurden transduzierte aber nicht-infizierte PDHs lysiert und einer Immunoblot-Analyse unterzogen.

In dieser Untersuchung konnte die Expression von L im Western Blot (Abbildung 2-13 C) erstmals 24 h p.Tr. eindeutig nachgewiesen werden. Von diesem Zeitpunkt an stieg die Proteinmenge, analog zu dem in Abbildung 2-4 gezeigten Resultat, stetig bis zum Zeitpunkt 72 h p.Tr. an. Die korrespondierende SIA-Analyse (Abbildung 2-13 B, Diagramm) ergab einen zur Proteinkinetik zeitlich korrelierenden und dabei stetig sinkenden SIA-Faktor: Schon 8 h p.Tr. konnte bereits nur noch ein $SIA\text{-Faktor}_{Ad\text{-}DuL\text{-}Norm}$ von 0,318 ermittelt werden, 1,1 % der L-exprimierenden Zellen waren doppelt infiziert (Infektionsrate alle Zellen = 3%). Nur 16 Stunden später war der Faktor bereits auf 0,046 gesunken, nur noch 0,2 % (Infektionsrate alle Zellen = 2 %) der transduzierten PDHs waren superinfiziert. Ab dem Zeitpunkt 48 h p.Tr. war keine superinfizierte Hepatozyte mehr detektierbar. Die Infektionsrate (bezogen auf die Gesamtzellzahl) wurde dabei von der Rate superinfizierter Zellen zu allen Zeitpunkten um mindestens den Faktor 10 unterschritten. Dies demonstriert wie deutlich der jeweilige SIA-Faktor unter den Erwartungen lag. Für die mitgeführten GFP-Kontrollen ergaben sich SIA-Faktoren zwischen 1,43 und 2,38, wobei zu den Zeitpunkten 8, 24, 48 bzw. 72 h p.Tr. 8 %, 11 %, 3,5 % bzw. 7 % der transduzierten Zellen superinfiziert waren. Die Infektionsraten der Transgen-exprimierenden PDHs lagen dabei zu allen Zeitpunkten über der allgemeinen Infektionseffizienz (Daten hier nicht gezeigt).

Die Kinetik demonstriert, dass die SIR zeitlich wie auch funktionell mit der Expression von L korreliert. Das Resultat dieser Untersuchung lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Ausschluss einer DHBV-SI über einen Mechanismus erfolgen muss, der unmittelbar nach Beginn der L-Expression greift. Ein Wirkungsmechanismus, der über eine Signaltransduktionskaskade oder andere eher mittelbare Aktionen funktioniert, macht dieses Resultat unwahrscheinlich. Zwar ist die Wahrscheinlichkeit einer Doppelinfektion zu einem

sehr frühen Zeitpunkt (8 h) noch nicht vollständig ausgeschlossen, allerdings ist die Akzeptanz im Vergleich zu einer Hepatozyte, die kein L exprimiert, bereits drastisch und zwar um etwa 70 % reduziert.

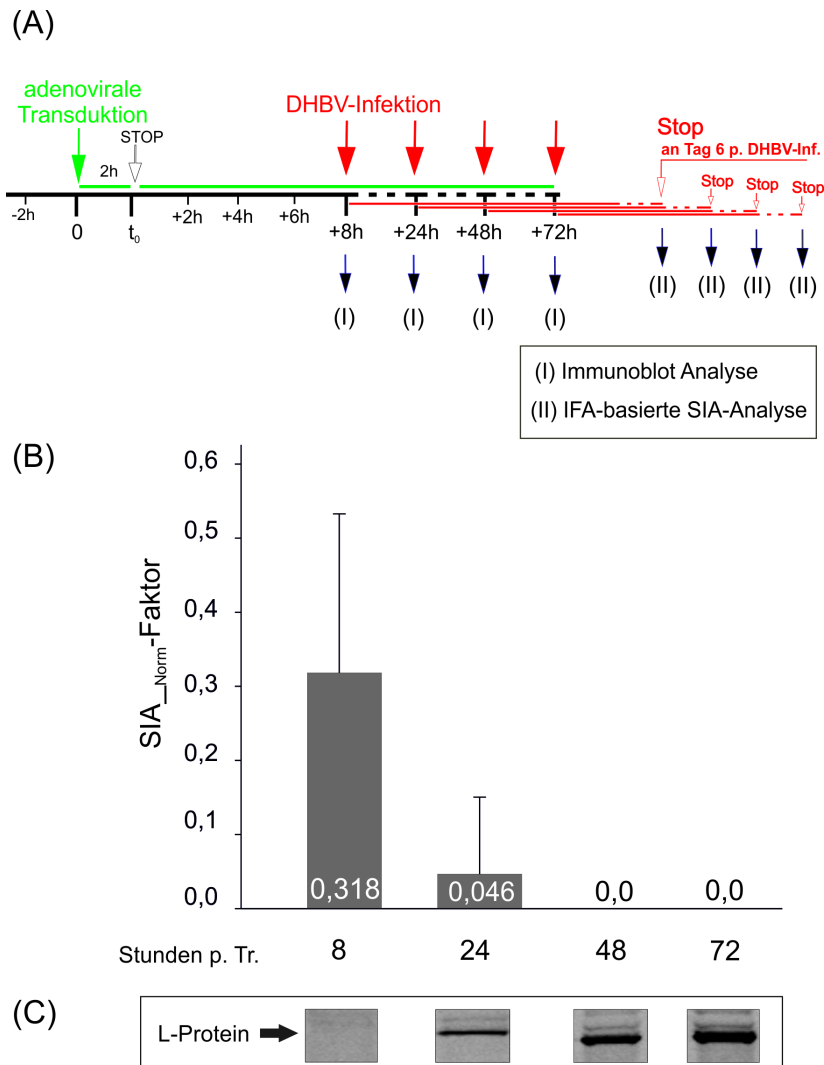


Abbildung 2-13 Die L-Protein vermittelte SIR wird schon früh nach der Genexpression etabliert.

(A) Schema zum Versuchsablauf. PDHs wurden mit Ad-DuL transduziert, die Effizienz lag im Mittel bei 33 %. Zu den aufgezeigten Zeitpunkten (rote Pfeile) wurden die Zellen mit DHBV (25 GE/Zelle) überinfiziert. (B) Graphische Präsentation zur SIA-basierten IFA. 6 Tage p.Inf. wurden insgesamt zwischen 1352 und 1837 Zellen pro Zeitwert ausgezählt. Zahlen in den Balken stellen die exakten und normierten SIA-Faktoren (SIA-Faktor_{Ad-DuL_Norm}) dar. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 h p.Tr. konnten keine doppelt infizierten Zellen detektiert werden. (C) Western Blot Analyse. Parallel zur Infektion wurde die L-Expression analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -pre-S Antikörper.

2.4 Analyse des Einflusses von L auf die initiale Interaktion von DHBV mit seiner Wirtszelle

Die Eingrenzung der Stelle auf oder in der Zelle, an der das superinfizierende Virus blockiert wird, könnte bereits Eigenschaften des zugrunde liegenden SIR-Mechanismus offenbaren. Das Resultat aus 2.3.3 hatte demonstriert, dass die Neubildung des großen Hüllproteins nicht nur funktionell sondern auch zeitlich exakt mit der SIR korreliert. Denkbar wäre, dass neugebildetes L bereits sehr frühe Schritte im Replikationszyklus in ihrem Ablauf stört, wie die Bindung des Virus an die Zelle, die Internalisierung der Partikel oder den eigentlichen Viruseintritt, d.h. den Fusionsprozess an zellulären Membranen einschließlich der Freisetzung und dem Kerntransport des Kapsids. L könnte die Funktionalität eines noch unbekanntes Kofaktors hemmen oder aber die sowieso geringe Anzahl an duCPD-Molekülen auf der Zelloberfläche weiter minimieren und so die Zellassoziation bzw. die Internalisierung von Partikeln blockieren.

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, wie sich die Expression von L auf die initiale Interaktion von DHBV mit seiner Wirtszelle, d.h. auf die Zellbindung und Aufnahme auswirkt. Die Messung zellassoziierter Viren bzw. Virusgenome sollte mittels *real-time* PCR erfolgen. Bevor die Assoziation von Viren an L-exprimierende PDHs quantitativ analysiert werden konnte, musste die PCR-Methodik für das DHBV-System im Labor etabliert werden. Die Zellbindung von DHBV wurde zuerst in einer Kompetitionsstudie näher charakterisiert.

2.4.1 Etablierung einer *real-time* PCR-Methode zur Quantifizierung der viralen Zellassoziation

Bedingt durch eine hohe lokale Konzentration der Viren in der Leber ist die Zellbindung von DHBV *in vivo* schnell und effizient¹⁹⁴. Demgegenüber steht die Situation *in vitro*, bei der nur ein geringer Prozentsatz der DHBV-Partikel aus dem Inokulum an PDHs assoziiert¹⁹⁵. Die Detektion zellgebundener Viruspartikel in der Zellkultur verlangt folglich extrem sensitive Messmethoden. Bisher angewandte Techniken, die nicht auf die Quantifizierung einzelner zellassoziierter Viruspartikel abzielten, sind zum Beispiel der Nachweis radioaktiv markierter Partikel oder auch die Detektion DNA-haltiger Viruspartikel durch Hybridisierungsverfahren wie Southern Blotting. Neben einem hohen Zeitaufwand sind solche Techniken nicht in der Lage weniger als 10^5 - 10^6 DHBV-Genome pro ml Serum zu detektieren, zusätzlich ist der lineare Messbereich sehr eingeschränkt^{99,4}. Unter der Voraussetzung, dass nur 1-10 % der Partikel aus dem Inokulum binden und die Infektion mit DHBV-haltigem Serum (Titer:

$2,5 \times 10^9$ GE/ml) und in einem möglichst kleinen Volumen (10 μ l (5 μ l) Serum in einem Gesamtansatz von 500 μ l (250 μ l) pro 12-*well* Zellkulturschale á 1×10^6 Zellen (á 5×10^5 Zellen pro 24-*well* Zellkulturschale)) erfolgen sollte, wäre die Nachweisgrenze bereits erreicht gewesen.

Um eine sensitive und zugleich quantitative Messmethode in Händen zu halten, die eine spezifische Detektion DNA-haltiger Viruspartikeln erlaubt, wurde eine quantitative Echtzeit- bzw. *real-time* PCR (qRT-PCR) etabliert. Das hier angewendete TaqMan® qRT-PCR-Verfahren beruht zum einen auf dem sequenzspezifischen Binden einer Fluoreszenzfarbstoffmarkierten TaqMan®-Sonde an virale DNA in der Ausgangsprobe. Verschiedene Sonden kamen zum Einsatz und wurden dabei so konzipiert, dass sie je nach Probenmaterial entweder im Polymerase- oder im S-Gen hybridisierten (siehe Abschnitt 4.3.3.2 und Tabelle 4-2 im Methodenteil). Eine Kombination aus der 5'-Exo-Nuklease-Aktivität der Polymerase und FRET (= *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) ermöglicht zum anderen die Detektion und Quantifizierung der DNA. Um zellassoziierte Partikel nachzuweisen wurden PDHs standardmäßig für 3 h mit DHBV-haltigem Serum inokuliert, dann wurde die DNA der Ansätze isoliert und in die qRT-PCR eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Nachweisgrenze der Methodik bei höchstens 5×10^2 detektierbaren Genomäquivalenten pro Ansatz lag (entspricht 4×10^4 GE/ml) mit einem linearen Messbereich über mindestens 5 Log-Stufen (10^3 - 10^8 GE pro Ansatz). Exemplarisch ist die lineare Regression zum Standard einer PCR-Analyse im Methodenteil dieser Arbeit unter Absatz 4.3.3.2 gezeigt.

In einem ersten Schritt sollte die Spezifität der detektierten Zellassoziation in einer Hemmstudie verifiziert werden. Die Virusbindung an PDHs wurde zu diesem Zweck durch Suramin, einem polysulfonierten Harnstoffderivat, gehemmt^{196,162,195}. Die Hepatozyten wurden dabei zeitgleich mit Virus und ansteigenden Konzentrationen Suramin inkubiert. Um in der PCR-Analyse zwischen Bindung und Aufnahme viraler Partikel diskriminieren zu können, erfolgte die dreistündige Inokulation bei 4 bzw. 37 °C. Bei niedriger Umgebungstemperatur (4 °C) konnte von einer ausbleibenden Aufnahme viraler Partikel in die Zellen ausgegangen werden, da zelluläre Prozesse wie Endozytose oder das Zirkulieren des Rezeptors duCPD zum Erliegen kommen. Noch nicht zellgebundene Partikel wurden nach Beendigung der Inkubationsphase durch intensives Waschen mit entsprechend temperiertem Puffer entfernt, wodurch ein Verfälschen der Messung durch restliche Viruspartikel aus dem Inokulum verhindert und die Infektionsansätze zugleich synchronisiert wurden.

Unkompetierte Ansätze (w/o) dienten als Kontrolle sowie als Bezugsquelle für die absolute Quantifizierung der viralen Genomäquivalente. Nach dreistündiger Inokulation bei 37 °C waren im unkompetierten Kontrollansatz (Abbildung 2-14 A, w/o Konkurrenz) rund 15 % ($1,9 \times 10^6$ GE/Schale, Absolutwerte hier nicht gezeigt) der DNA-haltigen Partikel aus dem Inokulum ($1,25 \times 10^7$ GE/Schale, entsprechen 25 GE/Zelle) an Zellen gebunden bzw. aufgenommen. Bei 5×10^5 PDHs pro Schale entspricht dies etwa 4 Genomen pro Hepatozyte. Bei niedrigerer Inkubationstemperatur (4 °C) fiel die Zellbindung nur noch halb so hoch aus ($9,2 \times 10^5$ GE/Schale), pro Zelle assoziierten 2 Viren. Im korrespondierenden Infektionsansatz zeigte sich nach 4 Tagen die Anzahl der initial zellassoziierten Genome um den Faktor 2,5 amplifiziert ($4,8 \times 10^6$ GE/Schale), ein Zeichen für stattgefundene Replikation. Die hierzu über IFA ermittelte Infektionseffizienz lag bei 4 % (Abbildung 2-14 C, w/o), was einer Zellzahl von 20.000 infizierten Hepatozyten entsprach. Jedes 1.000. Virus aus dem Inokulum war demnach in der Lage gewesen, eine Infektion zu setzen.

Der Einfluss von Suramin auf die virale Zellbindung wurde bereits anhand der Absolutwerte aus der PCR-Messung sichtbar (Abbildung 2-14 A). Die inhibitorische Wirkung des Harnstoffderivats zeichnete sich hierbei in konzentrationsabhängiger Art und Weise ab. Für eine vergleichende graphische Präsentation der Ergebnisse wurde der einzelne Messwert auf die jeweils unkompetierte Kontroll-Bindung bzw. -Infektion normalisiert (Abbildung 2-14 B). Anhand dieser Darstellung lässt sich erkennen, dass ein Anstieg in der Suramin-Konzentration in allen Fällen eine systematische Abnahme der viralen Zellassoziation zur Folge hatte. Dieser Effekt war ab einer Konzentration von 10 µg/ml zu beobachten, eine geringere Menge ließ weder einen messbaren negativen Einfluss auf die virale Zellbindung und Aufnahme, noch auf die Infektiosität erkennen (Abbildung 2-14 A, links). Bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C reduzierte die höchste Suramin-Konzentration die Virusbindung um 80 % (19,5 % der unkompetierten Kontrolle) bzw. um den Faktor 5 (w/o Konkurrenz = $9,2 \times 10^5$ GE/Schale, 400 µg/ml = $1,8 \times 10^5$ GE/Schale). Bei 37 °C konnten Bindung und Aufnahme von Partikeln auf residuale 26 % bzw. um den Faktor 4 gesenkt werden (w/o Konkurrenz = $1,9 \times 10^6$ GE/Schale, 400 µg/ml = 5×10^5 GE/Schale). Diese maximale Hemmung durch Suramin war bereits ab einer Konzentration von 80 µg (37 °C) bzw. 120 µg (4 °C) Suramin pro ml messbar und erreichte dann in beiden Fällen ein Plateau bei etwa 20 % (Abbildung 2-14 B, links). Eine signifikant stärkere Inhibition war auch in Wiederholungsversuchen nicht möglich. Demzufolge ist etwa ein Fünftel der initialen Zellbindung von DHBV nicht mit Suramin inhibierbar.

Betrachtet man die Folgen der Suraminbehandlung für die Infektion zeigt sich, dass bereits 40 µg/ml Suramin die Infektionseffizienz um mehr als die Hälfte, auf 42 % (2×10^6 GE/Schale) der unkompetierten Kontrollinfektion ($4,8 \times 10^6$ GE/Schale = 100 %), senkten. 80 µg/ml ließen nur noch eine mittlere residuale Effizienz von 11 % ($5,4 \times 10^5$ GE/Schale) zu. Ab 200 µg/ml sank die Infektionseffizienz unter 1 % der Kontrolle. Die Resultate der IFA-basierten Quantifizierung (Abbildung 2-14 C) bestätigten die Ergebnisse aus der qRT-PCR. Bei einer Konzentration von 200 µg/ml waren noch einige wenige, bei höheren Konzentrationen waren keine infizierten Zellen mehr nachweisbar.

Ein direkter Vergleich der Anzahl zellassoziierter GE nach Infektion und der Zahl gebundener GE nach 3 h (Abbildung 2-14 A) offenbart einen interessanten Aspekt: Bis zu einer Suramin-Konzentration von 120 µg/ml wird die Anzahl der initial zellassozierten Genome deutlich von der Anzahl der Genome in produktiv infizierten Zellen (4 Tage p.Inf.) überschritten. Ab einer Konzentration von 120 µg/ml aber ist keine Netto-Amplifikation viraler GE mehr messbar, d.h. die Anzahl intrazellulärer Genome unterschreitet nach viertägiger Infektionsdauer jeweils die Anzahl der initial zellgebundenen Genome.

Im Rahmen einer Regressionsanalyse wurden die Suramin-Konzentrationen bestimmt, bei der unter den verschiedenen Voraussetzungen, die halbmaximale Inhibition der viralen Zellassoziation erreicht worden war (Daten nicht gezeigt). Dies erlaubte einen direkten Vergleich des inhibitorischen Potentials, welches Suramin auf die i) reine Zellbindung, ii) Zellbindung und Aufnahme und iii) die Infektion hat. Die für die initiale Virus/Zell-Interaktion kalkulierte IC_{50} lag bei 27,97 (3 h, 4 °C) bzw. bei 24,85 (3 h, 37 °C), gemittelt bei 26,4 µg/ml Suramin. Demnach wirkt das Harnstoffderivat bei gleicher Konzentration in beiden Ansätzen, d.h. unter Bedingungen, die nur die reine Zellbindung oder zusätzlich eine Aufnahme von Viren zulassen, in gleicher Weise inhibitorisch. Anhand der graphischen Darstellungen in Abbildung 2-14 B scheint der Unterschied in der inhibitorischen Wirkung von Suramin auf Bindung und Aufnahme (Abbildung 2-14 B, links) im Vergleich zur Infektion (Abbildung 2-14 B, rechts) zunächst offensichtlich. In der Regressionsanalyse allerdings wird für die mittlere inhibitorische Konzentration in der Infektionsstudie eine IC_{50} von 32,8 µg/ml ausgewiesen. Demzufolge wird in allen 3 Ansätzen (Bindung vs. Bindung/Aufnahme vs. Infektion) die halbmaximale Inhibition bei ganz ähnlichen Konzentrationen des Harnstoffderivats erreicht. Dies wiederum weist darauf hin, dass Suramin primär einen sehr frühen Schritt im Infektionszyklus zu adressieren scheint, wodurch

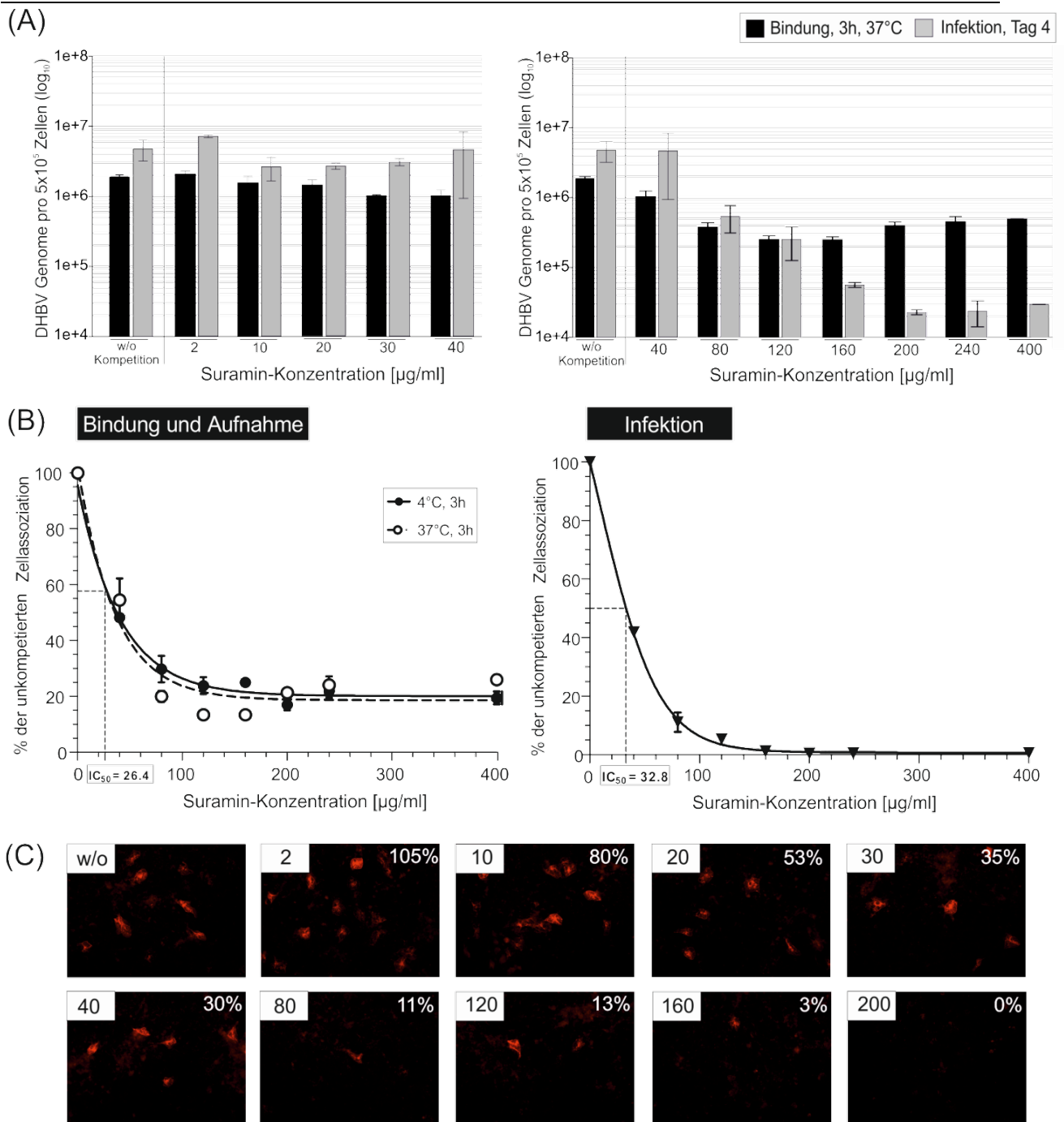


Abbildung 2-14 Quantitative Analyse zur hemmenden Wirkung von Suramin auf die Zellbindung und Infektion von DHBV.

PDHs wurden in Gegenwart steigender Suraminkonzentrationen [0-400 µg/ml] mit 25 GE/Zelle bei 4 bzw. 37 °C inokuliert. Für die qRT-PCR wurden Doppelansätze, für die IFA Einfachansätze infiziert. Infizierte, aber nicht mit Suramin behandelte Zellen dienten als Kontrolle (w/o Konkurrenz). Für die genaue Versuchsdurchführung siehe 4.2.1.4. (A) Graphische Darstellung der Absolutwerte der qRT-PCR-Messung zellassoziierter GE nach 3 h bei 37 °C (graue Balken) sowie an Tag 4 p.Inf. (schwarze Balken). Fehlerbalken präsentieren Standardabweichungen aus je 2 unabhängigen Infektionen. (B) Graphische Darstellung der PCR-Resultate aus (A). Der jeweilige Anteil zur unkompetierten Zellassoziatio ist in Prozent gegen die Suramin-Konzentration

aufgetragen. Die Fehlerbalken präsentieren jeweils den oberen und den unteren Messwert. Die in der Regressionsanalyse ausgewiesenen Werte für die mittleren inhibitorischen Suramin-Konzentrationen (IC_{50}) sind angegeben. Für Bindung (4 °C) und Bindung/Aufnahme (37 °C) wurde eine gemeinsame IC_{50} ermittelt, da sich beide Analysen nicht signifikant voneinander unterschieden. (C) IFA von infizierten, Core-positiven Zellen. Die Suramin-Konzentrationen sind in weißen Kästchen ($\mu\text{g/ml}$) angegeben, Infektionseffizienzen im Verhältnis zur unkompetitierten Kontrolle sind in % aufgezeigt. Bei Suramin-Konzentrationen zwischen 240 und 400 $\mu\text{g/ml}$ wurden keine infizierten Zellen detektiert.

der weitere Verlauf der Infektion blockiert wird.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit, dass sich mittels der etablierten qRT-PCR-Methode die initiale Interaktion von DHBV mit seiner Wirtszelle sehr sensitiv und zugleich quantitativ messen lässt. Die Quantifizierung zellassoziierter viraler Genomäquivalente ergab, dass unter den gewählten Bedingungen alle Absolutwerte im linearen Bereich der Messmethode lagen. Der quantitative Nachweis der inhibitorischen Wirkung von Suramin konnte dabei die Spezifität der Analyse unterstreichen. Das Harnstoffderivat stellte somit eine geeignete Kontrolle dar, um im Weiteren den möglichen Einfluss der L-Expression auf die Zellbindung von DHBV zu untersuchen (Absatz 2.4.3). Zuvor diente die Methode noch einer kinetischen Analyse zur Wirkung von Suramin.

2.4.2 Kompetitionsstudie zur Wirkungsweise von Suramin

Um Aufschluss darüber zu erhalten, zu welchem Zeitpunkt der Infektion Suramin hemmend auf das Virus wirkt, wurde eine Kinetikstudie durchgeführt. Die Resultate und eine Übersicht zum Versuchsablauf sind in Abbildung 2-15 gezeigt. PDHs wurden mit Suramin vorbehandelt oder zu verschiedenen Intervallen nach der Inokulation mit dem Harnstoffderivat inkubiert. Während der Infektion war Suramin nicht zugegen, alternativ wurde es zugesetzt. Wie das Resultat zeigt, konnte Suramin seine maximale Wirkung nur entfalten, wenn es während der Inokulation präsent war (Abbildung 2-15 B). Unter diesen Umständen war noch eine Restinfektion von 9 % (b1) der unkompetierten Infektion (b = 100 %) messbar. Die Höhe der residualen Infektionseffizienz in Ansatz b1 entsprach dabei der nach Abbildung 2-14 B (rechte Graphik) zu erwartenden Hemmwirkung. Eine Präinkubation der Zellen, ohne dass das Harnstoffderivat im Anschluss während der Infektion zugegen war, erwies sich im Gegensatz dazu als wirkungslos (a1 = 109 %). Eine Kombination aus Präinkubation der Zellen und Gegenwart von Suramin während der Inokulation resultierte wiederum in einer maximalen Hemmung (a2 = 6 %).

Um eine mögliche spätere Wirkung von Suramin im Infektionszyklus zu adressieren, wurden bereits infizierte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten p.Inf. mit Suramin behandelt. Wurde Suramin direkt nach Beendigung der Inokulation zugesetzt (c1), konnte die Infektionseffizienz noch um 65 % gesenkt werden. Folglich konnten noch zwei Drittel der Infektionsereignisse durch die nachträgliche Gabe von Suramin direkt nach Beendigung der Inokulation verhindert werden. Je länger das Ende der Inokulation zurück lag, desto weniger effektiv war die Inhibition, wobei diese graduell abnahm. 4,5 h nach Beendigung der Inokulation war keinerlei Hemmung mehr möglich (c4-c6).

Um die Wirkung von Suramin auf zellassozierte aber noch nicht aufgenommene Viruspartikel ausklammern zu können, wurden die Viruspartikel in einer zweiten Untersuchung nach Beendigung der Inokulation inaktiviert und entfernt (Abbildung 2-15 C). Infizierte Zellen wurden zu diesem Zweck direkt nach der Inokulation mit einem Glycin/HCl-Puffer (pH 2.2) gewaschen. Durch die Säurebehandlung werden noch nicht internalisierte Partikel inaktiviert¹⁹⁷. Hierbei zeigten sich noch 80 % der bereits assoziierten Partikel sensitiv gegenüber der pH-Senkung ($b = 9 \times 10^6$ GE, $b^* = 1,8 \times 10^6$ GE). Unter diesen Bedingungen hatte selbst eine Suramingabe direkt nach Beendigung der Inokulation keinen hemmenden Einfluss mehr ($c1^* = 110$ %). Im Vergleich zur ersten Kinetik war, trotz einer Suramin-Konzentration von 200 µg/ml, keine hemmende Wirkung mehr auf bereits infizierte aber Glycin-behandelte Zellen nachweisbar.

Die Ergebnisse dieser Kinetik offenbaren, dass Suramin kurzfristig noch bereits zellassozierte Viren daran hindern kann, eine produktive Infektion zu setzen. Bereits aufgenommene Viren sind der hemmenden Wirkung nicht mehr ausgesetzt.

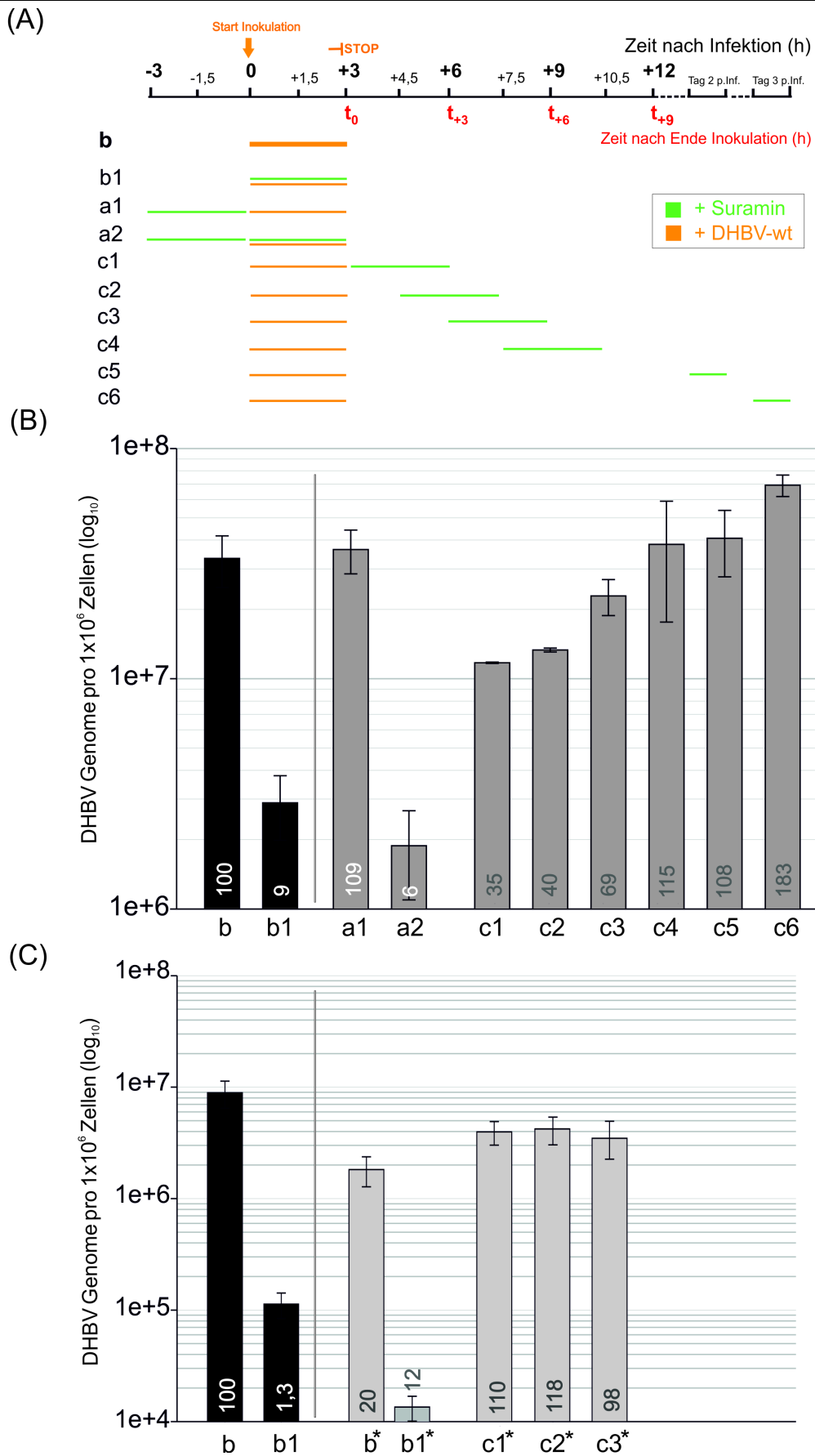


Abbildung 2-15 Untersuchung zur Kinetik der inhibitorischen Wirkung von Suramin auf die DHBV-Infektion.

(A) Übersichtsschema zum zeitlichen Ablauf der Kinetikstudie. PDHs wurden mit DHBV-haltigem Serum (3 h, 37 °C, 50 GE/Zelle) in Anwesenheit von Suramin (120 µg/ml) inkubiert (Ansatz b1). Im Ansatz a2 wurden die Zellen zusätzlich mit Suramin (3 h) vorbehandelt. Alternativ wurden die Hepatozyten vor (a1) oder nach (Ansätze c1-6) der Infektion mit Suramin behandelt, während der Inokulation war das Harnstoffderivat nicht zugegen. Die unkompetierte Infektion (b) diente als Kontrolle und später als Referenz in der Auswertung. Die DNA infizierter Ansätze wurden mittels qRT-PCR quantifiziert (B). Zahlen in den Balken sind Prozentwerte des Anteils zellassoziierter GE bezogen auf die unkompetierte Kontrolle (100 %). (C) Analog durchgeführte Studie, die Suramin-Konzentration lag hier bei 200 µg/ml. Die Zellen, die mit einem Sternchen (*) markiert sind, wurden nach Beendigung der Inokulation mit Glycin-Puffer (pH 2.2) gewaschen. Als Referenz für c1*-c3*diente b*. Die für die Ansätze b* und b1* angegebenen Prozentwerte beziehen sich jeweils entsprechend auf die Ansätze b und b1 in (C).

2.4.3 Quantifizierung des Einflusses der L-Expression auf die Zellassoziation von DHBV

Ob sich die Expression des großen Hüllproteins in Hepatozyten bereits negativ auf die Assoziation von DHBV an seine Wirtszelle auswirkt, wurde im nächsten Schritt mit der etablierten qPCR-Methode untersucht. Die hier eingesetzte Sonde wurde so designt, dass sie innerhalb des Gens für die virale Polymerase assoziierte, in einer Sequenz 3'-gelegen zum Core-Gen und 5' zu pre-S. In Anbetracht des einzubringenden L-Gens über die rekombinanten Adenoviren war es von essentieller Bedeutung, dass die Erkennungssequenz der Sonde außerhalb der Sequenz für das große Hüllprotein lag. Abbildung 2-16 gibt die graphische Auswertung der Messdaten wieder. Im kompetierten Kontrollansatz (+ Suramin) zeigte sich die virale Zellassoziation wie zu erwarten (siehe 2.4.1) deutlich reduziert. In dieser Analyse waren sogar nur noch 12,5 % residuale Bindung messbar, die resultierende Infektion war nahezu vollständig inhibiert (1,5 % der unkompetierten Kontrolle).

Im Gegensatz dazu beeinflusste die L-Expression der Zellen die virale Zellbindung nicht negativ. Die Viren assoziierten ebenso an L-exprimierende, wie an untransduzierte Zellen. Der detektierte leichte Anstieg (Faktor 1,4: 100 % → 138 %) lässt sich mit der allgemeinen Schwankung innerhalb einer Messung erklären. Wie erwartet zeigte sich die Infizierbarkeit L-exprimierender PDHs im korrespondierenden Infektionsansatz aber deutlich, nämlich mindestens um 83 % bzw. den Faktor 5,8 (100 % → 17,3 %), reduziert.

Diesen Resultaten zufolge wirkt sich die Anwesenheit von L nicht negativ auf die initiale Interaktion von Virus und Wirtszelle (d.h. Bindung und Aufnahme) aus. Der Einfluss den L nachweislich auf die Infizierbarkeit von PDHs hat, lässt sich demnach nicht mit einer L-vermittelten blockierten bzw. gehemmten Zellbindung erklären.

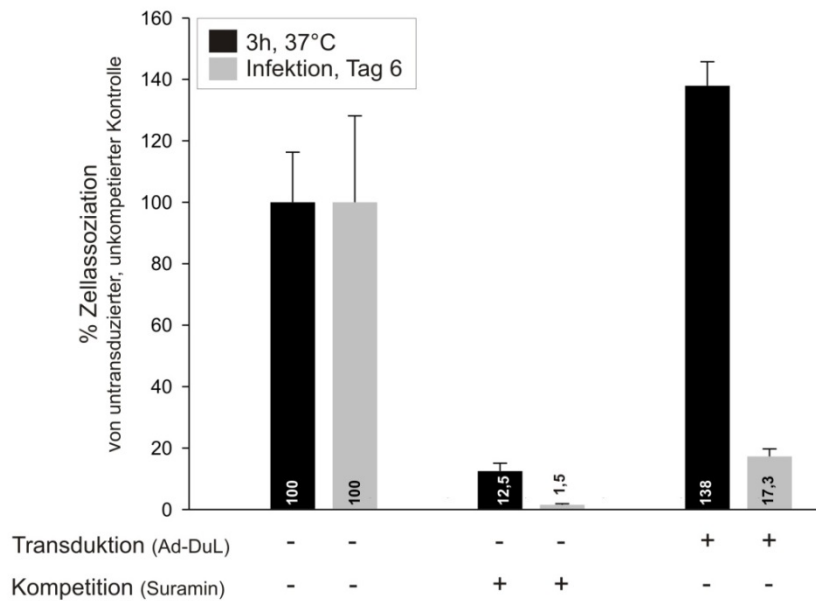


Abbildung 2-16 Die Expression von DHBV-L hat keinen negativen Einfluss auf die Assoziation von DHBV an PDHs.

PDHs wurden mit Ad-DuL transduziert und 2 Tage später mit DHBV-haltigem Serum (25 GE/Zelle) inokuliert (3 h, 37 °C). Untransduzierte Zellen dienten als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde bei untransduzierten PDHs die Zellassoziation mit Suramin (200 µg/ml) inhibiert. Die DNA aller Ansätze wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Das Ergebnis ist graphisch als prozentuale Zellassoziation der unkompetierten und der untransduzierten Kontrolle (jeweils = 100 %) präsentiert. Zahlen in den Balken entsprechen den exakten Werten in %. Die Transduktionseffizienz lag bei 35 %, der resultierende SIA-Faktor_{Ad-DuL_Norm} betrug 0,028.

2.5 Analyse potentieller SIR-Determinanten im L-Protein

In den vorangehenden Abschnitten wurde der L-Protein-vermittelte Infektionsausschluss gezeigt und quantitativ bewertet. Die Daten schließen an dieser Stelle bereits eine blockierte Zellbindung als zugrunde liegende Ursache aus. Neben der noch offenen Frage zum genauen Zeitpunkt des Infektionsausschlusses ist auch noch nicht geklärt, wie L seine Wirkung auf molekularer Ebene ausübt. Im folgenden Teil der Arbeit wurde daher überprüft, ob einer der beiden Subdomänen (pre-S bzw. S), einer bereits beschriebenen Determinante in pre-S (z.B. gp180-Binderegion) oder einzelnen Sequenzabschnitten in L, die SIR-Kompetenz zu vermitteln zugeordnet werden kann. Der Ansatz erfolgte mittels reverser Genetik, wobei in einer umfangreichen Mutationsanalyse Ad-DuL-Mutanten kloniert wurden, um dann Transgen-exprimierende PDHs einer SIA-Analyse zu unterziehen. Anhand der erhobenen Daten konnte die SIR-Fähigkeit der einzelnen L_{mut} -Proteine quantifiziert werden. Details zur Klonierung und Generierung der rekombinanten Adenoviren befinden sich in Abschnitt 4.2.4 im Methodenteil dieser Arbeit.

In der ersten Versuchsreihe (2.5.1) wurde der Beitrag von DHBV S, d.h. nur des hydrophoben, membranverankernden Teils des L-Proteins, zum SIR-Mechanismus untersucht. Die Experimente zur Rolle von pre-S bzw. distinkter Determinanten in der hydrophilen Domäne von L erfolgten im Anschluss, die entsprechenden Resultate sind in Abschnitt 2.5.2 präsentiert.

2.5.1 Analyse des Einflusses von DHBV S auf den Superinfektionsausschluss

Nach Herstellung rekombinanter Adenoviren, die nur für die S-Domäne von L kodierten (Ad-DuS) wurde im ersten Schritt eine Expressionsanalyse in Hepatozyten durchgeführt. Anschließend wurde, analog zu den unter 2.3 präsentierten SIA-Studien, die Akzeptanz Ad-DuS-exprimierender PDHs für eine SI quantifiziert.

Abbildung 2-17 fasst alle Resultate zusammen. In der Immunoblot Analyse erscheint DuS wie erwartet bei einer Größe von 17 kDa (

Abbildung 2-17 B). Die Proteinanalyse der parallel mit Ad-DuL transduzierten PDHs zeigt deutlich die Koexpression von L und S. Eine DHBV-unabhängige Proteinbande mit einer Größe von etwa 30 kDa wurde wiederholt in beiden Proben bei Verwendung dieses Antikörpers detektiert. Dieselbe Beobachtung wurde mit Zelllysaten Ad-GFP-transduzierter bzw. untransduzierter PDHs gemacht (Daten nicht gezeigt) und ist daher als DHBV-unspezifisch zu bewerten.

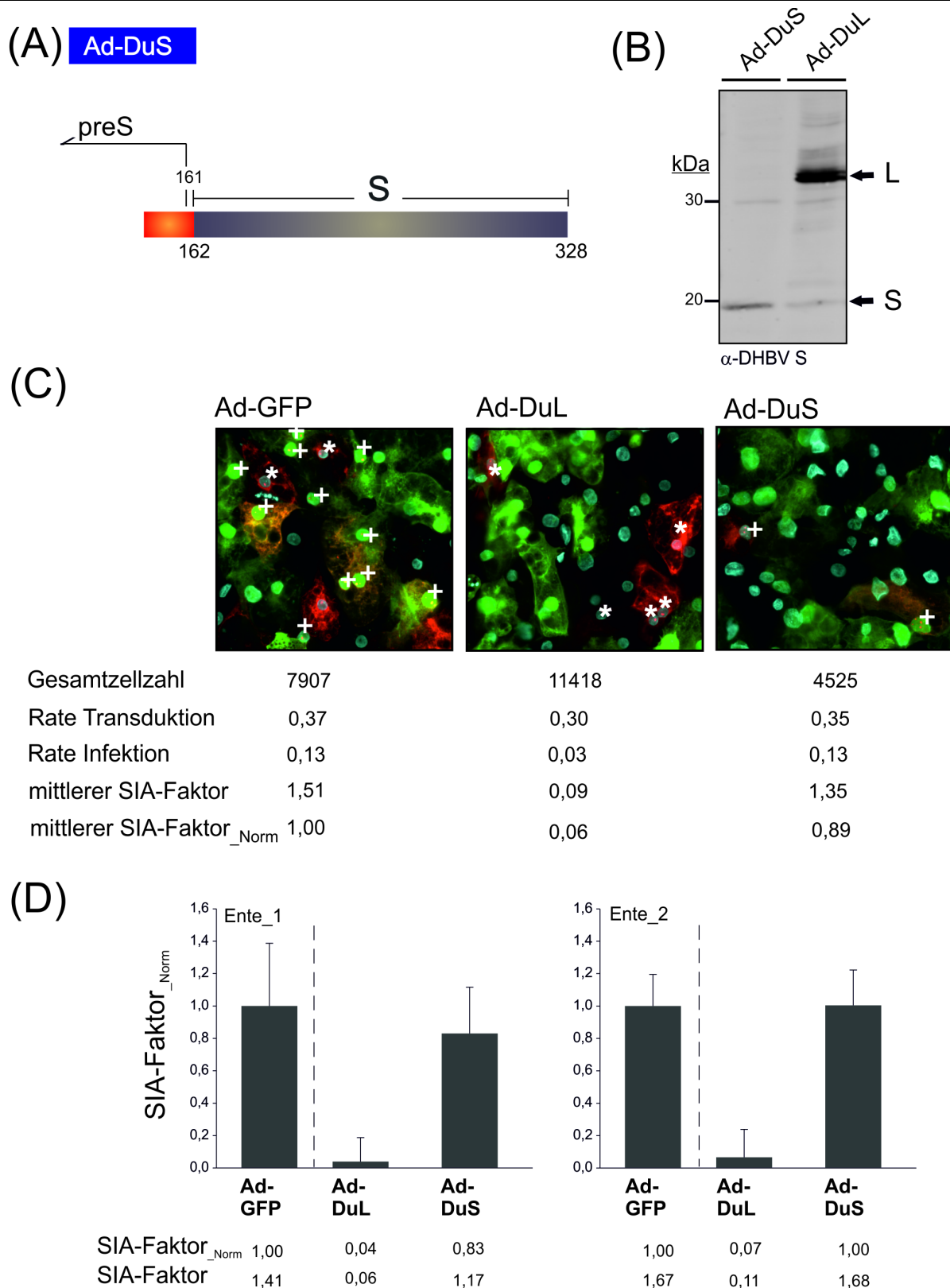


Abbildung 2-17 DHBV S-exprimierende PDHs tolerieren eine nachfolgende Überinfektion mit DHBV.

(A) Schematische Darstellung der S-Domäne von LDHBsAg, N-terminal geht pre-S voraus. Das adenovirale Konstrukt Ad-DuS kodiert nur für die hydrophobe S-Domäne. (B) Western Blot Analyse Ad-DuS-transduzierter PDHs. Hepatozyten wurden 2 Tage p.Tr. lysiert und einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Die Detektion

erfolgte mit einem monoklonalen α -DuS Erstantikörper. (C) und (D) Quantitative SIA-Analyse. Hepatozyten wurden transduziert und dann wie unter 2.3 beschrieben behandelt. Die DHBV-Infektion erfolgte mit 25 GE/Zelle. (C) Fluoreszenzbilder der IFA (Vergrößerung: 200-fach). Weiße Kreuzchen (+) markieren doppelt infizierte PDHs, weiße Sternchen (*) nur mit DHBV infizierte Zellen. Die jeweilig ausgezählte Gesamtzellzahl, Transduktions- und Infektionsraten sind neben den SIA-Faktoren tabellarisch aufgeführt. Die Ergebnisse sind gemittelte Werte aus Studien an PDHs aus 2 unabhängigen Leberpräparationen. (D) Graphische Präsentation der Ergebnisse der quantitativen IFA. Zahlen unter den Balken stellen die exakt kalkulierten SIA-Faktoren dar.

In Abbildung 2-17 C und D sind tabellarisch und graphisch die Ergebnisse der IFA-basierten SIA-Analysen an PDHs aus 2 unabhängigen Hepatozyten-Präparationen gezeigt. Ad-DuL- sowie Ad-GFP-transduzierte PDHs wurden als Kontrollen mitgeführt. Die Transduktionseffizienz fiel bei allen 3 Adenovirus-Typen ähnlich aus und lag zwischen 30 und 37 %. Bei einer Transduktionsrate von 0,37 wurden in Ad-GFP-transduzierten Kulturen 13 % der Zellen infiziert. Während die Infektionseffizienz in Ad-DuL-transduzierten Zellkulturen nur 3 % betrug, lag sie in Ad-DuS-transduzierten PDHs ebenfalls bei 13 % (Infektionsrate = 0,13). Die nach 2.3 ermittelten Parameter ins Verhältnis gesetzt, ergab sich für Ad-DuS-transduzierte und überinfizierte PDHs ein SIA-Faktor_{Ad-DuS_Norm} von 0,89, gegenüber einem Wert von 0,06 für L-exprimierende Zellen. Die entsprechenden SIA-Faktoren lagen bei 1,35 bzw. 0,09. Der entsprechende Quotient für die Ad-GFP-Kontrolle lag im Mittel bei 1,51. DuL- und DuS-exprimierende Hepatozyten divergierten somit um den Faktor 15 in ihrer Akzeptanz eine nachfolgende DHBV-Infektion zuzulassen. Ad-DuS-transduzierte Zellen wichen von der Kontrolle nur minimal (Faktor 1,12) aber nicht signifikant ab.

Zusammengefasst lassen diese Resultate den Schluss zu, dass die alleinige Expression des kleinen Hüllproteins nicht ausreicht DHBV daran zu hindern eine produktive Infektion in einer mutmaßlich bereits infizierten Zelle zu setzen. Der Verlust der pre-S-Domäne führt demnach dazu, dass L nicht mehr in der Lage ist, in Zellen eine SIR zu vermitteln. Einen synergistischen Effekt von S schließen die Daten allerdings nicht aus.

2.5.2 Mutationsanalyse zur Identifizierung von SIR-Determinanten in pre-S

Das Ergebnis aus Abschnitt 2.5.1 bestätigt indirekt eine entscheidende Rolle des pre-S Teils im L-vermittelten Infektionsausschluss. Um dies im Detail zu untersuchen, wurden verschiedene L-Mutanten generiert. Durch den Austausch einzelner Reste in pre-S wurden zum einen bereits beschriebene Determinanten wie die N-terminale Myristoylierung, die

Phosphorylierungsstelle oder auch eine mögliche Protease-Schnittstelle, mutiert. Zusätzlich wurden Deletionsmutanten hergestellt. Hierfür wurden sukzessive Deletionen von 8-12 Aminosäuren über den gesamten pre-S Bereich eingeführt, die neben dem N-Terminus, Abschnitte der Rezeptor-Binderegion sowie den Bereich, der für die Bildung umhüllter Partikel verantwortlich ist, adressierten. Eine lokale Eingrenzung involvierter Determinanten sollte so ermöglicht werden. Abbildung 2-18 gibt einen Überblick über die Art und den Umfang aller eingeführten Mutationen. Alle Mutationen wurden in den adenoviralen Kontext überführt, um analog zur Ad-DuS-Analyse (2.5.1) die Akzeptanz der Zellen gegenüber einer SI zu quantifizieren.

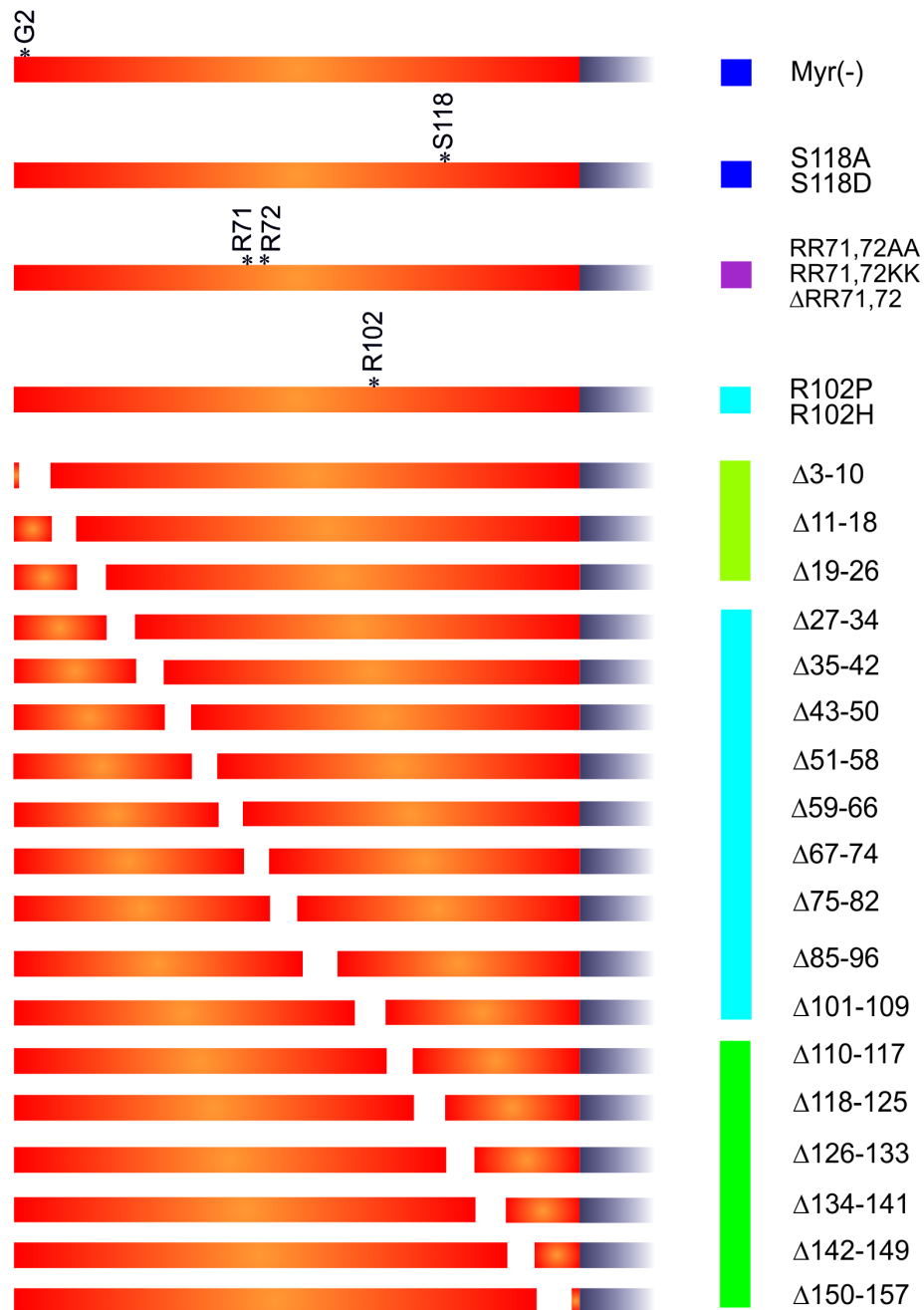
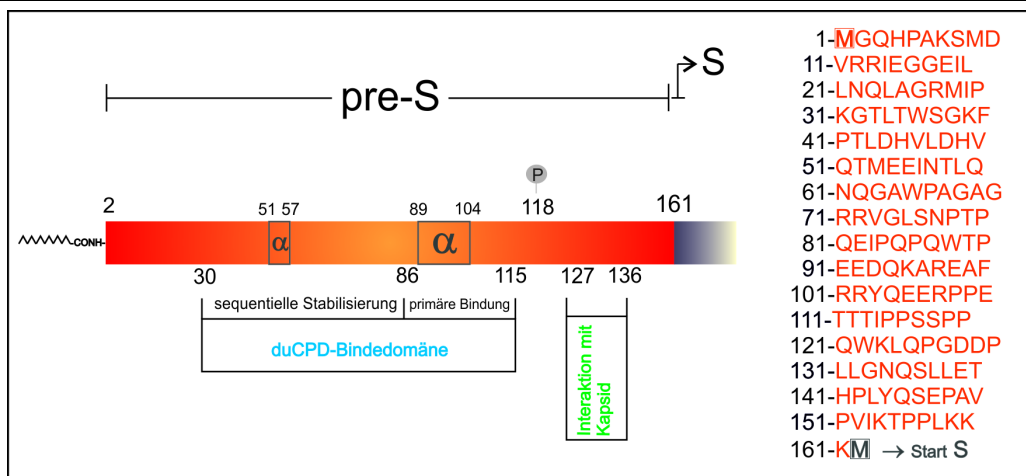


Abbildung 2-18 Schematischer Überblick über die eingeführten Mutationen in pre-S.

(Kasten) Schema der pre-S Domäne vom DHBV L-Protein anlehnend an Abbildung 1-7. (Rechts) 161 aa-lange Primärsequenz von pre-S. Die Methionine für pre-S und S sind hervorgehoben. (Unten) Schematische Darstellung der generierten Konstrukte. Sternchen markieren aa-Positionen, die in der Mutationsanalyse adressiert wurden. Aufgezeigt sind die einzelnen aa-Austausche bzw. Deletionen von 8-12 Resten. Farblich unterschieden sind die Regionen N-Terminus (hellgrün), duCPD-Bindestelle (hellblau) sowie der Bereich, der die Bildung umhüllter Partikel reguliert (dunkelgrün).

2.5.2.1 Analyse des SIA-Phänotyps der L-Protein Mutanten Myr(-) und S118A,D

Im ersten Teil der Mutationsanalyse wurde die mögliche Rolle der posttranslationalen Modifikationen von pre-S, nämlich durch Myristoylierung und Phosphorylierung, untersucht.

Analyse der Rolle der Myristoylierung von pre-S für den DHBV SIA-Phänotyp

Die Myristoylierung der pre-S-Domäne hat eine entscheidende Funktion für die biologische Aktivität des L-Proteins. Die kovalente Assoziation von Myristinsäure an Gly2 ist nämlich für die Infektiosität der Viren von essentieller Bedeutung. Das Ausbleiben dieser posttranslationalen Modifizierung resultiert in einem drastischen Verlust der Infektiosität *in vivo* und *in vitro*^{198,82}. Von DHBV pre-S abgeleitete synthetische Peptide zeigen in Infektionsinhibitionsstudien ein hohes Potential eine DHBV-Infektion zu inhibieren, wobei ihre inhibitorische Aktivität um mindestens das 100-fache gesteigert ist, wenn ihr N-Terminus myristoyliert ist^{175,182}.

Ein mögliches proteolytisches Freisetzen eines ebensolchen myristoylierten Peptids in der infizierten Hepatozyte, mit der Konsequenz einer inhibitorischen Aktivität des Peptids gegenüber einer nachfolgenden DHBV-Infektion, wäre demnach denkbar. Die Auswirkung einer fehlenden Myristoylierung von pre-S auf den L-vermittelten Infektionsausschluss wurde daher in den folgenden Experimenten untersucht. Das Konstrukt Ad-DuL_Myr(-) wurde durch die Einführung eines Alanins anstelle des Glycins an Position 2 generiert, wodurch die Myristoylierung verhindert wird (Abbildung 2-19 A)⁸². Der Nachweis der heterologen Proteinexpression zeigt (Abbildung 2-19 B), dass Muster und Laufverhalten von DuL_Myr(-) denen von L_{wt} entsprach.

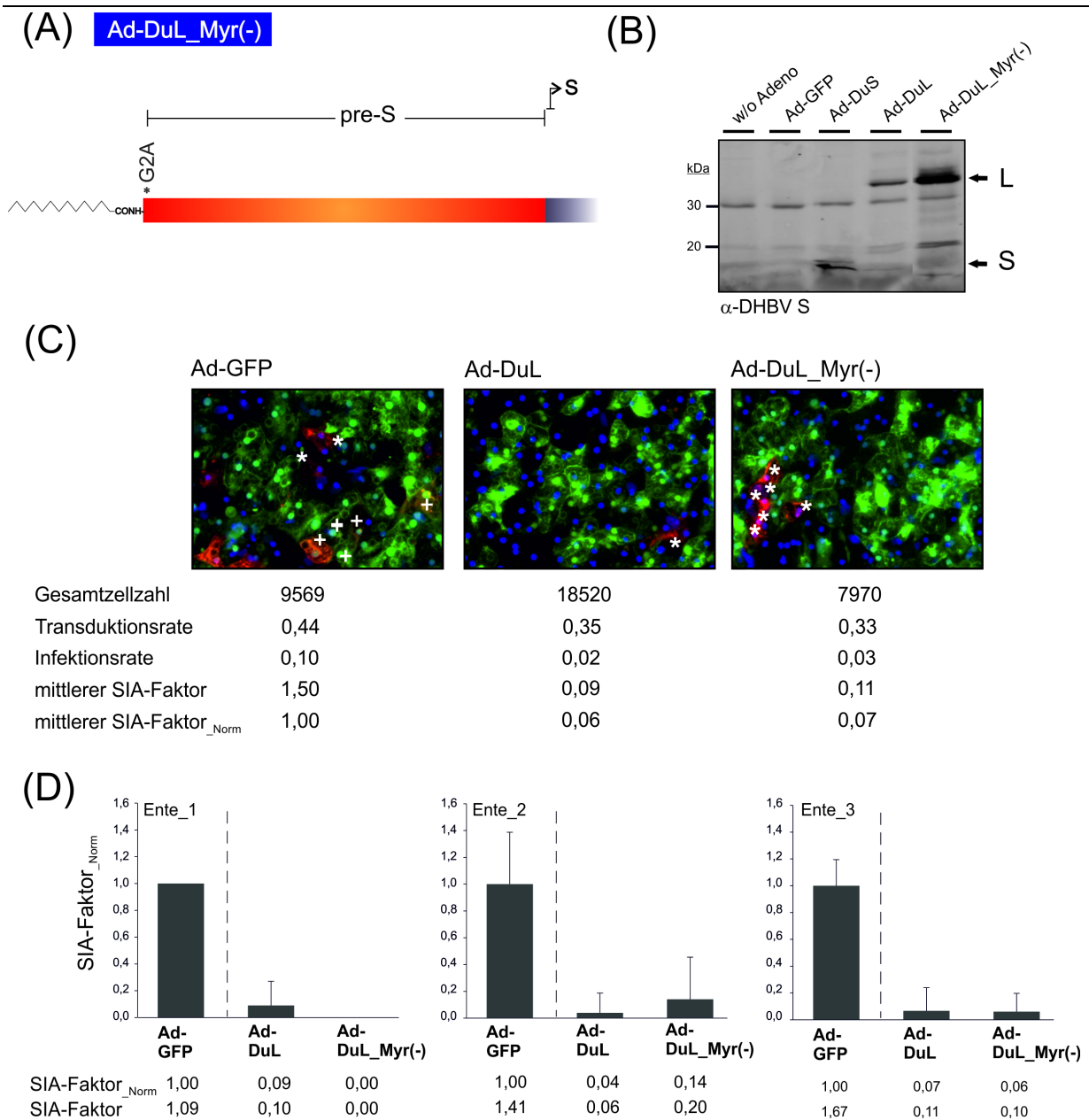


Abbildung 2-19 Die Myristoylierung von pre-S hat keinen Einfluss auf die L-Protein-vermittelte SIR.

(A) Schematische Präsentation des generierten adenoviralen Konstrukts Ad-DuL_Myr(-). Der Austausch Gly→Ala an Position 2 resultiert im Ausbleiben der Myristoylierung von pre-S. (B) Western Blot Analyse der Transgenexpression in PDHs. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen α -S-Erstantikörper. Untransduzierte (w/o Ad), Ad-GFP-, Ad-DuS- und Ad-DuL-transduzierte PDHs wurden ebenfalls analysiert. (C) und (D) SIA-Analysen an Ad-DuL_Myr(-)-transduzierten PDHs aus 3 unabhängigen PDH-Präparationen (Ente_1-3). PDHs wurden wie in Abschnitt 2.3 transduziert und mit DHBV-haltigem Serum (Ente_1 = 50, Ente_2-3 = 25 GE/Zelle) überinfiziert. Die Zellen wurden 4 (Ente_1) bzw. 6 Tage (Ente_2 und 3) p.Inf. einer IFA-basierten SIA-Analyse unterzogen. (C) Die Immunfluoreszenzbilder sind exemplarisch für alle 3 Präparationen ausgewählt, zeigen aber Zellen der Ente_1-Präparation. Werte in der Tabelle repräsentieren Mittelwerte der Resultate aller 3 Präparationen. Die Resultate sind in (D) graphisch dargestellt, präsentiert sind die SIA-Faktoren_{Norm}. Die Auswertung erfolgte analog zu den unter 2.5.1 gezeigten Analysen.

Die Untersuchungen zur Superinfizierbarkeit DuL_Myr(-)-exprimierender Hepatozyten zeigten reproduzierbare Ergebnisse. In 3 analog durchgeführten Studien (Abbildung 2-19 D, Ente_1-3) lagen die resultierenden SIA-Faktoren zwischen 0,00 und 0,2 und somit maximal 3,33-fach höher als bei Zellen, welche mit Ad-DuL transduziert worden waren (Ente_2: 0,06 → 0,2). Die Zahl superinfizierter Zellen lag bei 1,3 Zellen, bei Ad-DuL-transduzierten Zellen bei 0,6 Zellen pro 1000 Hepatozyten (Daten nicht gezeigt). Die insgesamt nur 1 (Ad-DuL) bzw. 2 (Ad-DuL_Myr(-)) gezählten doppelt infizierten Zellen erklären diese Schwankung. Der mittlere SIA-Faktor von 0,11 wich nur um das 1,2-fache von dem Ad-DuL-exprimierender Zellen ab (= 0,09). Nach Normalisierung resultierte ein SIA-Faktor_{Norm} von 0,07. 14-fach höher lag im Mittel der Wert der entsprechenden GFP-Kontrolle. Die Immunfluoreszenzbilder im Abbildungsteil C veranschaulichen die Ergebnisse.

Die fehlende Myristinsäure an pre-S führt demzufolge nicht zu einer gesteigerten Akzeptanz von Hepatozyten gegenüber einer weiteren Infektion. Diese Modifizierung von L leistet somit keinen Beitrag zum effektiven Ausschluss einer DHBV-SI.

Analyse der Rolle der Phosphorylierung von pre-S für den SIA-Phänotyp von DHBV

Die hepadnavirale Replikationsstrategie ist ein gut ausbalanciertes System. In seinem nichtzytopathischen Charakter ist der virale Infektionsszyklus dahingehend optimiert, eine produktive und persistierende, nicht aber offensichtliche Infektion zu durchlaufen. Die virale Genexpression zeigt sich dabei variabel und passt sich dem aktuellen Zustand der Wirtszelle an. Generell spricht dies für die Existenz eines intrazellulären „*crosstalks*“ von Virus und Wirtszelle, welcher dieses optimierte „Zusammenspiel“ von Wirtszelle und Pathogen ermöglicht⁹⁶. DHBV L wird als einziges Oberflächenprotein phosphoryliert (P35→PP36), wobei die Modifizierung von MAP-Kinasen vom ERK-Typ übernommen und durch extrazelluläre Stimuli induziert wird^{192,96}. Wie durch Rothmann *et al.* gezeigt, korreliert der Phosphorylierungszustand von L dabei mit einer bis dato ungeklärten transaktivierenden Funktion des Proteins, die maßgeblich am erwähnten „*crosstalk*“ beteiligt sein könnte. Der aktive Ausschluss einer Superinfektion könnte für die Balance zwischen den Interessen beider Parteien (Virus vs. Wirtszelle) einen entscheidenden Beitrag leisten.

Mit der folgenden Mutationsanalyse wurde untersucht, ob der Phosphorylierungsstatus von L, und folglich die transaktivierende Aktivität des großen Hüllproteins, im Ausschluss der SI eine Rolle spielt. Anlehnend an die Mutationsanalysen von Rothmann *et al.* wurden die

Konstrukte Ad-DuL_S118A bzw. Ad-DuL_S118D generiert, wobei durch den Austausch von Serin zu Alanin die Eliminierung der Phosphorylierungsstelle herbeigeführt wurde. Die Einführung eines Aspartats anstelle des Serins ($S \rightarrow D$) sollte die Funktion einer konstitutiven Phosphorylierung von L nachahmen⁹⁶.

In der Western Blot Analyse (Abbildung 2-20 B) zeigen die L-Mutanten ein zu L_{wt} analoges Bandenmuster. Das Einführen einer negativen Ladung in Form des Aspartats resultierte in einer leicht reduzierten Mobilität der L-Mutante DuL_S118D während der elektrophoretischen Auftrennung.

Die Resultate der SIA-Analysen (Abbildung 2-20 C und D), die an PDHs aus 2 unabhängigen Leberpräparationen durchgeführt wurden zeigen, dass die Eliminierung der Phosphorylierungsstelle (S118A) keinen SIA-Phänotyp induziert, der sich signifikant von dem des Wildtyps unterscheidet. In beiden Untersuchungen war nur eine Abweichung um den Faktor 1,4 (Ente_1: $0,21 \rightarrow 0,15$) bzw. 1,5 (Ente_2: $0,09 \rightarrow 0,06$) messbar, ein Vergleich der mittleren SIA-Faktoren zeigte nur eine Abweichung um den Faktor 1,2 ($0,11 \rightarrow 0,09$). Deutlich hingegen, nämlich um den Faktor 13 ($1,42 \rightarrow 0,11$), wich die Mutante im Mittel von der GFP-Kontrolle ab (Ente_1 = Faktor 7; Ente_2 = Faktor 16). Das Ergebnis der parallel durchgeführten Untersuchungen an Ad-DuL_S118D-exprimierenden Hepatozyten fiel sehr ähnlich aus. Im Mittel wich der Phänotyp dieser Mutante von dem der Alanin-Mutante um den Faktor 1,3 ($0,14 \rightarrow 0,11$), vom Wildtyp wich sie um den Faktor 1,6 ($0,14 \rightarrow 0,09$) ab.

Die beiden Analysen separat betrachtet resultierte im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle (Ad-DuL) eine Abweichung um den Faktor 1,3 (Ente_1: $0,2 \rightarrow 0,15$) bzw. 1,8 (Ente_2: $0,11 \rightarrow 0,06$). Im Vergleich zu Ad-GFP-transduzierten Zellen zeigte sich die Akzeptanz der Mutante gegenüber einer SI im Mittel auf residuale 10 % ($1,42 \rightarrow 0,14$) der Kontrolle gesenkt (Ente_1 = Faktor 7,5; Ente_2 = Faktor 13). Zusammengefasst zeigte sich die Aspartat-Mutante wie erwartet nicht abweichend vom SIA-Phänotyp des Wildtyps.

Da die Eliminierung der hauptsächlichen Phosphorylierungsstelle in pre-S in keinem vom Wildtyp abweichenden SIA-Phänotyp resultierte, kann an dieser Stelle das Fazit gezogen werden, dass der erfolgreiche Ausschluss einer SI unabhängig vom Phosphorylierungsstatus bzw. von der transaktivierenden Aktivität von L passiert.

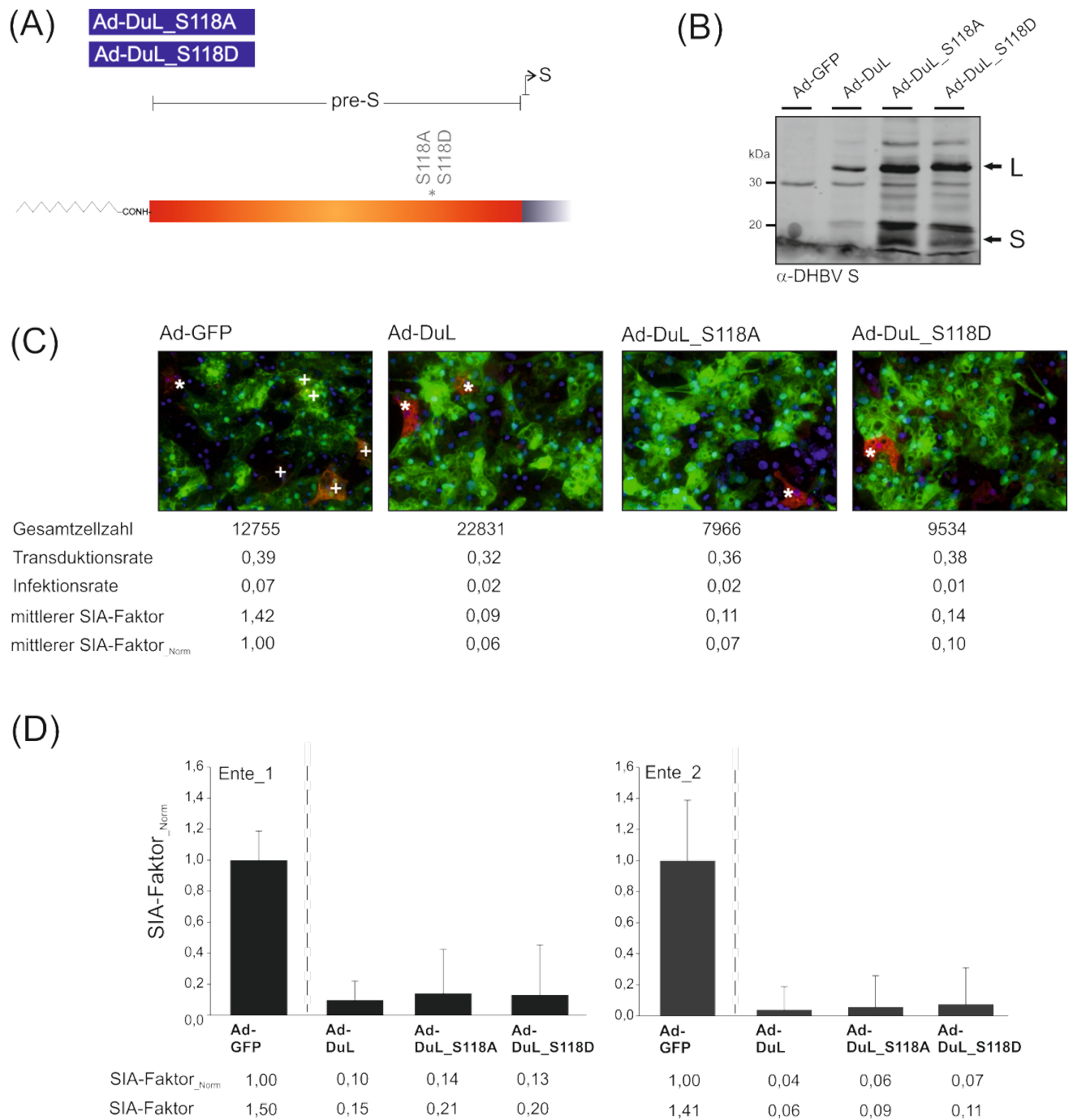


Abbildung 2-20 Die Eliminierung der Phosphorylierung an Ser118 resultiert im Wildtyp SIA-Phänotyp.

(A) Schematische Präsentation der adenoviralen Konstrukte Ad-DuL_S118A und Ad-DuL_S118D. Die Punktmutationen resultieren im Ausbleibenden der Phosphorylierung (S→A) bzw. einer Nachahmung (S→D) der Phosphorylierung von pre-S. Transduzierte PDHs wurden mit 25 GE DHBV-haltigem Serum pro Zelle überinfiziert. Die Zellen wurden 6 Tage später fixiert und einer IFA-basierten SIA-Analyse unterzogen. (C) Die Immunfluoreszenzbilder sind exemplarisch für beide Präparationen ausgewählt, sind aber PDHs der Ente_1-Präparation. Die Präsentation der Ergebnisse ist analog zu der aus vorangehenden Analysen.

2.5.2.2 Analyse des SIA-Phänotyps von DuL-Mutanten mit fehlender putativer Schnittstelle in pre-S

In infizierten Entenlebern taucht neben den Hauptprodukten des pre-S/S-Gens, P36 (pre-S/S) und P17 (S), eine weitere quantitativ ebenfalls dominante pre-S Spezies mit einem Molekulargewicht von 28 kDa (P28) auf. Mutationsanalysen konnten aufzeigen, dass P28 sehr wahrscheinlich nicht durch Translation, sondern durch einen proteolytischen Abbau des L-Proteins entsteht¹⁹⁹. Da P28 mit einem S-spezifischen Antikörper, nicht aber mit dem pre-S-spezifischen Antiserum MT92 (Eptitop aa 2-22) detektiert werden kann, ist davon auszugehen, dass es sich um ein N-terminal verkürztes Degradationsprodukt von L handelt²⁰⁰. Weiterführende Untersuchungen führten zu der Identifizierung einer möglichen Schnittstelle im L-Protein an den Argininresten 71 bzw. 72¹⁷⁷. Das Entfernen dieser putativen Proteaseschnittstelle bringt im viralen Kontext den vollständigen Verlust der Infektiosität mit sich, beeinträchtigt aber nicht die Virusbindung an duCPD oder an Hepatozyten¹⁷⁷.

Ausgehend von der Idee, dass nach oder während der Virusaufnahme in die Zelle eine proteolytische Prozessierung des großen Hüllproteins erfolgt, welche (neben der Freisetzung des Viruspartikels z.B. vom gebundenen Rezeptorkomplex) zur Freisetzung eines N-terminalen Peptids führen könnte, welches seinerseits wiederum in der Lage wäre, eine DHBV-Infektion zu inhibieren (siehe 2.5.2.1), wurden an dieser Stelle 3 verschiedene DuL-Mutanten generiert und ihr SIA-Phänotyp analysiert. In 2 Ansätzen wurde die putative Schnittstelle entweder durch i) die Deletion der Reste Arg71 und Arg72 (Ad-DuL_ΔRR71,72) oder ii) den Austausch gegen Alanine (Ad-DuL_RR71,72AA) zerstört. Im dritten Ansatz erfolgte ein konservativer Austausch der Arginine gegen Lysinreste (Ad-DuL_RR71,72KK). Um die Notwendigkeit einer funktionellen Schnittstelle in pre-S für die SIR zu studieren, wurden rekombinante Adenoviren hergestellt und die Expressions- und Infektionsanalysen analog zu den vorangehenden Experimenten durchgeführt. Die Resultate sind zusammengefasst in Abbildung 2-21 dargestellt.

Wie am Ergebnis der Immunoblot Analyse zu sehen, weicht das Expressionsmuster der 3 Mutanten prinzipiell nicht von dem von L_{wt} ab (Abbildung 2-21 B). Wie zu erwarten resultiert das Entfernen von 2 Resten im Fall der Mutante DuL_ΔRR71,72 in einer leicht beschleunigten Mobilität in der Elektrophorese.

Die graphische Auswertung der SIA-Analysen aus je 2 unabhängigen PDH-Präparationen zeigte für die 3 Mutanten ebenfalls keine wesentliche Divergenz zu L_{wt}-transduzierten Hepatozyten: Der Austausch der beiden Arginine gegen Lysine an Position 71 und 72

resultierte zwar im Fall der KK-Mutante in einer maximalen Abweichung zum SIA-Faktor_{Norm} DuL-exprimierender Zellen um den Faktor 5,25 (Ad-DuL_{RR71,72KK}, Ente₂: 0,21 → Ad-DuL: 0,04). Dieses Ergebnis ließ sich aber an Zellen der zweiten Leberpräparation nicht reproduzieren, im Gegenteil, Zellen, die die Mutante exprimierten, wiesen eine geringere SIA auf als Ad-DuL-transduzierte PDHs (Ad-DuL_{RR71,72KK}, Ente₁: 0,06 → Ad-DuL: 0,09 → Faktor 0,66). Mit einem mittleren SIA-Faktor_{Norm} von 0,18 war die Akzeptanz gegenüber einer SI im Vergleich zu Ad-DuL-exprimierenden Zellen 4,5-fach erhöht. Die Kontrollzellen (Ad-GFP) zeigten sich immer noch 5,6-fach toleranter als Ad-DuL_{RR71,72KK}-transduzierte Zellen gegenüber einer Zweitinfektion (Ad-GFP: 1,42 → Ad-DuL_{RR71,72KK}: 0,25).

Das Entfernen der Schnittstelle durch Ersetzen der Arginine oder Deletion der beiden Arginine erbrachte ähnliche Ergebnisse: Die Expression der Mutante Ad-DuL_{RR71,72AA} zeigte an PDHs der Ente₂ ebenfalls eine tendenziell stärkere Abweichung zum Wildtyp. Mit einem SIA-Faktor_{Norm} von 0,16 führte ihre Expression im Vergleich zu L_{wt}-exprimierenden PDHs zu einer 4-fach erhöhten SI-Akzeptanz (Ad-DuL_{RR71,72AA}, Ente₂: 0,16 → Ad-DuL: 0,04). Für Zellen aus der gleichen PDH-Präparation ergab die Expression der Deletionsmutante einen normierten SIA-Faktor von 0,05, der damit nicht nennenswert vom Wildtyp abwich (Faktor 1,3 = Ad-DuL_{Δ71,72}, Ente₂: 0,05 → Ad-DuL: 0,04). In der auch hier analog durchgeführten zweiten Studie (Ente₁) zeigte sich mit SIA-Faktoren_{Norm} von 0,01 (Ad-DuL_{RR71,72AA}) bzw. 0,00 (Ad-DuL_{Δ71,72}) gegenüber 0,1 (Ad-DuL) ebenfalls ein anderes Bild. Die im Mittel resultierenden SIA-Faktoren_{Norm} von 0,1 für die AA-Mutante und 0,04 für die Δ-Mutante lagen damit 1,7-fach höher bzw. 0,7-fach niedriger als die von DuL (SIA-Faktor_{Norm} = 0,06). Mit den entsprechenden Ad-GFP-transduzierten Kontrollzellen (SIA-Faktor = 1,4) verglichen, lagen die SIA-Faktoren der beiden L-Mutanten 10- (Ad-DuL_{RR71,72AA}: SIA-Faktor = 0,14) bzw. 28-fach (Ad-DuL_{Δ71,72}: SIA-Faktor = 0,05) niedriger.

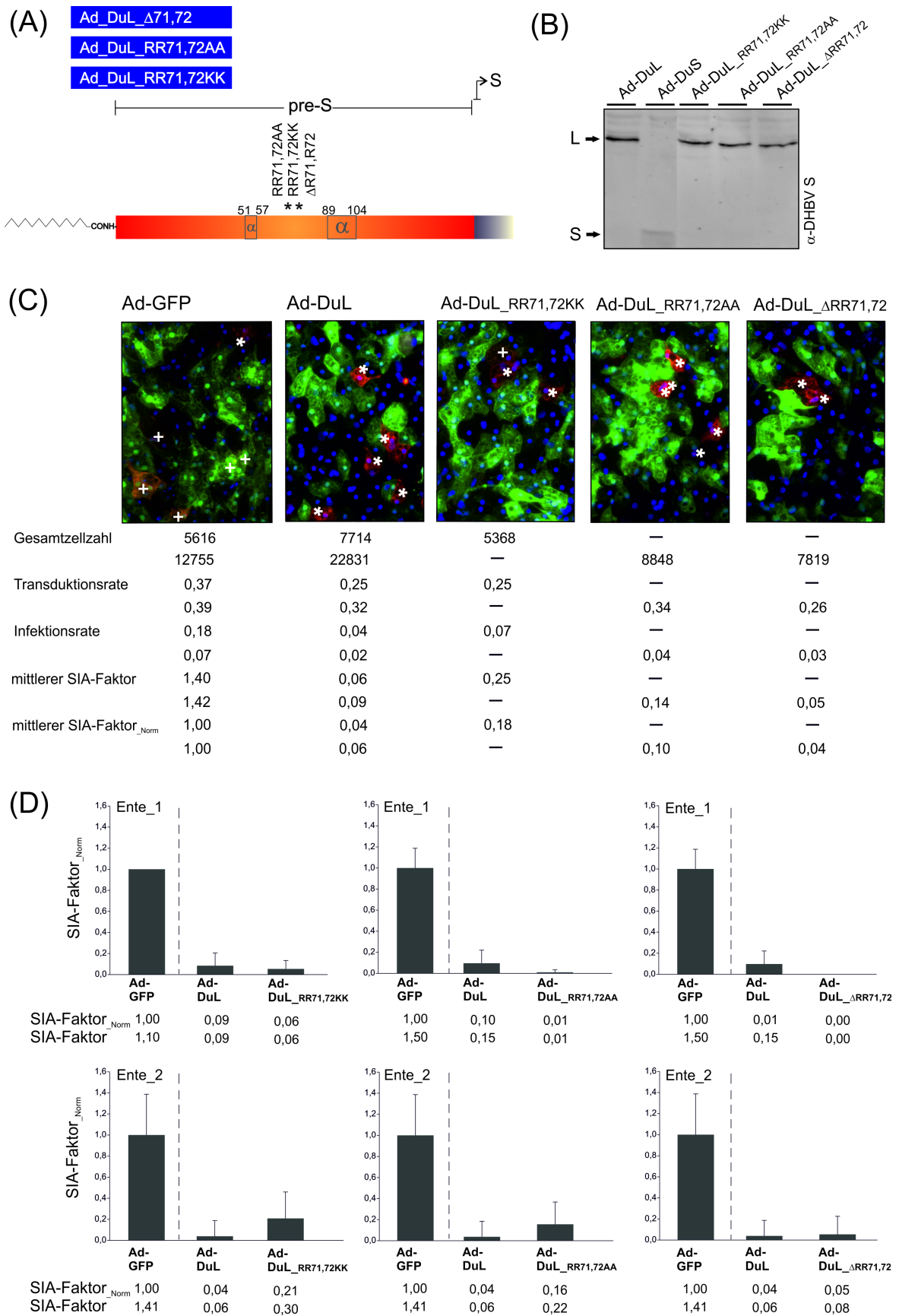


Abbildung 2-21 Ein proteolytischer Verdau des L-Proteins an der putativen Schnittstelle RR71,72 spielt keine Rolle im Ausschuss einer DHBV-Superinfektion.

(A) Schematische Präsentation der eingeführten Mutationen bzw. Deletionen an den Positionen R71 und R72. Die 3 adenoviralen Konstrukte wurde generiert und die Transgenexpression nach Transduktion analog zu 2.5.2.1 im Western Blot (B) und fluoreszenzmikroskopisch (C) analysiert und ausgewertet. (C) und (D) zeigen die Resultate der IFA-basierten SIA-Analysen an Zellen aus 2 unabhängigen PDH-Präparationen (Ente_1 und 2). PDHs wurden transduziert und mit DHBV-haltigem Serum (Ente_1 bei RR71,72KK = 50, Rest = 25 GE/Zelle) überinfiziert. Die Zellen wurden 5 (Ente_1 RR71,72KK) oder 6 Tage (AA- und Δ -Mutanten) später einer IFA-basierten SIA-Analyse unterzogen. Die Immunfluoreszenzbilder in (C) sind exemplarisch für beide Präparationen ausgewählt, sind aber PDHs der Ente_1-Präparation.

Die Erklärung für die messbar gestiegene Anzahl superinfizierter Zellen bei allen 3 Mutanten in der Studie an Zellen der Leber von Ente_2 ist in der Verwendung niedrigtitrigerer Adenovirusstocks zu finden. Die resultierenden Transduktionsraten waren nur etwa halb so hoch wie im Versuch an Zellen der Ente_1 (Transduktionsraten Ente_2 vs. Ente_1: RR71,72KK = 0,18 vs. 0,32; RR71,72AA = 0,23 vs. 0,46; Δ 71,72 = 0,17 vs. 0,36). Die Anzahl transduzierender Adenoviren pro Zelle und die daraus resultierende Menge an synthetisiertem L reichte wahrscheinlich nicht aus, um die DHBV-Infektion vollständig auszuschließen, obwohl das Potential der L-Mutanten dafür prinzipiell gegeben war.

Zusammengefasst zeigte sich die Kompetenz der hier untersuchten L- Mutanten nicht signifikant reduziert eine weitere DHBV-Infektion von Hepatozyten erfolgreich zu verhindern. Die putative Schnittstelle RR71,72, bzw. die postulierte proteolytische Prozessierung von L, sind für den SIR-Mechanismus demnach irrelevant.

2.5.2.3 Analyse der Rolle der Virus/Rezeptor-Interaktion für den Ausschluss einer Superinfektion

Es ist bekannt, dass im Verlauf einer DHBV-Infektion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die intrazelluläre Menge der Rezeptorkomponente duCPD signifikant abnimmt und, wie Breiner und Kollegen zeigen konnten, geschieht dies in einer L-abhängigen Art und Weise. Das daraus resultierende Modell geht von einer frühen Interaktion von Rezeptor (duCPD) und viralem Ligand (pre-S) im Biosyntheseweg des Rezeptormoleküls aus, wobei es zur Komplexbildung mit L in einem pre-Golgi Kompartiment kommt, gefolgt von der Degradation von duCPD¹⁷⁹. Denkbar wäre, dass die L-vermittelte Herabregulierung dazu führt, dass die reduzierte duCPD-Menge dem Virus nicht ausreicht, um eine zweite produktive Infektion zu setzen. Damit würde sich DHBV einem SIR-Mechanismus bedienen, nämlich der Herabregulierung des viralen Rezeptors, der für Viren wie z.B. HIV bereits umfangreich beschrieben ist (für Übersichtsartikel siehe Ref.²⁰¹). Nachfolgende

Infektionsstudien mit genetisch markiertem DHBV (DHBV-ClaI) durch Walters *et al.* konnten zwar die L-vermittelte Superinfektionsresistenz infizierter Hepatozyten bestätigen, interessanterweise resultierte die Expression einer L-Mutante mit einer 17 AS-Deletion (Δ 83-109) im Ausschluss der SI trotz des Verlusts der duCPD-Bindefähigkeit dieser Mutante und dem damit einhergehenden Verlust der Fähigkeit den Rezeptors herabzuregulieren.

Für die Komplexbildung von pre-S und duCPD wird ein 2-Stufen-Mechanismus postuliert, wobei die C-terminale Region (aa 86-115) der duCPD-Bindedomäne die Entstehung eines niedrigaffinen Primärkomplexes initiiert und somit den essentiellen Rezeptor-Bindebereich darstellt. Die Stabilisierung des Komplexes wird nachfolgend durch den weiter N-terminal gelegenen Bereich (aa 30-85) vermittelt (siehe Schema in Abbildung 2-22 A, rechts)^{175,171}. Es zeigte sich für den gesamten Sequenzbereich der Bindedomäne, dass schon kleine interne Deletionen drastische Auswirkungen auf die Konformation des Komplexes haben und die Interaktion drastisch negativ beeinflussen¹⁷⁸. Ausgehend von diesen Grundlagen wurden Deletionen von 8-12 Aminosäuren sowie einzelne Punktmutationen in den stabilisierenden und den essentiellen Bereich der Binderegion eingeführt (Abbildung 2-22 A). Im stabilisierenden Bereich umfassten die Deletionen jeweils 8 Reste und betrafen den Sequenzbereich zwischen aa 27 und aa 82 (Δ 27-34, [...], Δ 75-82). Für den essentiellen Bindebereich wurden neben 8-aa-Deletionsmutanten auch solche mit 9 bzw. 12 (Δ 85-96 bzw. Δ 101-109) deletierten Resten generiert. Um die Rolle des Argininrests an Position 102 näher zu untersuchen, wurden 2 Mutanten mit jeweils unterschiedlichen Punktmutationen an dieser Stelle hergestellt. Für den Aminosäurebereich aa 89-104 wird, basierend auf Algorithmen, sowie auf Circular dichroismus- und NMR-spektroskopischen Analysen, eine alpha-helicale Struktur mit amphipathischen Charakter vorausgesagt¹⁷¹. Wie Arbeiten unseres Labors zeigten, resultiert bereits die Einführung eines Prolins anstelle des basischen Arginins (R \rightarrow P) an dieser Position in einem Verlust der duCPD-Bindefähigkeit von pre-S. Die generierte Mutante Ad-DuL_R102P kodiert demnach für ein duCPD-bindedefizientes L-Protein. Die L-Mutante DuL_R102H, bei der ein konservativer Aminosäureaustausch (R \rightarrow H) eingeführt wurde, diente als Kontrolle. Im viralen Kontext und in der Kapazität den Rezeptor zu binden, zeigt dieser Austausch keinen vom Wildtyp-L abweichenden Phänotyp¹⁷⁷. Die hiesige Mutationsanalyse sollte dazu dienen die Notwendigkeit einer Interaktion von pre-S und duCPD in der L-vermittelten SIR zu untersuchen und zwar in quantitativer und auch deutlich detaillierterer Art und Weise als bisher geschehen. Die differenzierte Betrachtung der beiden Subregionen sowie nur einzelner Reste in der Bindedomäne unterstreichen dies.

Vor der IFA-basierten SIA-Analyse (Abbildung 2-23 und Abbildung 2-24) erfolgte auch hier zunächst der Nachweis der Transgenexpression. Die Ergebnisse der Immunoblot Analysen in Abbildung 2-22 B zeigen, dass alle Mutanten erfolgreich generiert und in PDHS exprimiert werden konnten. Die eingeführten Deletionen resultierten im Vergleich zu L_{wt} in einem reproduzierbaren und unterschiedlich stark abweichenden Laufverhalten bzw. Bandenmuster. Wie zu erwarten führten die 8-aa-Deletionen im stabilisierenden Bereich der Binderegion zu einer leicht beschleunigten Mobilität der Polypeptide in der Gelelektrophorese. Die L-Mutanten mit Veränderungen im essentiellen duCPD-Bindebereich betrachtend, zeigte die 12-aa-Mutante $\Delta 85-96$ zelltypunabhängig einen noch deutlicheren Zugewinn an Mobilität. Eine Deletion des Bereichs aa 101-109 führte im Gegensatz dazu zu einem verlangsamten Laufverhalten der Mutante Ad-DuL_ $\Delta 101-109$ im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletion von 3 Argininresten in diesem Bereich (R101, R102, R107, siehe Abbildung 2-18), an welche sich SDS als anionisches Detergenz präferenziell anlagert, könnte hierfür verantwortlich sein.

Das Bandenmuster der 8-aa-Deletionsmutante Ad-DuL_ $\Delta 110-117$ zeigte dazu abweichend das Auftreten der L-Proteinbande als Doppelbande mit Molekulargewichten von etwa 34 und 36 kDa. Abgesetzt davon konnte eine dritte deutlich schwächere Bande mit einer Größe von etwa 37 kDa (siehe Pfeile) detektiert werden. Von der Deletion sind 2 Prolinreste (P115, P116) betroffen, was sich, abgesehen von der Deletion als solche, in einer veränderten Mobilität des Proteins im Gel bemerkbar machen kann. Des Weiteren ist durch Wegfall der Reste P116 und S117 das konservierte Motiv (P(S/T)SP) um die Phosphorylierungsstelle S118 betroffen. Grgacic und Kollegen zeigten, dass zwar die Mutation von S117, nicht aber eine Mutation von P116, für eine Phosphorylierung von pre-S akzeptiert wird²⁰². Ein veränderter Phosphorylierungsstatus von L könnte somit auch das abweichende Bandenmuster der Mutante Ad-DuL_ $\Delta 110-117$ im Immunoblot erklären. Bei der Punktmutante R102P resultierte der Austausch des Arginins gegen ein Helix-brechendes Prolin in einer leicht verlangsamten Mobilität der Mutante. Die spezifische Identifizierung dieser L-Mutante durch 2 verschiedene Antikörper ist ebenfalls in Abbildung 2-22 präsentiert (Abbildung 2-22, B, rechter Blot). Während das Antiserum D084 ein polyklonales Serum ist, liegt das Epitop des verwendeten monoklonalen Antikörpers 1H.1 zwischen aa 101-109^{203,177}. Der Austausch von Arginin zum Helixbrecher Prolin resultiert folglich im Verlust der Erkennung durch den Antikörper. Die analoge Histidin-Mutante Ad-DuL_ $\Delta R102H$ zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine Abweichungen.

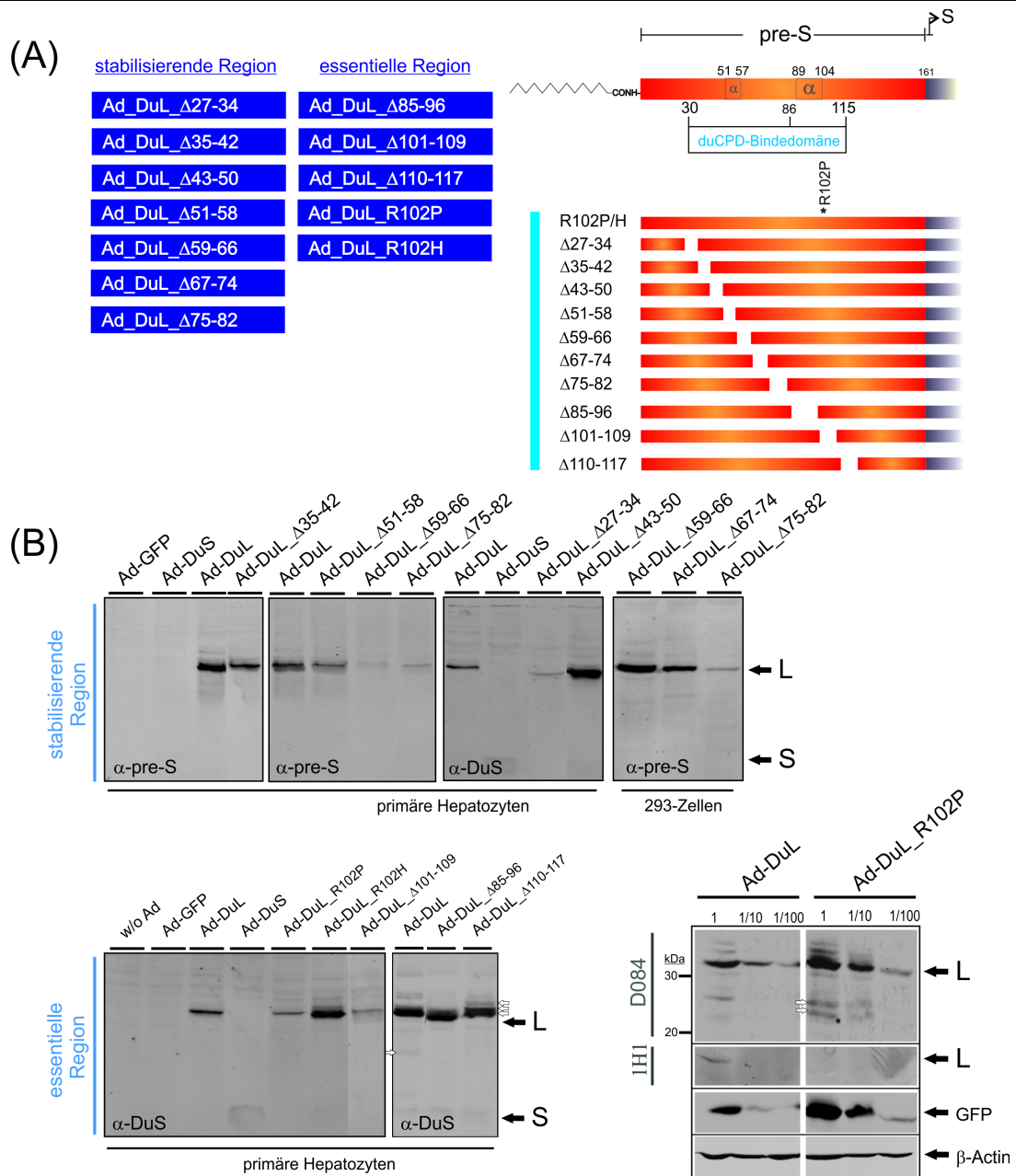


Abbildung 2-22 Expressionsanalyse der adenoviralen L-Konstrukte mit Punktmutationen bzw. Deletionen in der duCPD-Binderegion (aa 30-115) von pre-S.

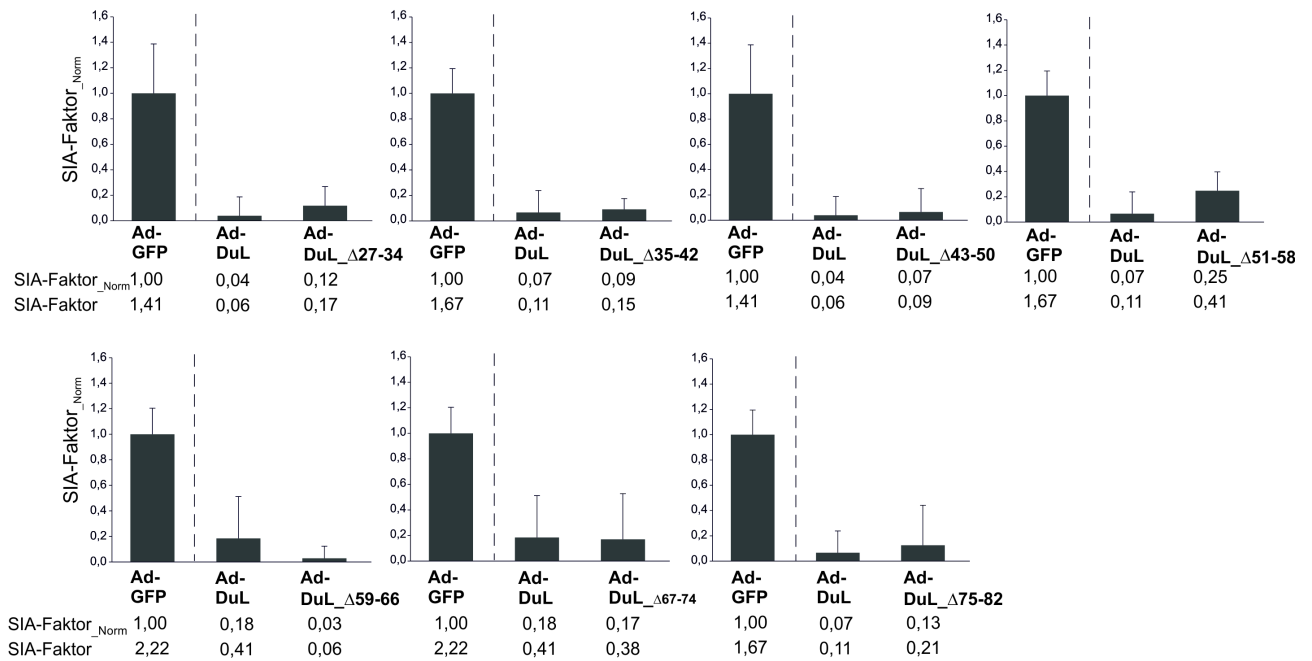
(A) Schema der generierten Mutanten mit Deletionen von je 8 aa in der stabilisierenden duCPD-Binderegion (aa 30-85) bzw. mit Deletion von 8-12 aa oder Punktmutationen in der essentiellen Rezeptor-Binderegion (aa 86-115) von pre-S. (B) Western Blot Analyse zur Transgenexpression. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen α -pre-S bzw. einem monoklonalen α -DuS Erstantikörper. Die PDHs entstammten unterschiedlichen Präparationen. Für die Mutanten Δ 59-66, Δ 67-74 und Δ 75-82 ist ein zusätzlicher Nachweis der Expression in 293-Zellen gezeigt. Die variierenden Expressionslevel sind mit unterschiedlichen Virustitern zum Zeitpunkt der Expressionsanalyse zu erklären. Für die Mutante Ad-DuL_R102P ist eine Spezifitätsanalyse in einer Verdünnungsreihe auf 293-Zellen mit 2 α -pre-S Primärantikörpern (D084, polyklonal; 1H.1 monoklonal) gezeigt (siehe Text). Der Nachweis von GFP bzw. β -Actin mit entsprechenden Antikörpern diente als Ladekontrolle.

Die SIA-Analyse erfolgte für die Konstrukte mit Deletionen im **stabilisierenden Bereich der duCPD-Binderegion** von pre-S an PDHs aus jeweils einer Leberzellpräparation (siehe Abbildung 2-23). Die Transduktionen resultierten in Effizienzzraten zwischen 0,14 und 0,38, wobei sich nur mit den Mutanten Ad-DuL $_{\Delta 27-34}$ (0,14) und Ad-DuL $_{\Delta 75-82}$ (0,22) eine Transduktionseffizienz unter 30 % erzielen ließ. Der SIA-Faktor für L_{wt}-exprimierende Zellen lag in dieser Experimentenreihe zwischen 0,06 und 0,41. Zur entsprechenden GFP-Kontrolle wichen die Werte damit mindestens um den Faktor 5,41 (2,22 \rightarrow 0,41), maximal um den Faktor 23,5 (1,41 \rightarrow 0,06) ab. Der SIA-Faktor für Ad-DuL-transduzierte und infizierte PDHs lag in der dritten Präparation bei 0,11 und lag damit 15-fach niedriger als die der Kontrollzellen (1,67 \rightarrow 0,11). Für die Mutanten zeigte sich ein relativ einheitliches Bild, wobei keine der Deletionen zu einem offensichtlichen Verlust der SIR-Kompetenz führte. Mit einem SIA-Faktor_{Norm} von 0,03 wurde für die Mutante Ad-DuL $_{\Delta 59-66}$ die höchste, allerdings negative Abweichung zum Wildtyp ermittelt (0,03 \rightarrow 0,18 = Faktor 6). Demnach würden Hepatozyten, die das L-Protein mit einer Deletion der Reste 59-66 exprimieren, eine 6-mal stärkere SIR-Kompetenz aufweisen, als es L_{wt}-exprimierende Zellen tun. Die höchste positive Abweichung wurde bei der Mutante Ad-DuL $_{\Delta 51-58}$ beobachtet, der SIA-Faktor betrug 0,41, der normierte Wert lag bei 0,25. Gegenüber einer weiteren DHBV-Infektion zeigten entsprechend transduzierte Zellen demnach eine 3,6-fach höhere Akzeptanz als Ad-DuL-transduzierte PDHs (0,25 \rightarrow 0,07). Zur entsprechenden GFP-Kontrolle zeigte sich für die Mutante eine Diskrepanz um den Faktor 4,1 (1,67 \rightarrow 0,41), Ad-DuL wich hier von der Kontrolle um das 15,2-fache ab (1,67 \rightarrow 0,11). Die beiden Einzelwerte (alle Infektionen erfolgten in Doppelansätzen) der SIA-Faktoren_{Norm} lagen für Ad-DuL $_{\Delta 51-58}$ -bildende Zellen bei 0,21 bzw. 0,24, was auch die Reproduzierbarkeit der hier präsentierten Ergebnisse widerspiegelt.

Die SIA-Analyse für DuL-Konstrukte mit Deletionen in der **essentiellen Region der duCPD-Bindedomäne** von pre-S erfolgte an PDHs aus je 2 Leberzellpräparationen, die Mutante Ad-DuL_{R102H} wurde nur einfach analysiert. Abbildung 2-24 gibt die Resultate wieder. Die Transduktionsraten waren in dieser Versuchsreihe weniger divergent und die Effizienz lag bei mindestens 23% (Ad-DuL $_{\Delta 85-96}$), maximal bei 35% (Ad-DuL $_{\Delta 101-109}$).

Für Ad-DuL-transduzierte PDHs ergab sich in dieser Reihe ein SIA-Faktor zwischen 0,00 und maximal 0,11. Zur entsprechenden GFP-Kontrolle zeigte sich damit mindestens eine Abweichung um den Faktor 15,2 (1,67 \rightarrow 0,11).

(C)



(D)

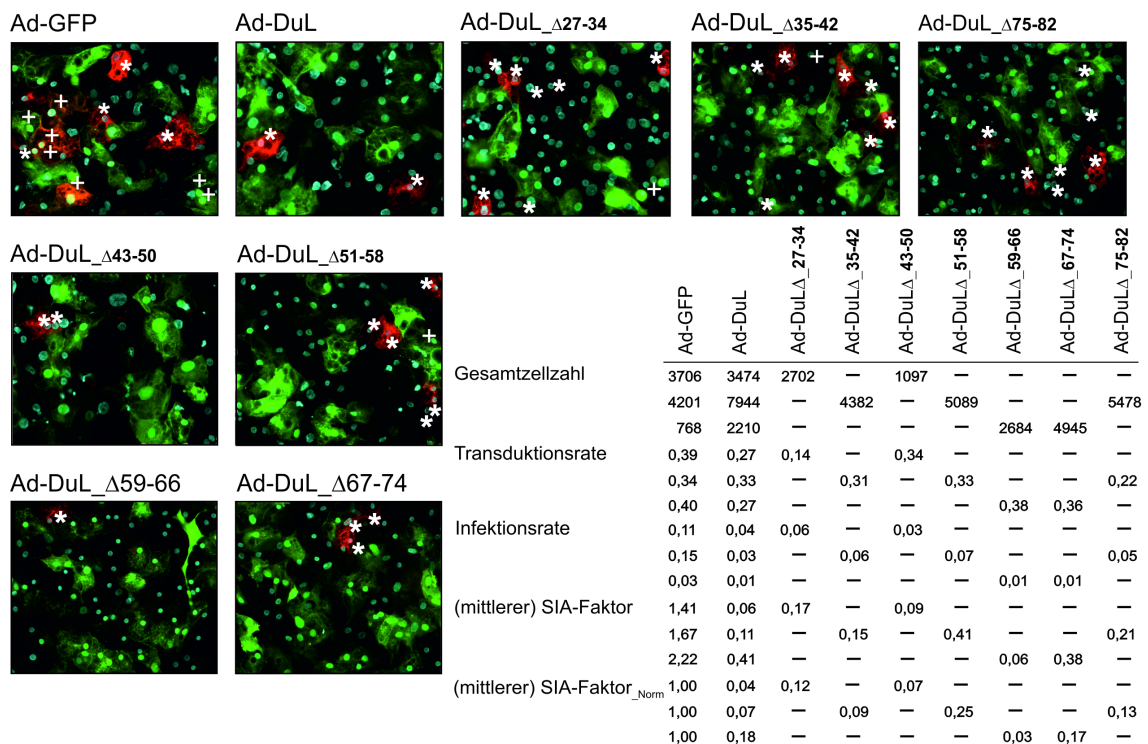


Abbildung 2-23 Reste in der stabilisierenden Region der duCPD-Binderegion von pre-S sind nicht verantwortlich für die Etablierung der SIR.

Die adenoviralen Konstrukte mit Mutationen in der stabilisierenden Region der duCPD-Bindedomäne in pre-S wurden generiert und analog zu Mutanten aus vorangehenden Studien quantitativ analysiert. (C) Resultate der IFA-basierten SIA-Analysen an Zellen aus jeweils einer PDH-Präparation. Insgesamt stammen die Zellen aus 3 verschiedenen Präparationen, wobei $\Delta 27-34$ und $\Delta 43-50$, $\Delta 35-42$, $\Delta 51-58$ und $\Delta 75-82$, und $\Delta 59-66$ und $\Delta 67-74$

auf Zellen einer Präparation analysiert wurden. PDHs wurden in Doppelsätzen transduziert und mit 25 GE pro Zelle überinfiziert.

Für die hier untersuchten Mutanten ergab sich ein sehr homogenes Bild, wobei auch hier keine Mutation bzw. keiner der resultierenden Phänotypen signifikant vom Wildtyp abwich. Die Deletion der Reste 85-96 resultierte in der geringsten Abweichung. Im Mittel lag bei dieser Mutante die Akzeptanz für eine Überinfektion nur um den Faktor 1,3-1,4 höher als von Zellen, die L_{wt} bildeten (SIA-Faktor = $0,07 \rightarrow 0,05$ bzw. $SIA\text{-Faktor}_{Norm} = 0,04 \rightarrow 0,03$). Den normierten und gemittelten Resultaten zufolge (Abbildung 2-24, Tabelle in Bildteil D) ergab sich auf den ersten Blick für die Mutante Ad-DuL_R102P mit einem Faktor 4,25 die stärkste und auch deutliche Abweichung zum Wildtyp ($0,17 \rightarrow 0,04$). Betrachtet man die Resultate aus den Einzelanalysen (Abbildung 2-24, C) ist ersichtlich, dass sich dieses Ergebnis in der zweiten Studie nicht reproduzieren ließ, der Phänotyp der Mutante wich hier sogar negativ vom Wildtyp ab (Ente_1: $0,07 \rightarrow 0,09$). Das Resultat wurde daher nicht weiter verfolgt. Die analoge R102-Mutante Ad-DuL_R102H wich um den Faktor 2 und damit ebenfalls leicht positiv vom Wildtyp ab ($SIA\text{-Faktor}_{Norm} = 0,08 \rightarrow 0,04$). Obwohl diese Mutante nur einfach analysiert wurde, es sich aber um einen konservativen Aminosäureaustausch handelt, der im SIA-Phänotyp den Wildtyp erwarten lässt, spiegelt das Ergebnis die Schwankungsbreite des Systems wider. Deletionen im Bereich aa 101-117, vertreten durch die Mutanten Ad-DuL_Δ101-109 und Ad-DuL_Δ110-117, resultierten im Vergleich zu L_{wt} im Mittel in einer 3-fach erhöhten SIA ($0,17 \rightarrow 0,05 = \text{Faktor } 3,4$). Der Wildtyp wich dabei um den Faktor 20, die beiden Mutanten noch um den Faktor 6 zur GFP-Kontrolle ab ($1,0 \rightarrow 0,05$ bzw. $1,0 \rightarrow 0,17$).

Den hier präsentierten Daten zufolge führt der Verlust oder eine drastische Beeinträchtigung der pre-S/CPD-Komplexbildung nicht zu einem Verlust der L-Protein-vermittelten SIR der Hepatozyten. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zumindest keine direkte Interaktion von Rezeptor und viralem Ligand für die SIR notwendig ist.

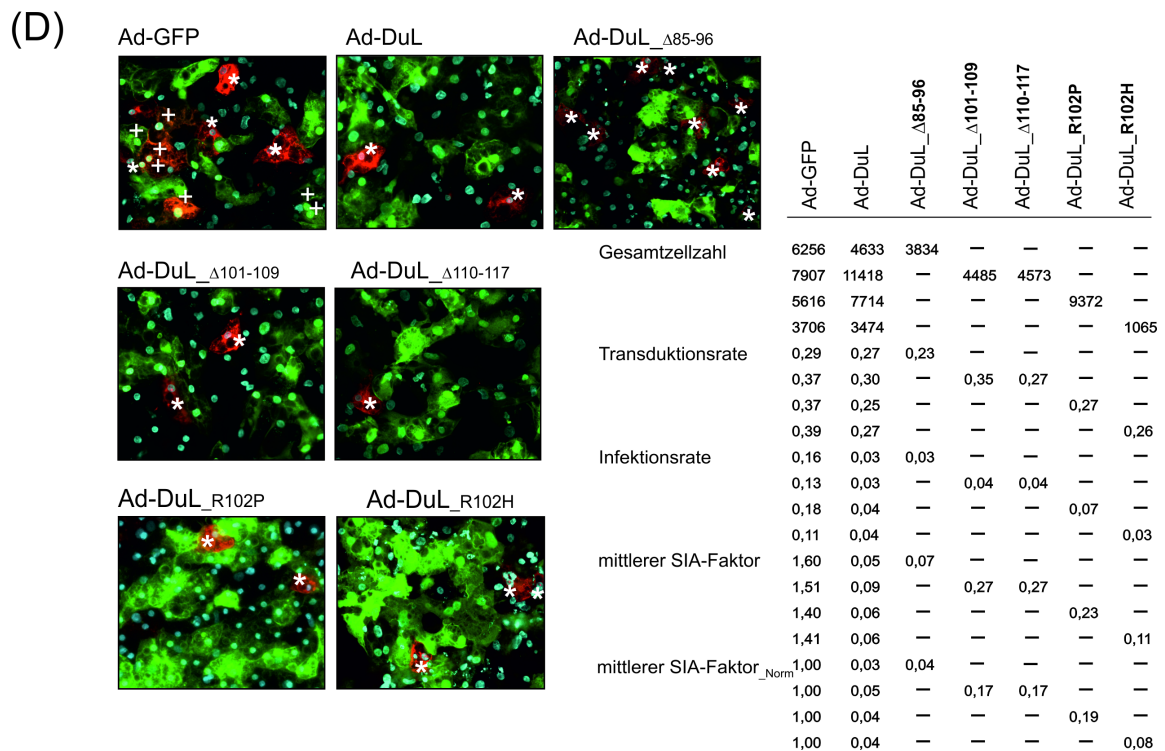
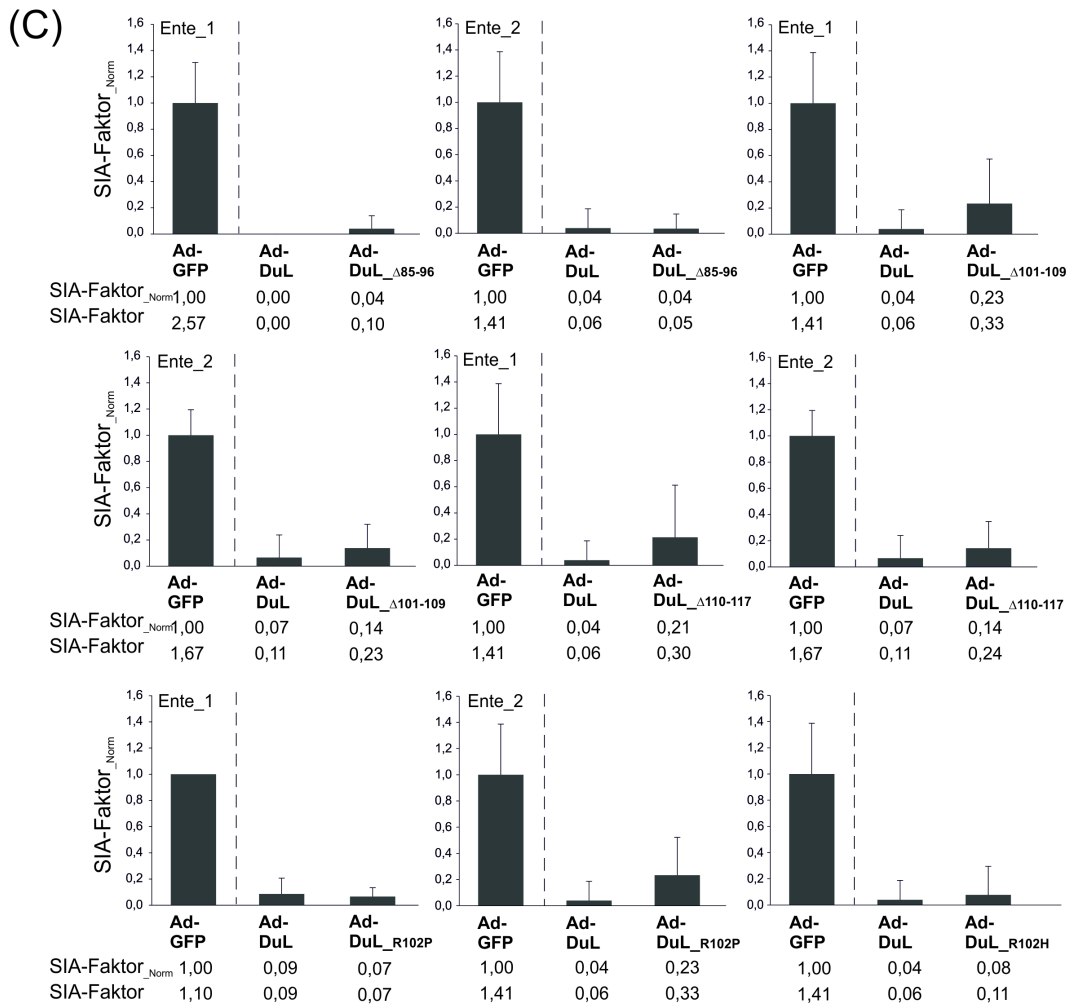


Abbildung 2-24 Eine duCPD/pre-S-Interaktion ist für den SIR-Mechanismus nicht notwendig.

Adenovirale Konstrukte mit Mutationen in der essentiellen Region der duCPD/gp180-Bindestelle in pre-S wurden generiert, PDHs transduziert und infiziert und analog zu der in 2.5.2.1 beschriebenen Vorgehensweise analysiert. Hepatozyten wurden transduziert und 1 (Ente_1 Δ 85-96) bis 2 Tage später mit DHBV-haltigem Serum (Ente_1 Δ 85-96, R102P = 50, Rest = 25 GE/Zelle) überinfiziert. Die Zellen wurden 5-7 Tage (Tag 5: Ente_1 R102P; Tag 7: Ente_1 Δ 85-96; Rest an Tag 6) später fixiert und einer IFA-basierten SIA-Analyse unterzogen.

2.5.2.4 Auswirkungen von Deletionen in der Matrixdomäne von pre-S auf den SIA-Phänotyp infizierter Hepatozyten

Auch der Sequenzabschnitt in pre-S, der für die Bildung umhüllter Partikel verantwortlich ist, konnte bereits identifiziert werden. Lenhoff und Summers beschreiben in ihren Arbeiten die vom L-Protein koordinierte Regulierung der Replikation sowie der Umhüllung viraler Kapside^{128,204}. Während in der Etablierungsphase der hepadnaviralen Infektion das virale Genom alternativ in den Zellkern reimportiert und ein cccDNA-Pool etabliert wird, werden Kapside präferentiell umhüllt und sezerniert, sobald ausreichende Menge vom großen Hüllprotein vorhanden sind (siehe 1.1.5). Substitutionen im Sequenzabschnitt aa 127 bis 136 von pre-S führen direkt und spezifisch dazu, dass die Umhüllung DNA-haltiger Kapside zum Erliegen kommt, auch die L-vermittelte Inhibition der cccDNA-Amplifikation bleibt aus¹²⁸. Beim Ausschluss einer Superinfektion ist es für das initial infizierende Virus entscheidend eine weitere Infektion seiner Wirtszelle so früh wie möglich zu verhindern. Darauf, dass die Blockade der Sekundärinfektion erst nach Internalisierung des zweiten Virus stattfindet, weisen bereits die Resultate der Bindeanalysen aus 2.4.3 hin. Die Etablierung eines cccDNA-Pools durch ein nachfolgend infizierendes Virus würde es daher gelten so effizient als möglich zu verhindern. Die Fähigkeit von L neuassemblierte Kapside zu umhüllen (und diese so der cccDNA-Amplifikation zu entziehen) bzw. deren potentielle Rolle im SIR-Mechanismus wurde daher in diesem Abschnitt der Arbeit untersucht.

Anlehnend an die Studien durch Lenhoff und Kollegen wurde der C-terminale Bereich von pre-S umfassend in die Mutationsanalyse miteinbezogen¹²⁸. In den Sequenzbereich zwischen aa 110 und aa 157 wurden hierzu sukzessive 8-aa-Deletionen eingeführt. Die generierten Mutanten deckten somit den für die Umhüllung von Kapsiden beschriebenen Bereich in pre-S vollständig ab und bezogen zusätzlich N- wie auch C-terminal gelegene Sequenzen ein. Die entsprechenden adenoviralen Konstrukte wurden kloniert, die Viren hergestellt und die zelluläre Transgenexpression bestätigt (Abbildung 2-25). Analog zu den Analysen zuvor

wurde dann die SIR-Qualität der einzelnen L-Mutanten, hier an PDHs aus 2 unabhängigen Leberzellpräparationen, quantifiziert. Abbildung 2-26 gibt die Resultate wieder.

Wie im Immunoblot zu erkennen (Abbildung 2-25 B), konnten alle Mutanten erfolgreich in Hepatozyten exprimiert werden. Im Vergleich zu L_{wt} resultierten die Deletionen $\Delta 126-133$ bis $\Delta 150-157$ aufgrund des geringeren Molekulargewichts in einer leicht aber signifikant schnelleren Mobilität der Polypeptide in der Elektrophorese. Abweichend davon zeigten sich die Mutanten Ad-DuL_ $\Delta 118-126$ und, wie schon unter 2.5.2.3 beschrieben, Ad-DuL_ $\Delta 110-117$. Die Deletion der Reste aa 118-126 (Ad-DuL_ $\Delta 118-126$) führte zu einem dem Wildtyp gleichenden Laufverhalten.

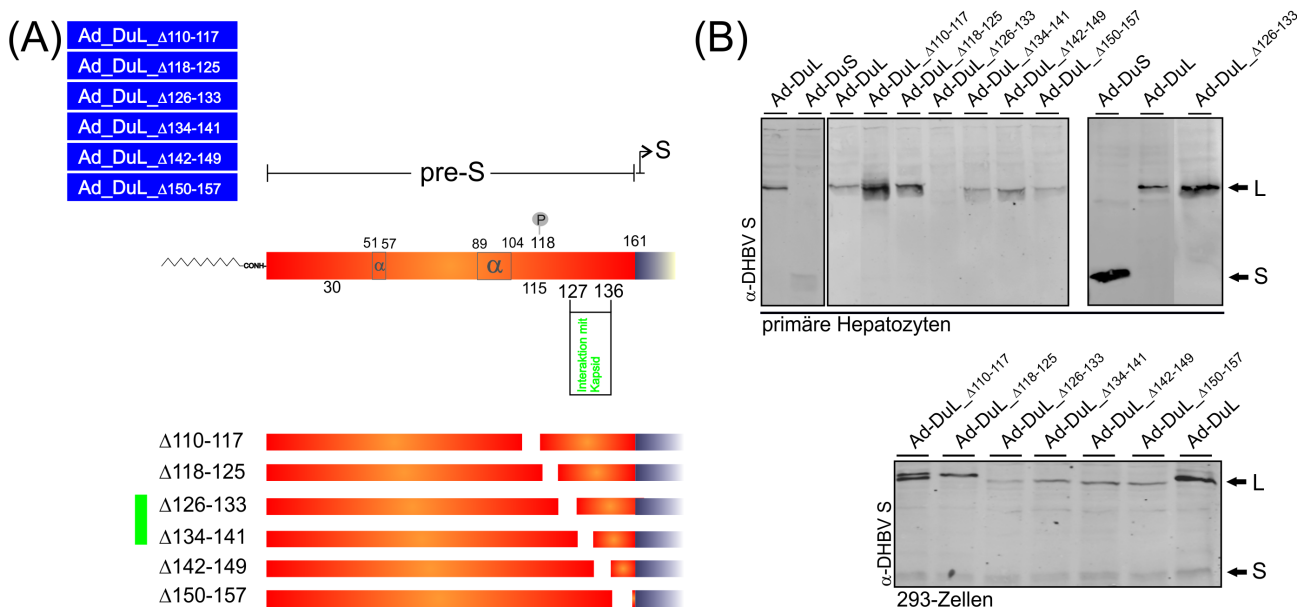


Abbildung 2-25 Expressionsanalyse von L-Mutanten mit 8-aa-Deletionen in der Matrixdomäne von pre-S.

(A) Schematische Präsentation der eingeführten 8-aa-Deletionen in den Bereich zwischen aa 110 und 157 von pre-S. Der für die Bildung umhüllter Viruspartikel essentielle Bereich (aa 127-136) ist eingeschlossen, die beiden Deletionsmutanten, die diese Determinante abdecken, sind grün markiert. (B) Die adenoviralen Konstrukte wurden generiert und auf ihre Expression hin untersucht. Gezeigt ist der Expressionsnachweis für alle Mutanten in Zellen aus Ente_1 (linker Blot) und in 293-Zellen (unterer Blot). Die Expression von Ad-DuL_ $\Delta 126-134$ wurde auch in Zellen aus Ente_2 nachgewiesen (Blot rechts).

Die Transduktionseffizienz lag durchschnittlich bei etwa 30 %, nur die Rate Ad-DuL_ $\Delta 126-133$ -exprimierender PDHs lag mit 21 % deutlich darunter. GFP-transduzierte Zellen erreichten eine Rate von 0,37 (Abbildung 2-26, Tabelle in Abbildungsteil D). Der mittlere SIA-Faktor nach Transduktion mit Ad-DuL lag in dieser Versuchsreihe bei 0,09 und wies

damit eine Abweichung von der GFP-Kontrolle um den Faktor 16,8 auf (1,51→0,09). Beide Analysen getrennt betrachtet resultierten SIA-Faktoren für L_{wt} -exprimierende Hepatozyten von 0,06 (Ente_1) und 0,11 (Ente_2). Die Akzeptanz GFP-exprimierender Zellen für eine SI lag dabei um das 15,2 (1,67→0,11, Ente_2) bis 23,5 (1,41→0,06, Ente_1)- fache höher. Die Schwankungen zwischen den beiden Analysen waren mit einem Faktor 1,22 für L (0,11→0,09) und 1,18 (1,67→1,41) für GFP niedrig.

Schon anhand der graphischen Auswertung (Abbildung 2-26 C), besonders der Daten aus der Ente_1 Analyse, wird der Gegensatz der hiesigen Resultate zu den Ergebnissen der vorangehenden SIA-Analysen deutlich. Die Ergebnisse für die Mutante Ad-DuL_Δ110-117 wurden bereits unter 2.5.2.3 beschrieben, sie sind an dieser Stelle aber mit aufgenommen, um den N-terminalen Bereich der Mutationsanalyse abzugrenzen. Folgende interessante Beobachtung konnte an dieser Stelle gemacht werden: Betrachtet man die tabellarisch aufgeführten SIA-Faktoren_{Norm} (Abbildung 2-26 D) zeigt sich, ausgehend von Ad-DuL über Δ110-117, dass die Akzeptanz L_{mut} -transduzierter PDHs gegenüber eine nachfolgenden DHBV-Infektion zunächst sukzessive mit 8-aa-Deletionen in 3'-Richtung anstieg. Das detektierbare Maximum mit einem SIA-Faktor_{Norm} von 0,83 wurde durch Deletion der Reste aa 126-133 erreicht. Der Wegfall der 8 davon N-terminal gelegenen Reste (aa 118-125) führte bereits zu einem SIA-Faktor_{Norm} von 0,67.

Für die Mutante Δ118-125 ergab sich anhand der kalkulierten mittleren SIA-Faktoren eine fast 12-fach niedrigere Kompetenz eine Resistenz der Zellen zu vermitteln, als es für L_{wt} -exprimierende PDHs der Fall war (1,04→0,09= Faktor 11,6), von der GFP-Kontrolle wich der Phänotyp quantitativ hingegen kaum noch ab (1,51→1,04 = Faktor 1,45) (1,04→1,51). Die Δ126-133-Mutante divergierte sogar um das 14-fache von Ad-DuL (1,26→0,09), von der Kontrolle wich sie nicht mehr signifikant ab (1,51→1,26 = Faktor 1,2). Mit dem Entfernen dieser 8 Reste (aa 126-133) in pre-S verlor das L-Protein demnach vollständig seine SIR-Kapazität.

Die Einführung von 8-aa-Deletionen in Regionen 3' zu diesem Bereich führte dann zu einem sukzessiven Wiedergewinn der Ausschlusskapazität. Für die beiden C-terminal folgenden Mutanten Δ134-141 und Δ142-149 ergaben beide Studien gemittelt (Abbildung 2-26 D) SIA-Faktoren ≥ 1 , die normierten Mittelwerte lagen jeweils bei 0,7 und sind damit zu dem des Wildtyps signifikant erhöht (> Faktor 10).

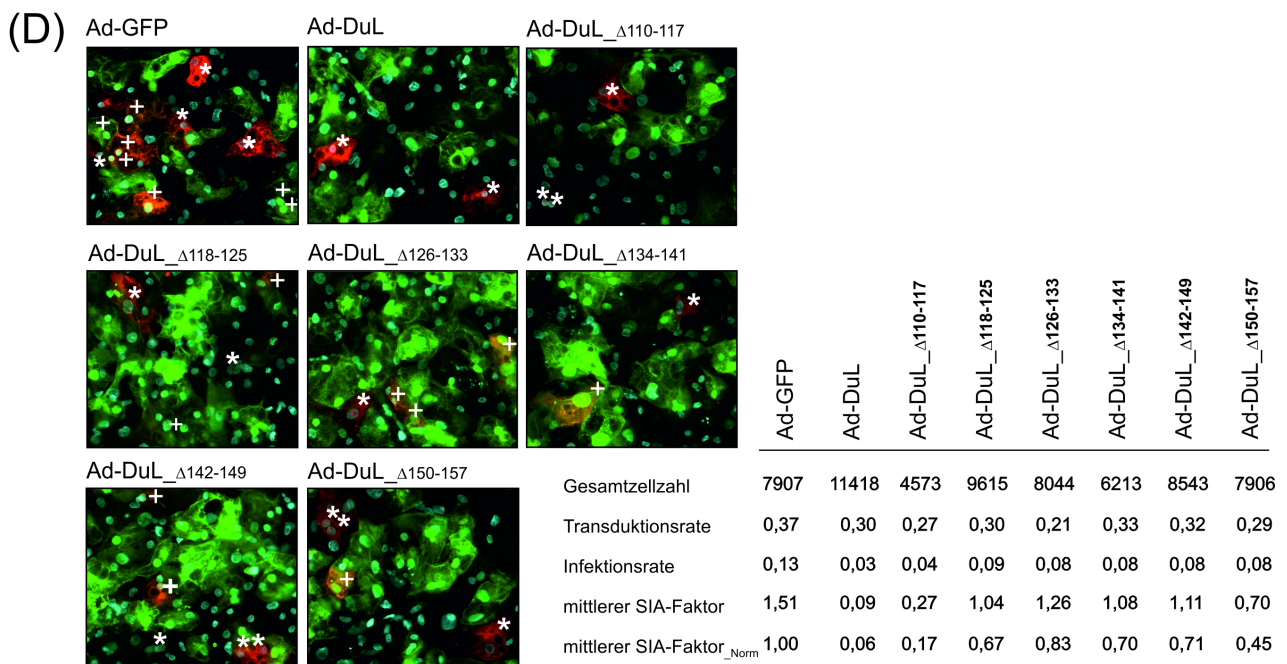
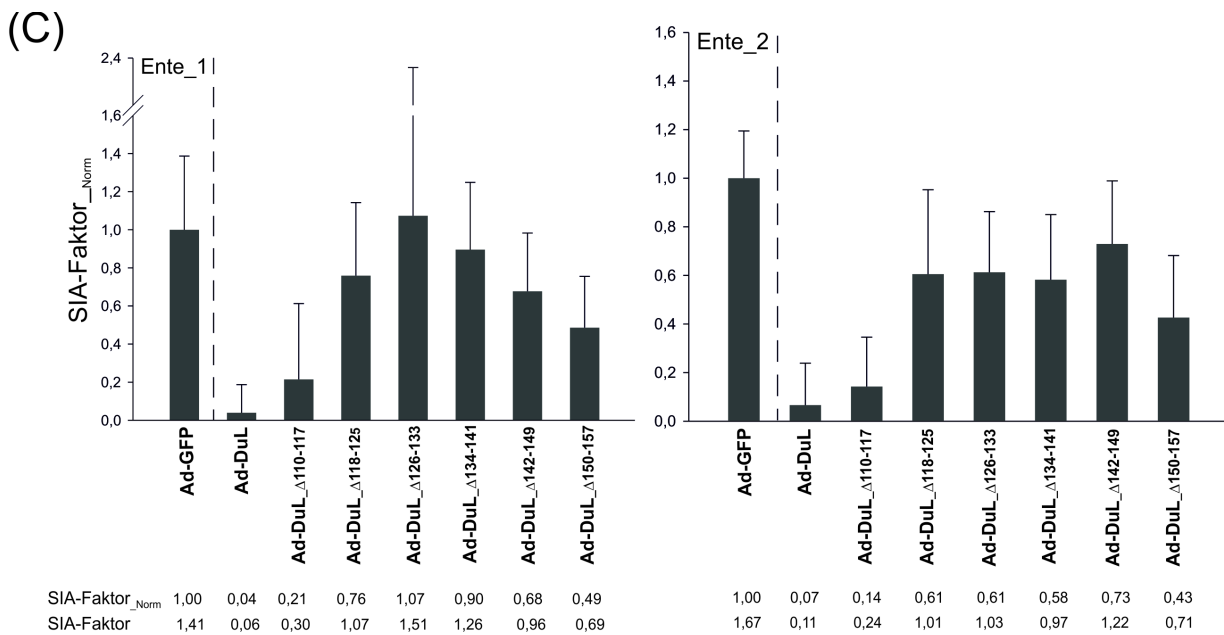


Abbildung 2-26 Die Interaktion von viralem Kapsid und L-Protein ist essentiell für den Ausschluss einer Superinfektion.

Resultate der IFA-basierten SIA-Analyse transduzierter PDHs aus 2 unabhängigen Leberzellpräparationen (Ente_1 und 2). PDHs wurden mit Adenoviren transduziert, die für L-Mutanten mit Deletionen in der Kapsidbinderegion von pre-S kodierte (siehe Abbildung 2-25). 2 Tage später wurden die Zellen mit DHBV infiziert (25 GE/Zelle), 6 Tage p.Inf fixiert und einer Quantifizierung nach 2.3 unterzogen. In (C) sind die Ergebnisse aus den Einzelanalysen präsentiert, in (D) sind tabellarisch die gemittelten Werte aus beiden Analysen aufgeführt. Die Immunfluoreszenzbilder in (D) sind exemplarisch ausgewählt, entsprechen aber Aufnahmen der PDHs aus Ente_2.

In der Reihe aller Mutanten betrachtet, sank mit diesen Mutanten die erlangte SIA wieder ab und erreichte mit Deletionen im C-Terminus von pre-S ($\Delta 150-158$) mit einem SIA-Faktor_{Norm} von 0,45 wieder ein Minimum.

Obwohl die Daten der Ente₂ Analyse zwar den Verlust der Resistenz, nicht aber den sukzessiven Verlust der SIR und deren Wiedergewinn in vollem Ausmaß widerspiegeln, ist die Signifikanz der Resultate in beiden Studien eindeutig gegeben. Demnach kann dem hier adressierten Sequenzabschnitt in pre-S offenkundig eine Involvierung im SIR-Mechanismus zugesprochen werden. Die so definierbare SIR-Determinante ist im Sequenzabschnitt aa 118-149 lokalisiert.

2.5.2.5 Die Rolle des N-Terminus von pre-S im Ausschluss einer DHBV-Superinfektion

Wie bereits unter 1.2.2 geschildert sind im N-Terminus von pre-S Determinanten lokalisiert, die entscheidend für den infektiösen Charakter und die Wirtsspezifität von DHBV sind. Die Acylierung von Gly2 durch das Anhängen von Myristinsäure trägt dabei zwar entscheidend zur Infektiosität der Viren bei, die in Abschnitt 2.5.2.1 präsentierten Ergebnisse an der Mutante DuL_Myr(-) ließen an dieser Stelle aber bereits den Schluss zu, dass diese Modifizierung keinen Beitrag zum SIR-Mechanismus liefert. Für den Sequenzbereich aa 12-22 konnte in pre-S-Bindestudien und Präzipitationsversuchen gezeigt werden, dass dieser Teil von pre-S exponiert auf der Partikeloberfläche liegt und für die Infektiosität der Viren strikt erforderlich ist¹⁷⁷. Der Abschnitt in pre-S, der die Wirtsspezifität zwischen DHBV und dem nahverwandten Avihepadnavirus HHBV determiniert, schließt sich diesem Abschnitt C-terminal an und umfasst die Reste aa 22-37^{205,83}. Dass der Sequenzbereich bis aa 41 entscheidend für den Infektionsprozess ist, ohne dabei die essentielle Rezeptorbindedomäne zu enthalten, weist auf eine duCPD-unabhängige Interaktion dieses Bereichs des Virus mit der Wirtszelle hin, vermutlich mit einem noch unbekanntem Korezeptor¹⁸².

Mit der folgenden Mutations- und SIA-Analyse wurde untersucht, ob Sequenzelemente im N-Terminus möglicherweise auch für die Ausprägung des SIA-Phänotyps eine Rolle spielen. Der Fokus wurde dabei auf den Sequenzbereich aa 3-26 gelegt. Durch das sukzessive Einführen von 8 aa-Deletionen wurden die 3 adenoviralen Konstrukte Ad-DuL Δ 3-10, Ad-DuL Δ 11-18 und Ad-DuL Δ 19-26 generiert. Abbildung 2-27 fasst die Ergebnisse der Expressionsanalyse und der IFA-basierten Untersuchung zusammen.

Dem Ergebnis der Western Blot Analyse (Abbildung 2-27 B) kann entnommen werden, dass die Synthese aller 3 Mutanten nachweisbar war, neben L_{wt} sind die minimalen Größenverluste

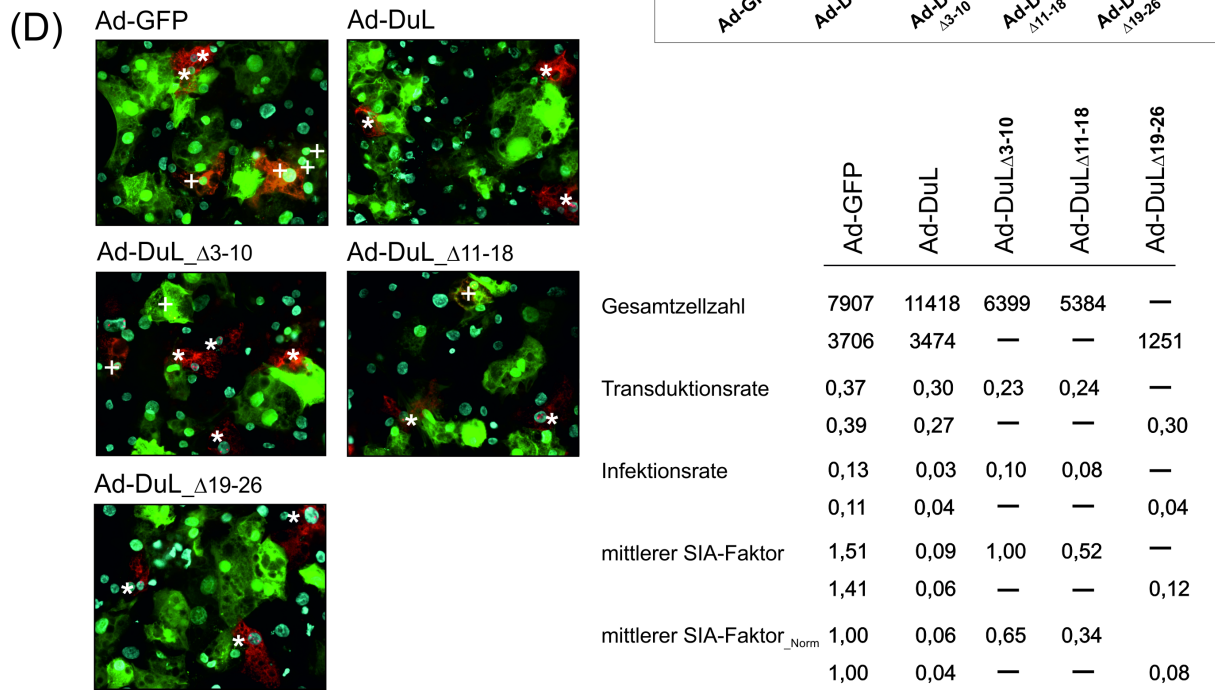
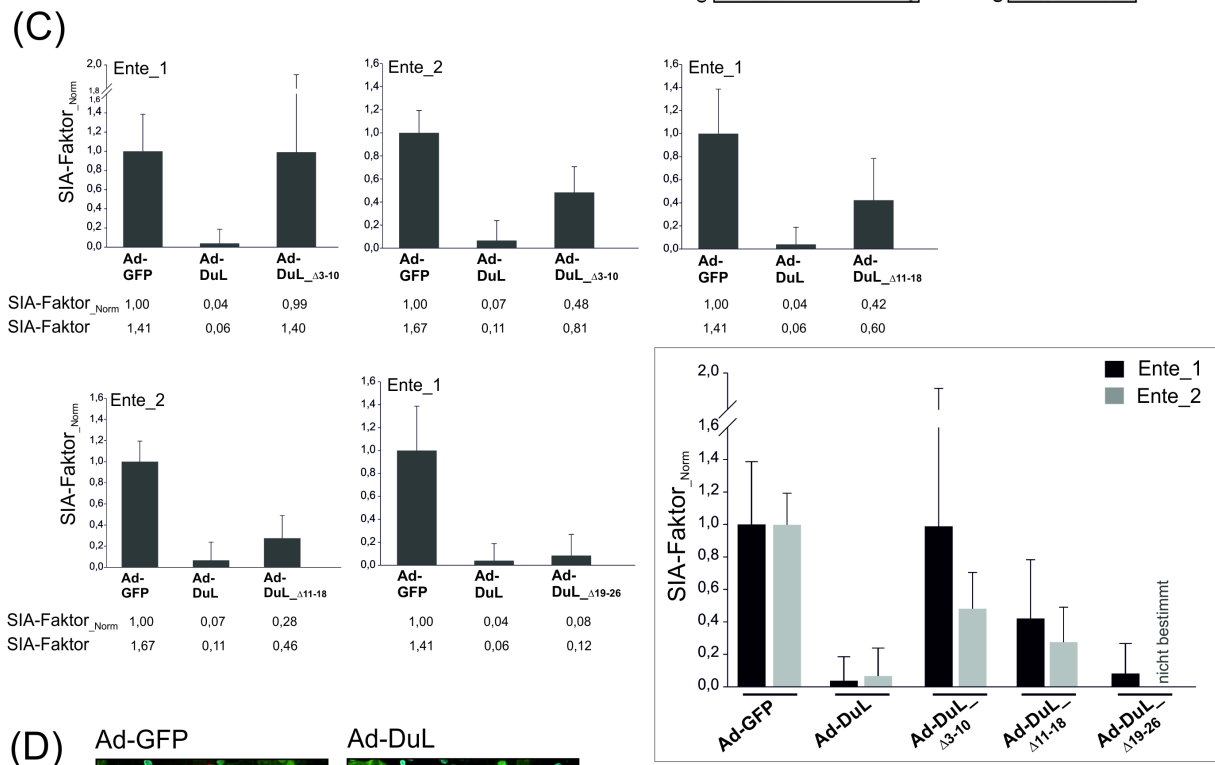
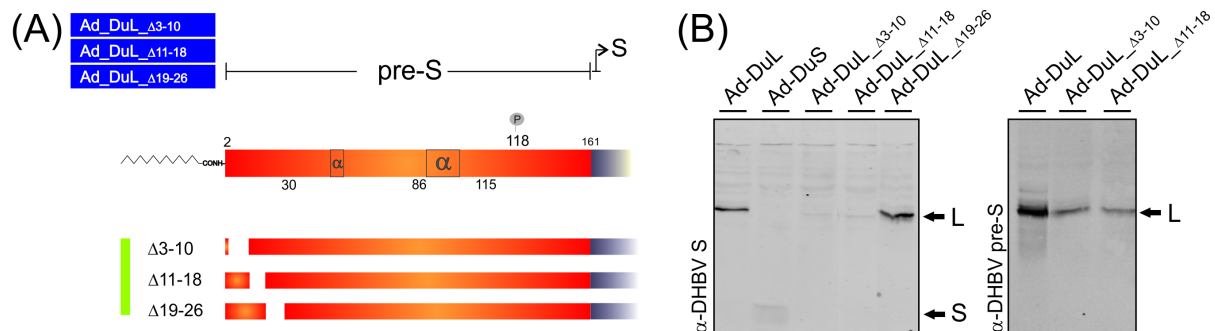


Abbildung 2-27 Deletionen im N-terminalen Bereich von pre-S resultieren in einer signifikant erhöhten SIA.

(A) Schematische Präsentation der eingeführten Deletionen in den N-terminalen Bereich von pre-S. Die Auswertung wurde analog zu vorangehenden Analysen durchgeführt. (C) und (D) zeigen die Resultate der IFA-basierten SIA-Analysen transduzierter PDHs aus je 1 (Ad-DuL_Δ19-26) bzw. 2 (Rest) unabhängigen PDH-Präparationen. Die Überinfektion transduzierter PDHs erfolgte mit 25 GE DHBV /Zelle, die Zellen wurden 6 Tage später der IF-basierten SIA-Analyse unterzogen. (Grafik rechts) Zur Veranschaulichung sind die Resultate der fünf SIA-Analysen in einer Grafik neben den normierten bzw. gemittelten Werten für die Kontrollen Ad-GFP und Ad-DuL präsentiert. Die Immunfluoreszenzbilder in (D) sind exemplarisch für je beide Präparationen ausgewählt, sind aber PDHs jeweils aus Ente_1.

der Polypeptide erkennbar. Im Gegensatz zu Ad-DuL_Δ19-26 ließen sich die Mutanten Ad-DuL_Δ3-10 und Ad-DuL_Δ11-18 im DHBV S-spezifischen Nachweis nur schwach darstellen, die spezifische Detektion mit einem α -pre-S Antikörper verifiziert die Expression der Mutanten aber eindeutig.

Die Transduktionseffizienzen der L_{mut} -exprimierenden Zellkulturen lagen für die Mutanten zwischen 23 und 30%. Die SIA-Analysen (Abbildung 2-27 C und D) wurden an Zellen aus jeweils 2 unabhängigen Leberzellpräparationen durchgeführt, im Fall der Mutante Ad-DuL_Δ19-26 war es eine Einzelstudie. Für den SIA-Phänotyp der 3 Mutanten zeichnet sich folgendes Bild ab: Während eine Deletion der N-terminalen Reste (Δ3-10) im Vergleich zu L_{wt} -exprimierenden Zellen im Mittel zu einer um den Faktor 10 gesteigerten SIA der Zellen führte (mittlerer SIA-Faktor_{Norm}: Ad-DuL_Δ3-10 = 0,65, Ad-DuL = 0,06), der mittlere SIA-Faktor betrug 1,00, nahm diese gesteigerte Akzeptanz sukzessive mit Deletionen in Richtung C-Terminus hin ab. Bei Expression der Mutante DuL_Δ11-18 zeigten sich die Hepatozyten noch 5-mal toleranter gegenüber einer SI (mittlerer SIA-Faktor_{Norm} = 0,34), bei Ad-DuL_Δ19-26-exprimierenden PDHs war die Akzeptanz im Vergleich zum Wildtyp nur noch doppelt so hoch (SIA-Faktor_{Norm}: Ad-DuL_Δ19-26 = 0,08, Ad-DuL = 0,04).

Die Resultate der einzelnen PDH-Präparationen separat betrachtet, tritt der Anstieg in der Toleranz für eine Überinfektion bei Zellen der Ente_1 Präparation deutlich drastischer zutage. Die Darstellung in einer gemeinsamen Graphik (siehe Kasten in Abbildungsteil C) verdeutlicht dies. Mit einem SIA-Faktor_{Norm} von 0,99 zeigen sich Ad-DuL_Δ3-10-transduzierte Hepatozyten im Vergleich zur GFP-Kontrolle maximal tolerant gegenüber einer zweiten Infektion, während dieser Effekt bei Zellen der Ente_2 Präparation nur noch halb so groß war. Ebenso verhielt es sich mit DuL_Δ11-18, die Absolutwerte fielen bei Zellen aus der Präparation Ente_2 nur etwa halb so hoch aus. Die Signifikanz im Anstieg der Toleranz ist durch die Reproduzierbarkeit der Resultate trotz allem klar ersichtlich.

Der Wegfall der Reste aa 3 bis einschließlich aa 18 mindert die Kapazität von L drastisch eine SI erfolgreich auszuschließen. Die Integrität des N-Terminus von pre-S ist für die Funktion von L im Vermitteln der SIR folglich unerlässlich.

2.5.2.6 SIA-Analyse zur Rolle der pre-S-Domäne von L an einer DHBV/HBV L-Chimäre

Die Analyse zur Fragestellung, ob die S-Domäne von L ausreicht, um eine Zweitinfektion zu verhindern hatte gezeigt, dass die alleinige Expression von SDHBsAg diese Blockade nicht vermitteln kann (2.5.1). Die Schlussfolgerung, dass die für die SIR essentiellen Determinanten in der pre-S-Domäne von L lokalisiert sind, lag somit nahe und die Ergebnisse in 2.5.2.4 bestätigten genau das. Ziel der folgenden Mutationsstudie war es zu überprüfen, ob DHBV pre-S isoliert von der DHBV S-Domäne exprimiert, die L-induzierte SIR bewirken kann. Um die Verankerung von pre-S in der Membran zu gewährleisten, wurde das chimäre Konstrukt Dupre-S/HuS kloniert, bei welchem sich C-terminal an pre-S die Sequenz der S-Domäne von HBV anschließt. Da unter den Hepadnaviren die Transmembrantopologie der Hüllproteine weitestgehend homolog ist, konnte SHBsAg als Membrananker für die hydrophile pre-S-Domäne fungieren. Einen schematischen Überblick hierzu gibt Abbildung 2-28. Nach Generierung der entsprechenden Adenoviren wurde zunächst die Expression des chimären L-Proteins neben der von DHBV L_{wt} im Western Blot analysiert (Abbildung 2-28, Spur 3 und 4). Der verwendete α -DHBV pre-S-Antikörper (grüne Banden) detektierte die Chimäre (Spur 4) primär als 2 Produkte mit Molekulargewichten von 42 und 39 kDa, ein Bandenmuster, welches vergleichbar dem von HBV L_{wt} ist und Kalkulationen zum erwarteten Molekulargewicht von Dupre-S/HuS bestätigte. Der langsameren Polypeptidspezies in der Gelelektrophorese liegt dabei sehr wahrscheinlich die partielle N-Glykosylierung in der a-Determinante der HBV S-Domäne zugrunde. 2 weitere DHBV pre-S-spezifische Banden mit Größen von 33 bzw. 36 kDa erschienen mit deutlich schwächerer Intensität. Die Detektion der Chimäre durch einen monoklonalen α -DHBV S-Antikörper (rote Banden) fand wie erwartet nicht statt, während DuS (Ad-DuS, Spur 2) und die S-Domäne von DHBV L (Ad-DuL, Spur 3) eindeutig vom Antiserum erkannt wurden. Zur Detektion DHBV-unspezifischer Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa durch dieses Antiserum siehe Abschnitt 2.1.4.

In den darauffolgenden SIA-Analysen an Zellen aus 2 unabhängigen Leberpräparationen ergab sich folgender Phänotyp für die L-Chimäre: Der kalkulierte SIA-Faktor_{Norm} für die Chimäre wich im Durchschnitt um den Faktor 15,5 vom normierten Wert für L_{wt} ab (0,06 \rightarrow 0,93) und lag damit sogar minimal höher, als der entsprechende Faktor Ad-DuS-

exprimierender Zellen (0,89; siehe 2.5.1). Bei gleicher Transduktionseffizienz (32 bzw. 35%) zeigte sich Ad-Dupre-S/HuS somit wider Erwarten ebenso wenig wie Ad-DuS in der Lage, eine Zweitinfektion von Transgen-exprimierenden Hepatozyten zu verhindern.

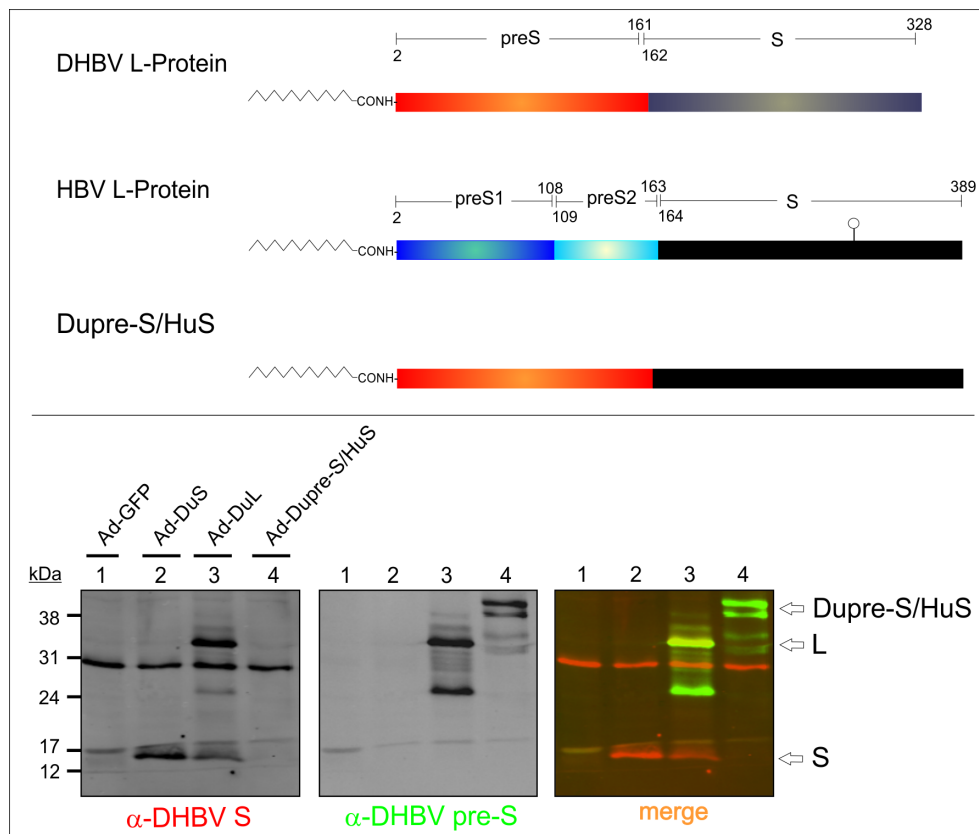


Abbildung 2-28 Die zellulären Expression des chimären DHBV/HBV L- Konstrukts.

(Oben) Im adenoviralen Konstrukt Ad-Dupre-S/HuS wurde an den C-Terminus von DHBV pre-S die Sequenz der HBV S-Domäne fusioniert. (Unten) Western Blot Analyse zur Expression der L-Chimäre. LMH-Zellen wurden transduziert und an Tag 3 p.Tr. lysiert. Die Detektion im WB erfolgte mit einem monoklonalem α -DHBV S (links) – bzw. einem polyklonalen α -pre-S Primärantikörper (Mitte). Die Zweitantikörper lagen Fluorophor-gekoppelt vor. Der rechte Blot kommt durch das Übereinanderlegen der Farbkanäle zustande.

Während beim humanen Virus die posttranslationale pre-S-Translokation unabhängig von den beiden anderen Hüllproteinen, nämlich S und M abläuft, ist sie beim Entenvirus von der gleichzeitigen Synthese von DHBV S abhängig (1.1.4)^{84,107}. Mit dem folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob die pre-S-Domäne im Kontext der L-Chimäre aufgrund der fehlenden DHBV S-Domäne evtl. nicht richtig transloziert wird. Damit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob möglicherweise eine erfolgreiche pre-S-

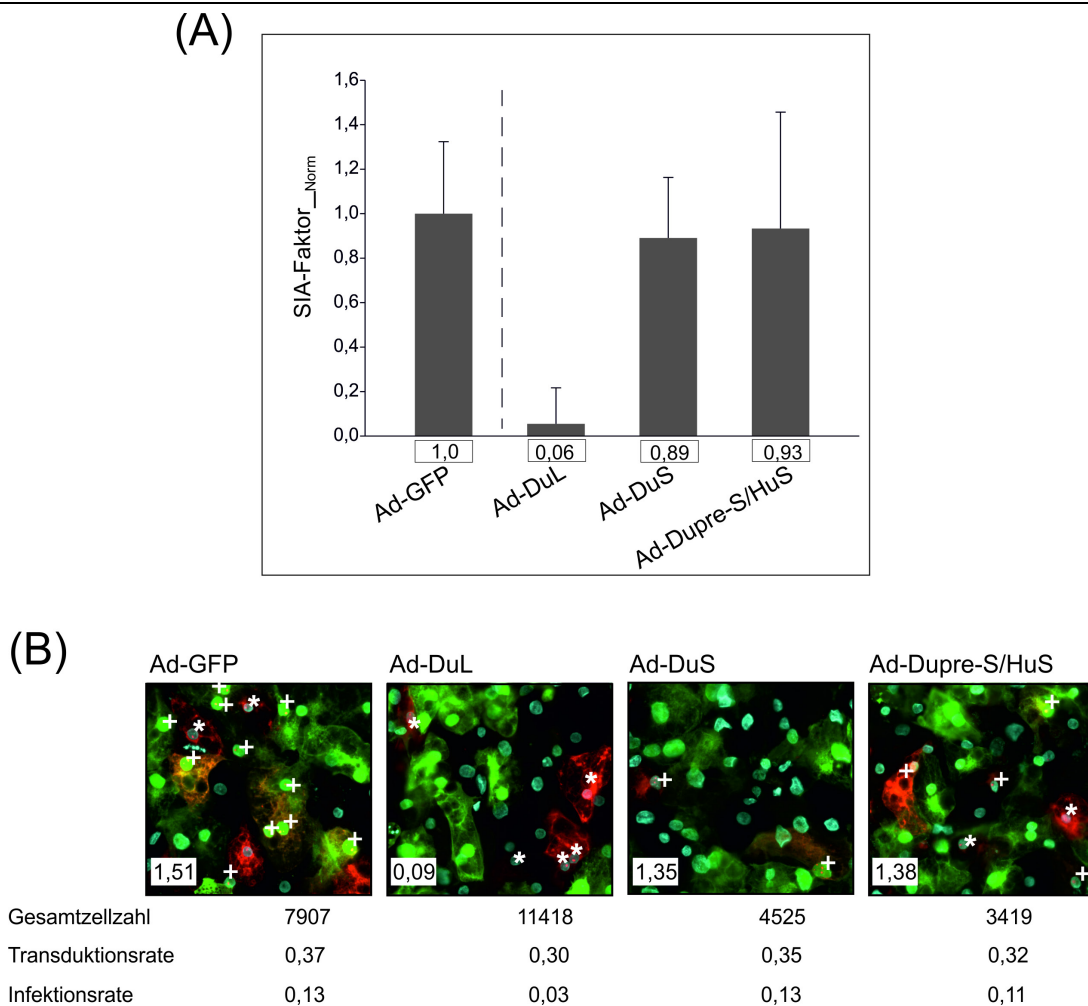


Abbildung 2-29 Analyse der Superinfektionsakzeptanz Dupre-S/HuS-exprimierender Hepatozyten.

(A) Graphische Darstellung zu den via IFA determinierten und normierten SIA-Faktoren. Zahlen unter den Balken stellen die genauen SIA-Faktoren_{Norm} dar. (B) IFA-basierte SIA-Analyse Ad-Dupre-S/HuS-exprimierender PDHs. Die Analyse erfolgte analog zu vorangehenden Untersuchungen, transduzierte Zellen wurden mit DHBV (25 GE/ml) überinfiziert und 6 Tage p.Inf. PFA-fixiert. Zahlen in Kästchen sind kalkulierte SIA-Faktoren.

Translokation eine Voraussetzung für die SIR darstellt bzw. ob das Unvermögen der Chimäre pre-S erfolgreich zu translozieren Ursache für den detektierten Verlust der Resistenz ist. Um Aufschluss über die transmembrane Topologie der pre-S-Domäne zu erhalten, wurde die L-Chimäre einem Proteaseschutzversuch unterzogen (Abbildung 2-30). Das Prinzip beruht hierbei auf der Sensitivität bzw. Resistenz unterschiedlicher Abschnitte im Polypeptid gegenüber zugesetzter Proteasen aufgrund ihrer Ausrichtung in der Membran präparierter Mikrosomen. Aus transduzierten LMH-Zellen wurden hierzu Mikrosomen durch Fraktionierung gewonnen und anschließend mit Trypsin behandelt (Abbildung 2-30, Spur 2, 5 und 8). Während luminal orientierte Proteinbereiche (später auf der Oberfläche von

Viruspartikeln) dabei vor dem tryptischen Verdau geschützt sind, reagieren zytoplasmatisch liegende Regionen (später dem Nukleokapsid zugewandt) sensitiv d.h. sie werden proteolytisch abgebaut. Alternativ wurden die Membranen der Mikrosomen durch Zugabe des nichtionischen Detergenz NP-40 und DTT aufgeschlossen, wodurch alle Bereiche für die Protease zugänglich wurden (Abbildung 2-30, Spur 3, 6 und 9). Mit diesem Kontrollansatz sollte sichergestellt werden, dass die eingesetzte Menge an Protease prinzipiell ausreichend war, um vorhandenes L vollständig abzubauen. In jeweils einem dritten Ansatz wurden die präparierten ER-Vesikel mock-behandelt. Die im Immunoblot detektierte Gesamtmenge an L in dieser Probe, diente später als Referenz in der quantitativen Auswertung (Abbildung 2-30, Spur 1, 4 und 7). Nach Auftrennung in einer SDS-PAGE wurden die Produkte der Verdau im Western Blot analysiert (Abbildung 2-30). Der detaillierte Versuchsaufbau kann Abschnitt 4.2.3 entnommen werden.

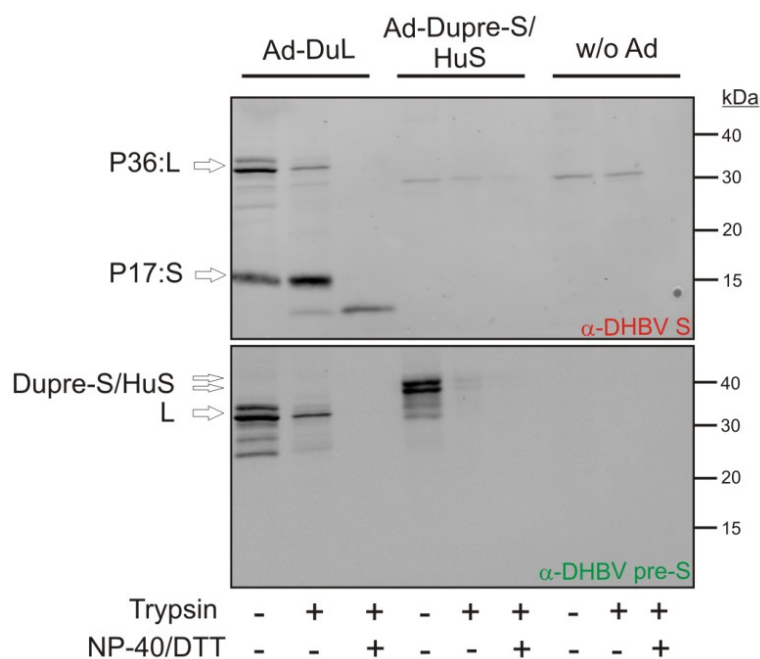


Abbildung 2-30 Trypsinschutzversuch zur Studie der Topologie der L-Chimäre Dupre-S/HuS.

Western Blot Analyse proteolytisch verdauter Mikrosomenfraktionen. Mikrosomen aus Ad-Dupre-S/HuS- bzw. Ad-DuL-transduzierten LMH-Zellen wurden wie unter 4.2.3 beschrieben isoliert und einer Behandlung mit Trypsin in An- oder Abwesenheit von Detergenz (NP-40) und DTT unterzogen. Jeweils einem dritten Teil der präparierten ER-Vesikel wurde keine Protease zugesetzt. Untransduzierte Zellen dienen im Western Blot als Negativkontrolle. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen α -DHBV-pre-S und einem monoklonalen α -DHBV-S Antikörper. Größen mitgeführter Standardproteine sind aufgezeigt.

Die Quantifizierung der im WB detektierten Spaltprodukte ergab, dass im Fall von DHBV L_wt (Abbildung 2-30, Ad-DuL, Spur 1-3) 37 % des Volllänge-L-Proteins (P36) resistent gegenüber der Proteasebehandlung waren (α -S Blot, Ad-DuL, L (P36), vgl. Spur 1 und Spur 2, Abnahme um den Faktor 2,7). Demnach waren über 60 % der pre-S-Domänen des großen Hüllproteins zytoplasmatisch (i-pre-S Konformation, siehe Abbildung 1-5), d.h. außerhalb der Mikrosomen lokalisiert und so dem tryptischen Verdau ausgesetzt.

Die parallele Detektion mit einem α -pre-S Antiserum bestätigte das Resultat (Abbildung 2-30, unterer Blot), die pre-S-Region zeigte sich hier bei 68 % der L-Moleküle sensitiv gegenüber einem Verdau. Invers korrelierend zum partiellen Abbau von pre-S stieg, nämlich um den Faktor 3,3, die detektierbare Menge an S (P17) an (α -S Blot, Ad-DuL, S, Vgl. Spur 1 und Spur 2). Nach Zugabe von Detergenz und DTT war kein pre-S-spezifisches Signal mehr nachweisbar (unterer Blot, Spur 3), was die Vollständigkeit des Verdau und damit die gewählten Reaktionsbedingungen verifiziert. Der monoklonale α -S-Erstantikörper erkannte ein S-Spaltprodukt mit einer Größe kleiner 15 kDa (oberer Blot, Spur 3). Eine der favorisierten Trypsinschnittstellen in L befindet sich an 2 Lysinresten (K204, K206) in der S-Domäne in der hydrophilen *loop*-Region zwischen TM-1 und TM-2, wobei unter anderem ein S-Spaltprodukte mit einer Größe von 12,9 kDa entsteht¹⁰¹. Bei dem hier detektierten Trypsin-Produkt handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eben dieses Fragment.

Der Trypsinverdau von Dupre-S/HuS ergab, dass die pre-S Region beider L-Formen (42 und 39 kDa), auch ohne die Zugabe von Detergenz, fast vollständig abgespalten wurde. Der Anteil Trypsin-resistenter Moleküle fiel hierbei mit einem Anteil von nur 5,7 % deutlich geringer als beim Wildtyp aus (α -pre-S Blot, Ad-Dupre-S/HuS, Vgl. Spur 4 und Spur 5). Folglich waren fast 95 % der pre-S-Domänen im chimären L zytoplasmatisch orientiert (i-pre-S Konformation) und damit zugänglich für die Protease, ohne dass die mikrosomalen Membranen zuvor hätten aufgeschlossen werden müssen.

In diesem Teil der Arbeit konnten 2 Feststellungen gemacht werden: 1) DHBV pre-S liegt in Dupre-S/HuS fast ausschließlich in der i-pre-S Konformation vor, seine Translokation scheint in Anwesenheit der HBV S-Domäne nicht zu erfolgen. 2) Zytoplasmatisches pre-S alleine bzw. im Kontext mit HBV S kann keine SIR vermitteln. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass HBV S nicht in der Lage ist, DHBV S im L-vermittelten Infektionsausschluss zu komplementieren.

2.5.2.7 SIA-Analyse an Hepatozyten, die das große Hüllprotein des Graureiher HBV (HHBV) exprimieren

Im folgenden Abschnitt wurde eine SIA-Analyse an PDHs durchgeführt, die das große Hüllprotein des nahverwandten Avihepadnavirus HHBV exprimierten. Obwohl die Genome von DHBV und HHBV ein hohes Maß an Sequenzhomologie aufweisen (etwa 21 % Basenpaaraustausch²⁴) ist HHBV erst in der Lage Entenhepatozyten zu infizieren, wenn HHBV pre-S, bzw. das Sequenzelement aa 22-37, gegen die korrespondierenden DHBV-Sequenzen ausgetauscht wird²⁰⁵. Trotz des Unvermögens im Entenmodellssystem erfolgreich Infektionen zu setzen und einem Abweichen der Aminosäuresequenz der pre-S-Domänen um 50 %, ist HHBV-pre-S interessanterweise in der Lage den DHBV-Rezeptor duCPD zu binden und eine DHBV-Infektion zu inhibieren, und zwar ebenso effizient wie es von DHBV pre-S abgeleitete Peptide vermögen^{176,175}. Anhand eines Alignments der pre-S-Sequenzen wird deutlich, wie die Sequenzen schon augenfällig divergieren (Abbildung 2-31). Im Gegensatz dazu zeigt sich die Sequenz für das kleine Hüllprotein oder auch beispielsweise für Core hochkonserviert²⁴.

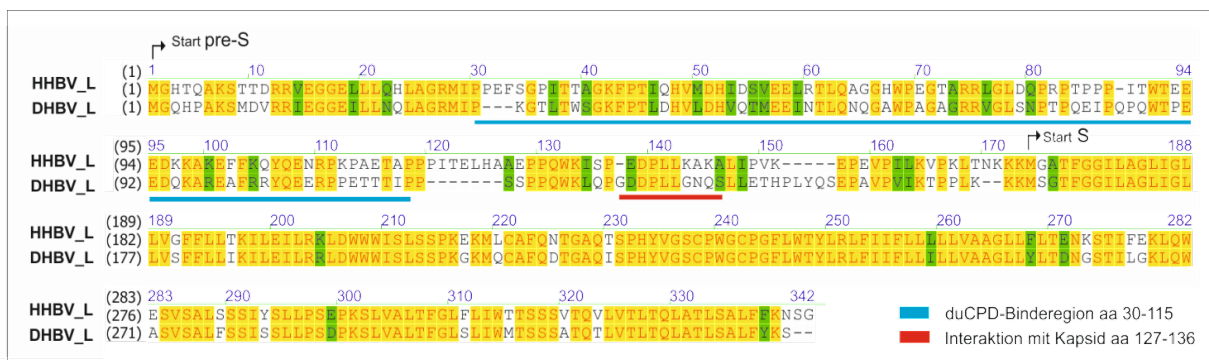


Abbildung 2-31 Sequenzvergleich der großen Hüllproteine von HHBV und DHBV.

Alignment der L-Proteinsequenzen von HHBV-4 (obere Sequenz) und DHBV-16 (untere Sequenz). Der jeweilige Start für pre-S und S ist angezeigt. Die von der verwendeten *software* (*Vector NTI*®) eingeführten Lücken in der Aminosäureabfolge dienen einem optimalen Alignment und sind durch eine gestrichelte Linie angezeigt. Homologe Reste sind gelb, konservative Austausche sind grün markiert. Während die Sequenzhomologie der S-Domänen bei fast 85 % liegt, divergieren die pre-S-Sequenzen um 50 %²⁴. Die duCPD-Binderegion (blaue Linie) und die Matrixdomäne (rote Linie) in DHBV pre-S sind ebenfalls gekennzeichnet.

Die pre-S-Domänen der beiden Avihepadnaviren weisen somit einerseits eine große Übereinstimmung in ihrer Funktion und in ihren Eigenschaften auf, divergieren andererseits aber offensichtlich bezüglich ihres Tropismus und ihrer Primärsequenz. Dies bildete die Grundlage zur Untersuchung der Spezifität des Superinfektionsausschlusses in diesem Abschnitt der Arbeit, in welchem quantitativ ermittelt wurde, inwiefern HHBV-L fähig ist eine DHBV-Infektion von PDHs zu verhindern.

Das Resultat der Expressionsanalyse von Ad-HeL-transduzierten Zellen zeigt, dass HHBV-L erfolgreich in PDHs synthetisiert wird und im Immunoblot neben DuL wie zu erwarten bei etwa gleicher Größe detektiert werden kann (Abbildung 2-32 A, mittlerer und unterer Blot, Spur 3 und 4). Dass die S-Domäne von HHBV-L trotz extrem hoher Homologie zur DHBV-Sequenz nicht durch den monoklonalen α -DHBV S-Antikörper erkannt wird (oberer Blot, Spur 3 und 4), liegt sehr wahrscheinlich darin begründet, dass die Erkennungssequenz des Antikörpers im Sequenzabschnitt aa 270-283 liegt (siehe Tabelle Primärantikörper in 1.1.1) und hier 4 Aminosäureaustausche vorliegen.

In der SIA-Analyse (Abbildung 2-32 B und C) offenbarte sich folgender Phänotyp: Im Versuch fiel die Transduktionseffizienz mit 23 % zwar etwas geringer aus (Faktor 1,5), als die von Ad-DuL- (33%) und Ad-GFP-(34%) transduzierten Zellen, gleichzeitig war die Infektionsrate Ad-HeL- gegenüber Ad-DuL-transduzierten Hepatozyten aber gesteigert (Faktor 3,3: Ad-DuL = 0,03; Ad-HeL = 0,1). Die Kalkulation der SIA-Faktoren und die entsprechende Normalisierung lassen das Ergebnis eindeutig werden: Neben Ad-DuL und Ad-GFP mit SIA-Faktoren von 0,11 bzw. 1,67 ergab sich für HeL-synthetisierende Zellen ein SIA-Faktor_{Norm} von 1,39 bzw. von 0,83. Daraus ergibt sich eine um den Faktor 12 (0,07→0,83) gesteigerte Akzeptanz für PDHs, die statt L_{wt} das große Hüllprotein von HHBV exprimierten.

Die Resultate demonstrieren, dass trotz funktioneller Übereinstimmungen mit DHBV-L (z.B. Rezeptorbindung) und einem hohen Maß an Sequenzhomologie, das L-Protein des Graureiher HBV nicht in der Lage ist, eine DHBV-Infektion von PDHs wirksam auszuschließen.

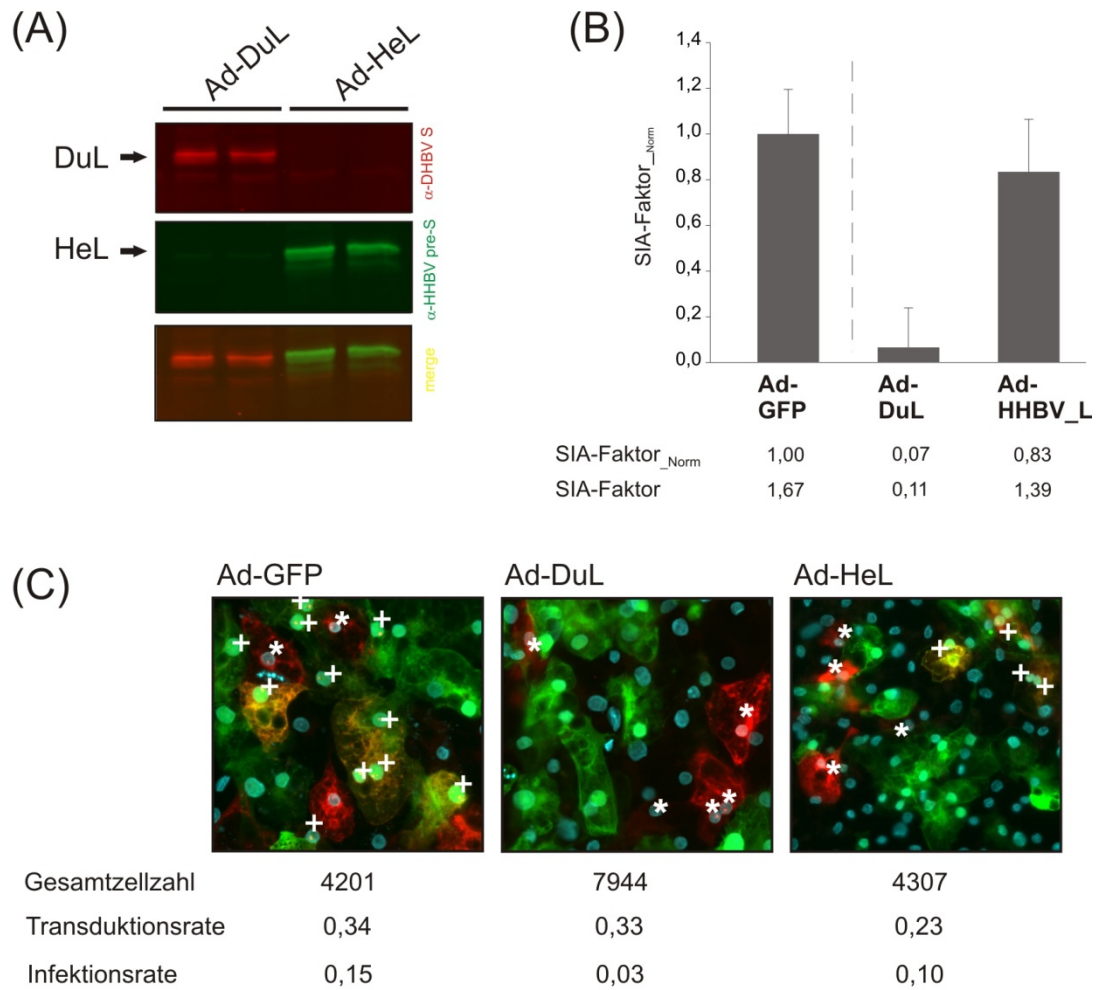


Abbildung 2-32 DHBV-L kann im Vermitteln der SIR nicht durch das Hüllprotein vom Graureiher HBV substituiert werden.

HHBV-L wurde in den adenoviralen Kontext eingeführt und Adenoviren (Ad-HeL) generiert. Die Transgenexpression in PDHs wurde analog zu vorangehenden Abschnitten im Western Blot (A) sowie fluoreszenzmikroskopisch (C) analysiert, um dann in einer SIA-Analyse quantitativ bezüglich von Superinfektionsereignissen ausgewertet zu werden (B). Die Detektion im Immunoblot erfolgte mit einem monoklonalen DuS- und einem polyklonalen HHBV-pre-S-spezifischem Antiserum. In (B) und (C) sind die Resultate der IFA-basierten SIA-Analyse an PDHs aus einer Leberzellpräparation in 2 unabhängigen Infektionsansätzen gezeigt.

3 Diskussion

Virale Interferenz beschreibt das Phänomen, dass eine bereits infizierte Zelle eine weitere Infektion bzw. eine Re-Infektion durch ein homologes Virus effizient auszuschließen vermag. Diesen Prozess, der auch als Superinfektionsausschluss bzw. –resistenz (SIR) bezeichnet wird, galt es für die hepadnavirale Infektion näher zu untersuchen, mit dem Ziel, Details zum zugrunde liegenden Mechanismus zu erhalten. Am DHBV-Modellsystem wurde die hepadnavirale SIR im Allgemeinen sowie der Beitrag von potentiell involvierten viralen Komponenten evaluiert. Grundlage zur Fragestellung war zum einen die Beobachtung, dass die Rezeptorkomponente duCPD in DHBV-infizierten Hepatozyten herabreguliert ist und zum anderen, dass dieser Zustand allein durch das DHBV L-Protein vermittelt wird^{179,180}. Die Hypothese, dass diese Beobachtungen mit einer SIR korrelieren könnten, schien naheliegend.

Obwohl umhüllte Viren diesbezüglich multiple Mechanismen entwickelt haben, adressieren virale Hüllproteine meist die Synthese, die Aktivität oder die Halbwertszeit des zellulären Rezeptormoleküls. Bei Retroviren wie HIV-1 oder Foamyviren²⁰⁶, aber auch z.B. bei Influenza A Viren ist die Hüllprotein-vermittelte SIR dokumentiert, die nachweislich oft an die Herabregulierung eines Rezeptorproteins gekoppelt ist. In HIV-infizierten Zellen vermitteln die 3 Genprodukte Env, Nef und Vpu unabhängig voneinander die Runterregulierung des Rezeptormoleküls CD4 (für Übersichtsartikel siehe Ref.²⁰⁷). Analog zu Beobachtungen im DHBV-System durch Breiner *et al*¹⁷⁹(1.2.3), kommt es in infizierten T-Zellen zur Interaktion von Hüllprotein (Env) und Rezeptor (CD4) im ER, durch die Komplexbildung und Aggregation wird der Weitertransport von CD4 zur Zelloberfläche verhindert. Während Env und Vpu nur hemmend auf neusynthetisiertes CD4 wirken, indem sie dessen Transport zur Zelloberfläche behindern (Env) bzw. den Rezeptor Richtung Proteasom weiterleiten (Vpu), ist Nef in der Lage die Internalisierung von CD4-Molekülen von der Zelloberfläche zu fördern, gefolgt vom Abbau des Rezeptors in Lysosomen. Als frühes Protein übernimmt Nef in diesem Zusammenhang entscheidende Funktion (für Übersichtsartikel siehe Ref.^{208,209,201}). Huang und Kollegen wiesen für Influenza A Viren nach, dass die virale Neuraminidase notwendig und ausreichend ist, um den Rezeptor Sialinsäure von der Zelloberfläche zu entfernen und so den Haemagglutinin-vermittelten Zelleintritt im Zuge einer Neuinfektion in eine bereits infizierte Zelle zu verhindern²¹⁰. Als eine Voraussetzung für die Neukombination von Genom-Segmenten sind Influenza A Viren evolutiv betrachtet allerdings auf ein gewisses Maß an Superinfektion angewiesen^{211,212,213,214}.

Die Effizienz, mit der eine gegebene Neuraminidase die Neuraminsäure abdaut, könnte demnach entscheidend die Häufigkeit von Neukombinationen der RNA-Segmente beeinflussen.

Dass die virale Interferenz anstatt auf der Ebene des Viruseintritts auch auf Ebene von Translation/Replikation stattfinden kann, zeigen Studien an HCV. Die Translation und vermutlich auch die Replikation eines zweiten viralen RNA-Genoms ist in bereits HCV-replizierenden Zellen deutlich beeinträchtigt²¹⁵. Die Level von CD81 und dem Scavenger-Rezeptor SR-BI, Faktoren, die in den Viruseintritt in die Zelle involviert sind, zeigen sich früh im Infektionszyklus nicht beeinflusst. Obwohl in Studien die Rezeptorunterregulierung noch zu einem späten Zeitpunkt im Zyklus beobachtet wurde²¹⁶, scheint dem SIR-Mechanismus bei HCV prinzipiell keine Blockade des Viruseintritts zugrunde zu liegen. Das Bovine Virusdiarrhoe-Virus, kurz BVDV, ein anderer Vertreter der Familie der Flaviviren, reguliert die SIR akut infizierter Zellen interessanterweise über einen dualen Mechanismus. Der Ausschluss findet dabei sowohl auf Ebene des Viruseintritts, vermittelt durch das Glykoprotein E2, als auch auf Replikationsebene statt, wobei diese Blockade Strukturprotein-unabhängig ist²¹⁷.

Verschiedene *in vivo* Studien am DHBV-Tiermodell kamen bereits zu dem Schluss, dass eine produktive Infektion mit dem Avihepadnavirus eine SI derselben Zelle ausschließt. In Wettbewerbsstudien mit DHBV_{wt} und einer zytopathischen DHBV-Mutante zeigte sich beispielsweise, dass das Auftreten von Wildtyp-infizierten Zellen eindeutig abhängig war von der Regeneration des Lebergewebes^{185,218}. Dass es sich hierbei um einen aktiven Infektionsausschluss und nicht um eine Transkomplementation des zytopathischen Effekts durch ein superinfizierendes Wildtyp-Virus handelte, wurde daran ersichtlich, dass sich der Wildtyp in Konkurrenz mit einer nicht-zytopathischen Mutante nicht durchsetzen konnte. Analog dazu offenbarte eine Studie zur viralen Kinetik, dass sich DHBV_{wt} gegenüber einer Mutante mit partiellem Replikationsdefekt zwar in initialen Phasen des *spreads* in der Leber durchzusetzen vermochte, im durchinfizierten Stadium war dies aber ebenfalls von der Entstehung neuer, noch nicht-infizierter Zellen abhängig¹⁸⁷.

Indem sie das elegante *tool* eines genetisch markierten DHBV (DHBV-ClaI) nutzten, lieferten Walters und Kollegen in *In vitro*- und *In vivo*-Studien nicht nur einen weiteren Beweis für die Existenz der SIR bei Avihepadnaviren sondern demonstrierten unter anderem eindrücklich, dass i) eine Zweitinfektion sogar ausgeschlossen wird, wenn das superinfizierende Virus einen Replikationsvorteil hat, ii) die SIR bei DHBV nur homologe, nicht jedoch heterologe

superinfizierende Viren, wie Adenoviren, HSV-1 oder VSV, betrifft und iii) die SIR von der Genexpression des initial infizierenden Virus abhängt und einzig durch das L-Protein vermittelt wird¹⁸⁰. Offen blieben an dieser Stelle die exakte zeitliche Korrelation von zellulärer Resistenz und L-Expression sowie die Identifizierung des zugrunde liegenden L-vermittelten SIR-Mechanismus. Diese Punkte waren daher in der vorliegenden Arbeit adressiert worden.

3.1 Quantitative Evaluierung der L-vermittelten SIR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SIR-Phänomen einer DHBV-Infektion qualitativ sowie quantitativ evaluiert. Auf Grundlage der Tatsache, dass der Ausschluss einzig L-Protein-vermittelt ist, wurde das große Hüllprotein selbst bzw. Mutanten des L-Proteins in PDHs exprimiert. In der L-exprimierenden Hepatozyte wurde so eine stattgefundene DHBV-Infektion simuliert und die „infizierte“ Zelle daraufhin auf ihre Potenz hin untersucht eine weitere Infektion mit DHBV auszuschließen.

PDHs können nur sehr ineffizient mit herkömmlichen Methoden (z.B. CaCl₂-Transfektion, Lipofektion, Elektroporation) transfiziert werden (meist unter 1% Effizienz). Um für die Zwecke dieser Arbeit eine ausreichende Expression des gewünschten Transgens zu erreichen, wurde auf die Transduktion der Hepatozyten durch rekombinante Adenoviren zurückgegriffen. Dies erwies sich als sehr effizient und im Sinne der Reproduzierbarkeit der Untersuchungen als sehr praktikabel. In der Etablierungsphase wurde die Kinetik der Transgenexpression verfolgt (2.1.1 und 2.1.2), so dass die Versuchsbedingungen für nachfolgende Studien so gewählt werden konnten, dass die Menge an L zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen mit DHBV optimal war (Abbildung 2-4). Die starke Überproduktion des Transgens gewährleistete darüber hinaus dessen Verfügbarkeit über die gesamte Zeitspanne des Versuchs. Im klonierten adenoviralen Vektor wurde L mit GFP koexprimiert. Da die Expression der beiden Proteine dabei eindeutig korrelierte (2.1.1), konnte auf einen direkten Nachweis von L in den Folgeanalysen verzichtet werden.

Bevor das Ausmaß der L-Expression auf die Superinfizierbarkeit von Hepatozyten quantitativ studiert wurde, wurde ein Augenmerk auf die reine Infizierbarkeit der transduzierten Zellkulturen gelegt (2.2). Diese wurde hierfür in Bezug zur Infizierbarkeit von untransduzierten PDHs gesetzt, die als Kontrollinfektionen mitgeführt wurden. Um den Kontrollansatz zu validieren, war an ihm zunächst das Ausmaß von potentiell auftretenden, internen Schwankungen (Suszeptibilität von Hepatozyten aus einer Leberzellpräparation,

ausgesät auf unterschiedlichen Zellkulturplatten) analysiert worden. Die statistische Auswertung zu den Datensätzen wies hierzu eindeutig aus, dass die beobachteten Abweichungen (2.2.1, Abbildung 2-6 A und B jeweils linke Bilderreihe, maximal 35 % Abweichung) nicht signifikant und damit statistisch irrelevant waren (Abbildung 2-7 und Abschnitt 5.1.1). Dieses Resultat legitimiert einen direkten Vergleich von Infektionsansätzen, die zwar am selben Tag aber an Zellen auf unterschiedlichen Zellkulturschalen durchgeführt werden. Sogar der Bezug zu nur einer Kontrollinfektion (d.h. nur auf einer Schale wird die Kontrolle mitgeführt) ist demnach theoretisch ausreichend. Da das System von Primärzellen aber *per se* immer die Möglichkeit größerer Abweichungen in der Qualität der Zellen birgt, ist es unabdingbar nur Infektions- und Transduktionsraten von Zellen eines bestimmten Tages nach Plattieren und nur die Infizierbarkeit von Zellen einer Charge d.h. aus einer Leber direkt miteinander zu vergleichen.

Ob die Transduktion von Hepatozyten an sich bzw. die Expression des Reporterproteins GFP bereits einen Einfluss auf die Infizierbarkeit der Zellen ausübt, wurde ebenfalls untersucht. Die Resultate hierzu (2.2.2) bestätigten Ad-GFP-transduzierte PDHs, die in allen Untersuchungen mitgeführt wurden, voll in ihrer Funktion als eine Kontrolle: Während sich bei geringer DHBV MOI (5 GE/Zelle) und ansteigenden Adenovirus-Konzentrationen zwar ein leichter Anstieg in der Infizierbarkeit beobachten ließ (Abbildung 2-6 A und Abbildung 2-8, Ad-GFP), fiel bei höheren DHBV MOIs (25 bzw. 125 GE/Zelle) die Infektionsrate niedriger als an untransduzierten Hepatozyten aus. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse an untransduzierten Hepatozyten (siehe oben und Abbildung 2-7) ist für den Fall negativer Abweichungen (Abbildung 2-6 A, Ad-GFP, maximal 40 %: 4 % → 2,4 %) zu vermerken, dass diese eindeutig im Bereich der tolerierbaren Schwankung lagen. Entscheidend ist an dieser Stelle die Aussage der Statistik zu den Daten (Abbildung 2-8, 5.1.2), der zufolge sich für Ad-GFP-transduzierte Zellen keinerlei Effekt von statistischer Relevanz abzeichnete, weder ein positiver noch ein negativer. Im Fazit bedeutet das Ergebnis folgendes: Erstens schließt es aus, dass die Verwendung unaufgereinigter adenovirushaltiger 293-Zelllysate, beispielsweise aufgrund einer toxischen Wirkung, nachteilig ist. Zweitens ist das Resultat für die Funktion von Ad-GFP als eine Kontrolle dahingehend maßgeblich von Bedeutung, da den Daten zufolge von der Transduktion mit Adenoviren, d.h. vom Transduktionssystem an sich, keinerlei Einfluss ausgeht. Für das Konstrukt Ad-DuL greift das Ergebnis drittens vorweg, dass das koexprimierte Reporterprotein keinen positiven Einfluss ausübt, der wiederum zu einem falsch-positiven Ergebnis führen könnte bzw. netto keinen L-vermittelten Effekt

messbar machen würde. Dies wäre der Fall, wenn ein GFP-vermittelter positiver Effekt existieren würde, der wiederum einen L-vermittelten negativen Effekt (in derselben Zelle) kompensiert. Die Resultate schließen auch diese Möglichkeit aus.

Ein konträres Bild ergab sich für L-exprimierende PDHs in den Parallelanalysen: Unabhängig von der eingesetzten DHBV-Menge zeigte sich hier eindeutig, dass die Infizierbarkeit der Zellkultur kausal mit der Anzahl L-exprimierender Zellen zusammenhing (2.2.3). Mit ansteigender Adenoviruskonzentration sank die Infektionsrate kontinuierlich und signifikant, wobei die Infizierbarkeit um zwei Drittel zurückging, wenn 40 % der Zellen L-positiv waren (Abbildung 2-6 B, 11,1 % → 3,3 %). Dass diese Limitierung ihre Ursache in einem toxischen Effekt, verursacht durch die verwendeten 293-Zelllysate hatte, schlossen die Ergebnisse an Ad-GFP-transduzierten Zellen aus (siehe oben). Indirekt hatte die Ad-GFP-Kontrollstudie auch offenbart, dass die einzige potentielle Wirkung bei der Verwendung von Ad-DuL von L selbst ausgeht. Die reduzierte Infektionsrate Ad-DuL-transduzierter Kulturen hatte ihre Ursache demnach allein in der Expression von L. Diese Erkenntnis war dahingehend entscheidend, da sie die verwendete Methode als solche validierte, die darauf abzielte, dass Ad-DuL in PDHs eine DHBV-Infektion simulieren kann und so eine Untersuchung des SIR-Phänomens möglich machte.

An dieser Stelle zeichnete sich bereits ab, dass die Limitierung der DHBV-Infektion die SIR auf Einzelzellebene widerspiegelt. In Abschnitt 2.3.2 wurde dieser Ausschluss quantitativ auf Einzelzellebene untersucht und es bestätigte sich genau dies: Eine L-Protein-exprimierende Hepatozyte schließt eine weitere Infektion der Zelle effizient aus. Für Ad-GFP-transduzierte Zellen hingegen bestätigte sich in den SIA-Analysen das Resultat aus 2.2.2 auch auf Einzelzellebene. Unabhängig von leichten Schwankungen in den Transduktionsraten Ad-GFP-transduzierter Zellen (Abbildung 2-11, max. 21 %) hatte die GFP-Expression keinen Einfluss auf die Infizierbarkeit derselben Zellen mit DHBV, was sich in SIA-Faktoren ≥ 1 widerspiegelte. Da sich in allen, auch hier nicht gezeigten Analysen SIA-Faktoren_{Ad-GFP} ergaben, die eher die Rate der erwarteten superinfizierten Zellen übertrafen (SIA-Faktor > 1), als sie nur zu bestätigen (SIA-Faktor = 1), kann an dieser Stelle zumindest ein geringer GFP-vermittelter Vorteil von Ad-GFP-transduzierten Zellen, produktiv mit DHBV überinfiziert zu werden, nicht ganz ausgeschlossen werden, auch wenn dieser vermeintliche Infektionsvorteil auf Gesamtzelllevel nicht messbar gewesen war (2.2.2 und 5.1.2). Für Ad-DuL-transduzierte Zellen würde sich hieraus theoretisch zwar die intrazelluläre Situation ergeben, dass eine L-

vermittelte Beeinträchtigung einer Zelle superinfiziert zu werden, durch die Koexpression von GFP geschmälert würde, allerdings hat dieser vermeintlich positive Effekt durch die spätere Normierung des SIA-Faktors_{S_{Ad-DuL}} keine Relevanz mehr. Entscheidend ist an dieser Stelle das Folgende, nämlich dass, wie oben dargelegt, die Daten eindeutig ausschließen, dass zwischen den Adenoviren und DHBV eine virale Interferenz existiert: Ad-GFP-transduzierte Zellen können mindestens ebenso effizient wie untransduzierte Zellen mit DHBV infiziert werden. Mit der etablierten Quantifizierungsmethode, die eine visuelle Analyse mit einer fundierten Kalkulation von SIA-Ereignissen kombinierte, gelang es somit superinfizierte Zellen vor dem hohen Hintergrund an infizierten aber nicht transduzierten PDHs herauszufiltern, so dass der signifikante und L-vermittelte Effekt sichtbar wurde. Die Methodik (Bestimmung des SIA-Faktors_{Norm}) machte darüber hinaus Ergebnisse aus Infektionsstudien an Zellen verschiedener Chargen vergleichbar, was die Validität der Resultate unterstreicht und für die praktische Durchführung der zell- und zeitaufwendigen Untersuchungen einen entscheidenden Vorteil bot.

Die Simulation einer produktiven DHBV-Infektion durch die Expression von L ergab in allen 4 durchgeführten Untersuchungen (2.3.2) ein einheitliches und völlig konträres Bild zu den Ergebnissen der GFP-Kontrolle: Während mindestens jede 10. Ad-GFP-transduzierte Zelle (10 doppelt infizierte Zellen von insgesamt 106 transduzierten Zellen, Tabelle in Abbildung 2-11) superinfiziert worden war, führte die Synthese von L zu einer Resistenz, die höchstens in jeder 300. L-exprimierenden Hepatozyte eine SI messbar machte (Abbildung 2-12). Im Durchschnitt wurde mit Ad-DuL die Rate der erwarteten superinfizierten Zellen um den Faktor 10 unterschritten.

In dem hier verwendeten System wurde das Transgen (DuL) maximal überexprimiert. Inwiefern die Suszeptibilität L-exprimierender Zellen von einer bestimmten Menge an L abhängt, war aufgrund dessen nicht messbar. Eine Untersuchung, die die Frage zur quantitativen Abhängigkeit des Ausmaßes der Resistenz von der Menge an L adressiert, wäre z.B. mit einer Serienverdünnung von DHBV-haltigem Serum bis auf einen Partikel pro Zelle und einer nachfolgenden Infektion mit genetisch markiertem Virus möglich. Einen noch differenzierteren Einblick würde die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems wie z.B. des Tet-Systems²¹⁹ erlauben. Durch Ein- und Ausschalten der Genaktivität könnte die Menge des Transgens bis auf ein Minimum reguliert und dessen Einfluss auf eine weitere Infektion der Zelle studiert werden.

Spätestens nach 12 h, in der Immunoblot Analyse auch früher (Abbildung 2-4), wurde L in den transduzierten PDHs detektierbar (2.3.3) und es zeichnete sich ab, dass die Expression von L und die einsetzende SIR zeitlich exakt korrelierten, wobei sich eine antiproportionale Wechselbeziehung der Ereignisse (SIR und L-Expression) ergab (Abbildung 2-13): spätestens 48 h p.Tr. und 24 h nachdem L nachweisbar wurde, war die SI der Zellen vollständig ausgeschlossen. Bereits nach 8 h allerdings, ohne dass L in diesem Fall schon im Western Blot detektierbar gewesen wäre, war die Suszeptibilität der Zellen rückläufig und sank ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich. Ein Effekt, der vom Input herrührte, konnte anhand dessen ausgeschlossen werden. Die Kinetik hob die entscheidende Rolle von L für die SIR erneut hervor, wobei die Dosis-/Wirkungsbeziehung von L-Expression und SIR zwar eindeutig war, einen Schluss auf den Zeitpunkt der Blockade im Infektionszyklus, ließ sie an dieser Stelle aber noch nicht zu. Hinsichtlich der eigentlichen Wirkungsweise von L bei der Etablierung der Resistenz belegt die Kinetik aber eindeutig, dass die von L ausgehende Wirkung eine unmittelbare ist. Auch andere Studien gaben schon einen Hinweis darauf, dass die beiden Ereignisse zeitlich korrelieren, das Zeitfenster betrug allerdings noch Tage¹⁸⁰. Mittels des hier zum Einsatz gekommenen Expressionssystems und der etablierten Quantifizierungsmethode war es möglich die Dosis-/Wirkungsbeziehung eindeutig und erstmalig quantitativ zu belegen sowie das Zeitfenster zwischen L-Synthese und erfolgreichem Infektionsausschluss deutlich weiter zu schließen.

3.2 Quantifizierung der Zellbindung an L-exprimierende Hepatozyten

Allgemein geht dem Viruseintritt in die Wirtszelle die spezifische Interaktion der Partikel mit Molekülen auf der Zelloberfläche voraus, wobei es sich hierbei allgemein um zelluläre Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate handeln kann. Dabei kann ein zellulärer Binfaktor häufig und ubiquitär vorkommen oder aber auch selten und zelltypspezifisch sein. Das Resultat dieser Interaktion kann dabei nur der Ankonzentrierung viraler Partikel auf der Zelle dienen, der Bindepartner kann aber auch als eigentlicher Rezeptor dienen und nach der Bindung die Aufnahme der Viren in die Zielzelle induzieren²²⁰. Generell kann die Interaktion mit einem einzigen Faktor oder Rezeptor schwach sein (K_D im millimolaren Bereich), die Gesamtheit aller Interaktionen macht den Prozess aber irreversibel.

Da sich mit duCPD, wie unter 1.1.2 erläutert, weder der Gewebe- noch der Wirtstropismus von DHBV erklären lassen¹⁷⁵, ist es offensichtlich, dass das Hepadnavirus, wie es auch für andere Viren der Fall ist, multiple Binfaktoren und Rezeptoren in koordinierter Reihenfolge

nutzt, um in seine Wirtszelle zu gelangen. Obwohl duCPD unumstritten die Erwartungen an einen Virusrezeptor erfüllt und z.B. pre-S mit extrem hoher Affinität bindet ($K_D = 1\text{--}2\text{ nM}$)^{178,171}, ist das Protein nur transient an der Zelloberfläche lokalisiert, von wo es über Endozytose schnell wieder in die Zelle aufgenommen wird^{173,174}. Dies ist wiederum untypisch für einen Virusrezeptor. Breiner und Kollegen zeigten, dass die Rezeptormenge in infizierten Hepatozyten signifikant und L-Protein-abhängig dezimiert ist und mit ihrem Modell der Herabregulierung der duCPD-Menge von der Zelloberfläche wäre die L-vermittelte Limitierung einer DHBV-SI aufgrund einer verhinderten Zellbindung (und Aufnahme) des Virus prinzipiell erklärbar²²¹. Obwohl auch im Rahmen dieser Arbeit die reduzierte duCPD-Menge in L-Protein-abhängiger Weise beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), lassen die Ergebnisse der SIR-Mutationsanalyse in Abschnitt 2.5.2.3 eindeutig den Schluss zu, dass die duCPD/pre-S-Interaktion für den der SIR zugrunde liegenden Mechanismus keine Rolle spielt; Alle duCPD-bindedefizienten L-Mutanten waren ebenso wie L_{wt} in der Lage, eine Zweitinfektion der Hepatozyten zu verhindern. Allerdings bleibt offen, ob von der L-Expression möglicherweise nur die sehr geringe Anzahl an duCPD-Molekülen auf der Zelloberfläche betroffen ist und diesem Prozess evtl. keine direkte Interaktion der beiden Moleküle zugrunde liegt. Das Gesamtproteinlevel des Rezeptors zum Zeitpunkt des Infektionsausschlusses müsste davon nicht betroffen sein.

Dass für den Eintrittsmechanismus von DHBV weitere, duCPD-unabhängige Faktoren benötigt werden, ist bereits durch mehrere Studien aus unserer Abteilung demonstriert worden. Es wurde beispielsweise herausgearbeitet, dass der stabilen und irreversiblen Komplexbildung von pre-S und duCPD eine labile und reversible Bindung an Hepatozyten vorausgeht¹⁹⁴. In Infektionskompetitionsstudien mit rekombinanten, von DHBV pre-S abgeleiteten Peptiden zeigte sich, dass das myristolierte Peptid Dpre-S 2-41^{myr} an Hepatozyten bindet und in Folge eine Infektion effizient inhibiert. Da die duCPD-Binderegion außerhalb dieser Sequenz liegt, ließ sich schlussfolgern, dass der N-Terminus von pre-S einen distinkten aber eindeutig duCPD-unabhängigen Schritt beim Viruseintritt in die Zelle vermittelt¹⁸². Gegen eine duCPD-abhängige Primärbindung spricht auch die Beobachtung, dass die Zellbindung von DHBV auch mit micromolaren Mengen einer löslichen Variante der virusbindenden C-Domäne von duCPD nicht kompetierbar ist, während für eine vollständige Hemmung der Infektion nur nanomolare Mengen der Rezeptorvariante benötigt werden^{eigene unpublizierte Daten,171}. Für den SIR-Mechanismus wäre demnach auch vorstellbar, dass L aus der Initialinfektion mit einem bis dato noch unbekanntem zellulären Korezeptor oder Binfaktor

interagiert, diesen so unzugänglich für das sekundär eintreffende Virus macht und so die Anreicherung viraler Partikel an die Zelle verhindert.

Die Fragestellung, ob bereits die Zellbindung (und –aufnahme) durch die Synthese von L beeinträchtigt ist, wurde in der Arbeit von 2 Seiten aus angegangen: Nachdem eine geeignete Quantifizierungsmethode etabliert und verifiziert worden war, wurde zum einen die Bindung von Viren an L_{wt}-exprimierende Hepatozyten quantifiziert. Zum anderen wurde die Superinfizierbarkeit von PDHs untersucht, die L-Mutanten bildeten, die nicht mehr in der Lage waren, mit duCPD zu interagieren. Eine direkte Interaktion sowie die L-vermittelte Runterregulierung des Rezeptors waren in diesem Ansatz folglich *per se* ausgeschlossen worden. Die Ergebnisse dieses zweiten Ansatzes werden unter 3.3.2 diskutiert.

3.2.1 Quantifizierungsmethode und Kompetitionsstudie mit Suramin

Es ist bekannt, dass *in vitro* nur ein Bruchteil des hepadnaviralen Virusinokulums an Zellen bindet. Daher galt es zunächst, eine geeignete Methode zur Detektion und Quantifizierung zellassoziierter und genomhaltiger Viruspartikel zu etablieren. Seitens verschiedener Forschungsgruppen wurden unterschiedliche Methoden zur Messung der initialen Zellbindung angewandt. Chojnacki und Kollegen beispielsweise, die in ihren Untersuchungen am Endozytose-Weg von DHBV interessiert waren, verfolgten in einer aufwendigen Immunfluoreszenz-basierten Analyse mittels konfokaler Mikroskopie die Aufnahme von Viruspartikeln bis in die Endosomen von Hepatozyten. Analysen zu initialen Schritte im Infektionszyklus durch Klingmüller *et al.* zielten auf die Hüllprotein-abhängige Zellassoziation von DHBV ab. Mittels ¹²⁵I-markierter subviraler Partikel konnten die Autoren zeigen, dass im Überschuss zugegebene SVPs in einer pre-S-abhängigen Weise die initiale Bindung infektiöser Partikel an Hepatozyten verhindern⁹⁹. Da die Intention der Bindestudie in der hiesigen Arbeit einzig in der quantitativen Bewertung zellassoziierter und genomhaltiger Viruspartikel lag, wäre zum einen eine Messung der wenigen Bindeereignisse auf Einzelzellebene in der Praxis schwer durchführbar gewesen (Sensitivität, Zeitaufwand). Außerdem wäre der Mangel an Quantität, den die genannten Nachweismethoden aufweisen, eine extreme Herausforderung bezüglich einer allgemeingültigen Aussage zur viralen Zellassoziation gewesen. Ein weiteres großes Problem, welches es methodisch abzudecken galt, stellte die Spezifität der Messung dar.

Die auf Detektion mit einer sequenzspezifischen Sonde basierende und hier zum Einsatz gekommene qRT-PCR-Methode erwies sich im Resultat als extrem sensitiv mit einer

Linearität über einen Messbereich von 5 Log-Stufen, was vor allem die Möglichkeiten semi-quantitativer Methoden weit übertrifft¹⁹⁵. Auch bezüglich der Spezifität stellte sie die Quantifizierungsmethode der Wahl dar.

Prinzipiell gilt, dass die Effizienz einer DHBV-Infektion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hoch ist und trotz signifikanter Unterschiede in der Kinetik zu frühen Zeitpunkten der Infektion alle Zellen der Leber oder in Zellkultur innerhalb weniger Tage durchinfiziert werden können¹⁹⁴. Die initiale Zellbindung des Virus hingegen ist stark abhängig von der Viruskonzentration und der Inkubationszeit wobei generell nur ein kleiner Prozentsatz (1-10 %) des Inokulums überhaupt an die Zellen bindet^{195,eigene unpublizierte Daten}. Den grundlegenden Unterschied zur Situation *in vivo* stellt dabei die deutlich höhere lokale Konzentration der Viren in der Leber dar¹⁹⁴. Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit etablierte PCR-Methode erlaubte es, diese quantitative Herausforderung zu meistern. Die Bindeanalyse (2.4.1) erfolgte unter Bedingungen, die i) nur die Assoziation der Viren an die Zelloberfläche zuließen (4 °C Umgebungstemperatur) oder ii) auch die Internalisierung von Partikeln erlaubten (37 °C Umgebungstemperatur). Hierbei zeigte sich, dass bei höherer Temperatur eine Anreicherung genomhaltiger Partikel an die Leberzellen um den Faktor 2 resultierte. Nach dreistündiger Inkubation war jedes 7. Virus aus dem Input (Abbildung 2-14 A, Inokulum= $1,25 \times 10^7$ GE/well \rightarrow zellassozierte Viren= $1,9 \times 10^6$ GE/well) an Zellen gebunden. Unter der Annahme, dass pro Zelle nur 1 DHBV-Genom produktiv wird¹⁹⁴, 4 % (entspricht 2×10^4 Zellen pro Schale) aller Zellen waren positiv für eine DHBV-Infektion, bedeutete das Ergebnis, dass nur jedes 100. (bzw. 1 %) der initial zellgebundenen Partikel bzw. in etwa jedes 600. Virus (bzw. 0,15 % der Viren) aus dem Inokulum eine Infektion gesetzt hatte. Diese Ergebnisse stehen damit in großer Übereinstimmung mit Erkenntnissen aus einer umfangreichen Vergleichsanalyse zur Effizienz der *In vitro*- gegenüber der *In vivo*-Infektion bei DHBV¹⁹⁴.

Mit Suramin, einem bereits beschriebenen Inhibitor der DHBV-Infektion^{196,162}, der im Rahmen einer Hemmstudie eingesetzt wurde, konnte die Signifikanz der etablierten PCR-Methode verifiziert werden (2.4.1). Ab einer Konzentration von ≥ 40 $\mu\text{g/ml}$ reduzierte das Harnstoffderivat sukzessive die Virusinfektion (Abbildung 2-14). Bemerkenswerterweise fielen hierbei die Ergebnisse zur Wirkung der Substanz auf die virale Zellassoziation bei unterschiedlichen Inokulationsbedingungen (4 oder 37 °C), sowie auf die Infektionseffizienz an sich, analog aus. Die statistische Auswertung hierzu ergab (Daten nicht gezeigt), dass die halbmaximale Inhibition durch das Harnstoffderivat in allen 3 Fällen bei ganz ähnlichen Konzentrationen (IC_{50} ca. 30 $\mu\text{g/ml}$ Suramin) erreicht wurde. Zunächst lässt dies darauf

schließen, dass die Substanz unter allen Bedingungen die gleiche Wirkung entfaltet. Da die Aufnahme der Viren in die Zellen bei 4 °C prinzipiell ausgeschlossen ist und sehr wahrscheinlich auch der größte Teil von Suramin bei dieser Temperatur nicht aufgenommen wird²²², spricht das Ergebnis des Weiteren dafür, dass Suramin einen sehr frühen Schritt im Infektionszyklus inhibiert. Somit liegt die Schlussfolgerung auf der Hand, dass die antivirale Wirkung von Suramin, zumindest hauptsächlich, in der Hemmung der Virusbindung an die Zellen liegt.

Im Gegensatz zur Wirkung auf die Infektion, erreichte die maximal inhibitorische Wirkung auf die Bindung sowie auf die Aufnahme, ab einer Suramin-Konzentration von etwa 120 µg/ml eine Plateauphase, die bei etwa 20 % der nicht-inhibierten Zellassoziation lag (Abbildung 2-14 B, linke Graphik). Ein Fünftel der Virusbindung ließ sich demnach nicht durch Suramin hemmen. Interessanterweise war nach der viertägigen Infektionsdauer und Suramin-Konzentrationen >120 µg/ml keine relevante Infektion mehr detektierbar. Im Ergebnis der qPCR stellte sich dies so dar, dass keine Netto-Amplifikation der initial eingebrachten viralen Genome stattfand, d.h. die Menge der final gemessenen Virus-DNA unterschritt bei diesen Inhibitorkonzentrationen jeweils deutlich die Menge an Input-DNA (Abbildung 2-14 A). In der korrespondierenden IFA fanden diese Ergebnisse Bestätigung (Abbildung 2-14 C). Für den gemessenen Anteil an Restbindung, der sich auch mit höheren Suramin-Konzentrationen nicht weiter reduzieren ließ, bedeutete das Ergebnis, dass dieser Anteil der Viren initial zwar an Zellen gebunden hatte, trotzdem aber nicht in der Lage war, eine produktive Infektion zu setzen.

Erklärungsansätze zur abortiven Zellbindung von DHBV

Verschiedene Szenarien, die diese abortive Zellbindung erklären können, sind vorstellbar: Erstens wäre es denkbar, dass, nachdem durch Suramin eine essentielle Komponente des produktiven Wegs der Infektion vollständig blockiert worden war, der residuale Anteil der Viren mit einem abortiven Interaktionspartner auf der Zelloberfläche interagierte und so direkt einen nicht-produktiven Weg einschlug.

Eine andere Ursache für die unproduktive Zellassoziation könnte die intrazelluläre Degradation der Viren in hepatischen Nicht-Parenchymzellen (NPCs) sein, die mit einem Anteil von 5-10 % die primäre Hepatozytenkultur kontaminieren und außerdem nicht mit DHBV infizierbar sind^{223,188}. Sinusoidale Endothelzellen (SEC, *sinusoidal endothelial cells*), die zu den NPCs gehören, sind *in vivo* den Hepatozyten vorgeschaltet, indem sie die

Blutgefäße in der Leber auskleiden und so die Leberzellen vor dem Blutstrom abschirmen. DHBV trifft vor der Interaktion mit seiner eigentlichen Wirtszelle somit auf eine Barriere aus SECs. Im Zuge der Leberzellpräparation geht diese dreidimensionale Gewebestruktur verloren und SECs liegen im *In vitro*-System vereinzelt den Hepatozyten auf²²¹ eine echte Barrierefunktion können sie nicht mehr übernehmen. Ein Erklärungsansatz für das Beobachtete wäre, dass SECs im Vergleich zu Hepatozyten DHBV effizienter binden, aufnehmen und schließlich degradieren. Sie könnten so die im *In vitro*-System verloren gegangene Funktion einer physikalischen Barriere kompensieren und die Hepatozyten in Kultur zumindest teilweise vor einer Virusinfektion schützen. Dass das Verschwinden DNA-haltiger Viruspartikel in gleichem Maße auch beobachtet wird, wenn duCPD in Hepatozyten überexprimiert wird, deutet in dieselbe Richtung, nämlich dass die Degradation der Restbinder eher in hepatischen Nicht-Parenchymzellen stattfindet¹⁹⁴.

Methodisch ist es möglich, Hepatozyten während der Leberzellpräparation durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation an- bzw. NPCs, tote Zellen und Zelltrümmer abzureichern (4.2.1.2). Eine Vorstudie an Kulturen mit einem deutlich reduzierten Anteil an NPCs brachte hierbei kein abweichendes Ergebnis, erneut war die Bindung von etwa einem Fünftel der Viren nicht durch Suramin hemmbar (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich an dieser Stelle die Beteiligung eines Zelltyps noch nicht eindeutig ausschließen. Die optimierte Methodik würde sich aber dazu eignen, Hepatozytenkulturen mit einem definierten Anteil an SECs zu generieren, um die Beteiligung der verschiedenen Zelltypen differenziert zu bewerten.

Der konstante Anteil an Restbindung, trotz ansteigender Suramin-Konzentrationen könnte auch darin begründet liegen, dass ein Teil der Viren im Inokulum bereits an bestimmte Serumfaktoren assoziiert vorliegt und aufgrund dessen *per se* nicht produktiv werden kann. Die Rezeptor-Ligand-Komplexe könnten nach Bindung an spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen aufgenommen und so aus dem Inokulum entfernt werden. Es ist bekannt, dass HBV die Eigenschaft hat, pre-S2-abhängig polymerisiertes humanes Serumalbumin zu binden und dieses wiederum die Bindung der Viren an die Leberzellen vermitteln kann²²⁴. Albuminpolymere werden dabei primär über spezielle Rezeptoren auf SECs und Kupfferzellen, nicht auf Parenchymzellen, aufgenommen und nachfolgend im *Scavenger-Pathway* degradiert^{225,226}. Die Assoziation an Serumalbumin, gefolgt von der Aufnahme in Endothelzellen bedeutet demnach einen abortiven Weg für HBV. Für DHBV wäre eine ähnliche Situation vorstellbar, nämlich die Komplexierung eines gewissen Anteils der Viren an Serumfaktoren, gefolgt von der gezielten Aufnahme der assoziierten Viren in

NPCs mit einer sich anschließenden Degradation dieser Viruspartikel im endozytotischen Weg.

Wann wirkt Suramin im Infektionszyklus?

Die Ergebnisse lassen natürlich auch die alternative Hypothese zu, dass der Anteil der abortiven Zellbinder aus dem Inokulum an Hepatozyten assoziiert und in diese aufgenommen wird. Daraus würden sich 2 Möglichkeiten für den weiteren Weg dieser Viren ergeben: i) Nach ihrer Aufnahme in PDHs würden sie im Rahmen einer zellulären Verteidigungsstrategie zum größten Teil abgebaut¹⁹⁴ oder ii) die Viren gelangen nach erfolgreicher Rezeptorbindung in die Zelle, können aber aufgrund einer sekundären antiviralen Wirkung von Suramin nicht produktiv werden.

Neben zahlreichen anderen Einflüssen, die das Harnstoffderivat auf intrazelluläre Prozesse und Faktoren nehmen kann, ist die Akkumulation von Suramin in Kompartimenten mit niedrigem pH-Wert (Endosomen, Lysosomen, TGN) beschrieben. Endosomale Enzyme, die am Internalisierungsprozess des Virus beteiligt sind, könnten hier einen Angriffspunkt bieten. Auch könnte Suramin eine Veränderung des Protonenmilieus intrazellulärer Vesikel bewirken, welches für die Kinetik des Fusionsprozesses viraler und zellulärer Membranen entscheidend ist^{162,227,228,229,100}. Die signifikante Diskrepanz zwischen der maximalen Wirkung von Suramin auf die Zellbindung einerseits und die Infektion andererseits (2.4.1, Abbildung 2-14), warf somit die Frage auf, ob Suramin noch inhibitorisch auf bereits gebundene Viren wirkt und dies die Ursache für die gemessene abortive Bindung liefern könnte.

Eine Untersuchung zur Kinetik der inhibitorischen Wirkung von Suramin gab hierzu Aufschluss (2.4.2, Abbildung 2-15): Zunächst zeigte sich, dass Suramin seine Wirkung generell nur vollständig entfalten kann, wenn es während der Inokulation zugegen ist. Eine Vorbehandlung der Zellen, ohne dass die Droge später während der Inokulation zugegen war, hatte keinerlei negativen Einfluss auf die Infektion. Dies spricht primär dafür, dass Suramin die Viren und keinen zellulären Interaktionspartner adressiert. Dass Untersuchungen an HBV bereits ergaben, dass sulfonierte Substanzen wie Heparin an die Viren und nicht an die Zellen binden, unterstreicht diese Vermutung¹⁶¹. Es ist mehrfach demonstriert worden, dass Suramin effektiv von Zellen aufgenommen wird^{228,229,222}. Der Grund für das Ausbleiben jeglicher antiviralen Wirkung bei einer Präinkubation der Zellen könnte demnach auch darin liegen, dass Suramin innerhalb der dreistündigen Vorbehandlung von den Leberzellen internalisiert wurde. Falls die Aufnahme dann noch mit dem Verlust seiner biologischen Aktivität

einhergehen würde, könnte Suramin, selbst falls es später in einem Zellkompartiment mit dem Virus aufeinandertreffen würde, seine hemmende Wirkung nicht mehr entfalten. Auch auf mögliche andere Faktoren/Abläufe wie z.B. die virale Replikation könnte das Harnstoffderivat folglich keinen Einfluss mehr nehmen. *In vivo*-Experimente von Tsiquaye und Kollegen beschreiben zwar die antivirale Aktivität von Suramin auf die virale Replikation, gleichzeitig zeigen ihre Untersuchungen aber auch den schnellen *turnover* der Droge, die enzymatische Aktivität der DNA-Polymerase ist schon bald nach Beendigung der Therapie wiederhergestellt^{230,231}. Demnach wäre zu erwarten, dass, selbst wenn Suramin neben der Zellbindung z.B. noch die Aktivität der Polymerase negativ beeinflusst, diese Wirkung von der Präinkubation der Zellen bis zum Einsetzen der viralen Replikation längst hinfällig wäre, zumal allein die vollständige produktive Internalisierung *in vitro* bei DHBV im Gegensatz zu vielen anderen Viren, wie Influenzaviren, adenoassoziierten Viren und Semliki-Forest-Viren^{232,233,234} kein Prozess von Sekunden oder wenigen Minuten ist, sondern sehr langsam abläuft und auch nach 24 h noch nicht abgeschlossen ist^{194,159}.

Der Frage zum eigentlichen Target von Suramin, ob zellulärer Interaktionspartner oder Virus, könnte mit einer Präinkubation von Zellen bzw. einer Vorbehandlung des Inokulums mit Suramin nachgegangen werden. Es wäre allerdings darauf zu achten, dass das virushaltige Serum im Vorfeld verdünnt wird bzw. Serumbestandteile in einem Dialyseschritt abgereichert werden, da diese vermutlich hemmend auf die Substanz wirken und das Ergebnis verfälschen könnten.

Auf die zu Beginn gestellte Frage, ob Suramin auch noch auf bereits gebundenes Virus wirkt, gab der dann folgende Ansatz eine Antwort: Etwa zwei Drittel (65%) der produktiven Viren konnten noch durch eine direkte Nachbehandlung der Zellen mit Suramin daran gehindert werden, eine Infektion zu setzen (Abbildung 2-15 B, Ansatz c1). Diese inhibitorische Wirkung nahm mit der Zeit sukzessive ab (Ansatz c1-c3). Demnach kann das Harnstoffderivat die Infektiosität von DHBV maßgeblich beeinträchtigen, indem es bereits zellassozierte Viren an einer Infektion hindert.

Die Frage, die sich aus diesem Resultat wiederum ergab war, welchen Charakter die inhibierte Zellossoziation hatte, d.h. waren die Viren noch an die Oberfläche der Zellen gebunden oder bereits internalisiert worden? Um dies zu beantworten wurden gerade infizierte Zellen einer kurzen Säurebehandlung (Glycinpuffer, pH 2,2) unterzogen, wodurch oberflächengebundene, noch nicht aufgenommene Partikel inaktiviert und durch Waschen entfernt wurden. Infizierte und mit Glycin behandelte Zellen (Abbildung 2-15 C, Ansatz b*) gaben demnach nur

Infektionsereignisse wieder, die durch bereits aufgenommene Viren verursacht worden waren. Noch etwa 80 % der Viren zeigten sich sensitiv gegenüber der pH-Senkung, d.h. dass nach 3 h unter den gewählten Bedingungen generell erst 20 % der produktiven Viren internalisiert worden sind. Die Viren erreichten so einen pH-resistenten Zustand. Unter diesen Voraussetzungen hatte eine zusätzliche Suraminbehandlung keinerlei Wirkung mehr (Abbildung 2-15 C, Ansatz c1*-c3*), ganz gleich, ob direkt nach Infektion oder bis zu 3 Tage p.Inf. verabreicht (zu den späten Zeitpunkten kann sowohl von aktiver Replikation, als auch von einer abgeschlossenen ersten Runde der Infektion ausgegangen werden). Unter Berücksichtigung dieser Resultate konnte es sich im Ergebnis der Ansätze c1-c3 in Abbildung 2-15 B wiederum nur um oberflächengebundene, noch nicht aufgenommene Viren handeln, die Suramin direkt nach Beendigung der Inokulation noch erreichen konnte.

Die hier angewandte Methode ermöglichte es, die Wirkung von Suramin zeitlich differenziert zu betrachten und das Ergebnis legt nahe, dass Suramin einen produktiven Schritt beeinflusst, der im Infektionszyklus zeitlich *vor* der Internalisierung der Viren einzuordnen ist oder aber dieselbe betrifft. Die zu Beginn gestellte Frage, ob auch die hemmde Wirkung von Suramin selbst Ursache für die in 2.4.1 beobachtete abortive Zellbindung sein kann, ist somit zu bejahen.

Dass das Harnstoffderivat bereits gebundene Viren an der Interaktion mit einem Binfaktor hindern kann, argumentiert in die Richtung, dass es sich bei der durch Suramin adressierten Virus-Zell-Interaktion um eine niedrig affine und reversible Bindung handeln muss. Bei direkter Gabe von Suramin nach Infektion, waren 35 % der Viren noch in der Lage gewesen, eine produktive Infektion zu setzen (Abbildung 2-15 B, Ansatz c1). Bezieht man das Ergebnis der Glycinbehandlung ein (Abbildung 2-15 C, Ansatz b*), muss auch hier davon ausgegangen werden, dass 20 % der Viren bereits internalisiert waren. Für den restlichen Anteil von 15 % bedeutet das, dass die Partikel oberflächengebunden, aber noch nicht aufgenommen waren. Wahrscheinlich befand sich dieser Anteil der Viren in einem Suramin-resistenten Zustand und konnte so nachfolgend noch produktiv werden. Dieser Zustand könnte z.B. die stabile und nicht-reversible Bindung an duCPD widerspiegeln, die mit Suramin nicht kompetierbar ist¹⁷⁷. Allerdings ist auch in Betracht zu ziehen, dass in Studie B (Abbildung 2-15) nur 120 µg Suramin/ml eingesetzt wurden. Möglicherweise wäre mit einer höheren Konzentration (200 µg/ml) ein Ergebnis erzielt worden, welches nur noch die Menge der bereits internalisierten Viren wiedergibt (20 %).

Im Vergleich zu den hier präsentierten *In vitro*-Ergebnissen zur Kinetik der Suraminwirkung zeigen *In vivo*-Studien, dass Suramin nur effizient und vollständig eine DHBV-Infektion inhibieren kann, wenn es den Enten *vor* der Infektion verabreicht wird. Sowohl Replikation als auch Genexpression zeigen sich bei zeitgleicher oder späterer Gabe nicht mehr betroffen¹⁶². Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise damit erklären, dass Suramin *in vivo* fast vollständig (99,7 %) an Plasmaproteine assoziiert vorliegt, was wiederum die Pharmakokinetik des Harnstoffderivats maßgeblich beeinflussen kann. Beispielsweise könnte seine biologische Verfügbarkeit deutlich reduziert oder verzögert sein²³⁵. Die Tatsache, dass die notwendige Suramin-Dosis *in vivo* um ein Vielfaches höher liegt, als in *In vitro*-Experimenten, unterstreicht diese Theorie.

Welcher Schritt im Infektionszyklus wird von Suramin adressiert?

Geht man von einer spezifischen antiviralen Wirkung von Suramin im Infektionsweg von DHBV aus, bleibt offen, welchen Faktor das Polyanion bindet und so für DHBV unzugänglich macht. Chemisch gesehen ist Suramin ein polysulfoniertes Naphtylamin-Harnstoffderivat. Dem Wirkmechanismus könnte demnach die hohe negative Ladungsdichte der Sulfonsäure zugrunde liegen. Die initiale Zellbindung von HBV ist durch sulfonierte und sulfatierte Polymere inhibierbar und eine Interaktion des Virus mit zellulären hochsulfatierten Glykosaminoglykanen aus der Gruppe der Heparansulfat-Proteoglykane ist essentiell für eine produktive Infektion^{161,236,237}. Als Komponenten der extrazellulären Matrix dienen Proteoglykane zahlreichen Pathogenen, wie einigen Protozoen (z.B. *Plasmodium falciparum*)²³⁸, Bakterien (z.B. *Chlamydia trachomatis*)²³⁹ und auch Viren (z.B. HSV)^{240,241} als Binfaktoren auf der Wirtszelle. Beispielsweise kann neben der Beobachtung, dass Heparin ein potenter Inhibitor der viralen RNaseH ist, die Initialbindung von HIV an CD4-positive Zellen durch sulfatierte Polysaccharide bzw. durch den enzymatischen Abbau von Heparansulfat auf der Zelle verhindert werden, was die Notwendigkeit zellassoziierter Heparansulfat-Proteoglykane auch für den Infektionsprozess von HIV widerspiegelt^{242,243,244,245,246}. Im Gegensatz dazu, dass die Inhibierbarkeit der HBV-Infektion eindeutig vom Sulfatierungsgrad des inhibierenden Polysaccharids abhängig ist, lässt sich die DHBV-Infektion weder durch Chondroitinsulfate, noch durch hochsulfatierte Polyanionen wie Dextransulfat oder Heparin hemmen. Es wurden Konzentrationen bis zu 500 µg/ml getestet - Mengen, die die HBV-Infektion bereits vollständig verhindern. Der ebenfalls ausbleibende Effekt durch Substanzen, die zelluläre Strukturen adressieren, wie die

Heparansulfat-spezifischen Lyase Heparinase I, oder der polykationische Heparin-Antagonist Poly-L-Lysin, bestärken die Beobachtungen^{eigene unpublizierte Daten,²⁴⁷}. Die Tatsache, dass PEG den Glykosaminoglykan-vermittelten Kontakt von HBV mit der Zelle maßgeblich fördert¹⁶¹, die DHBV-Infektion einen PEG-Zusatz aber gar nicht erst benötigt, stützt zusätzlich die Schlussfolgerung, dass sulfatierte Makromoleküle bei der Zellbindung und Aufnahme von DHBV keine Rolle spielen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit und trotz der analogen negativen Ladung ist der Wirkungsmechanismus von Suramin ein anderer als der von polysulfonierten Glykosaminoglykanen. Dass Suramin mit einer Vielzahl von Enzymen und Proteinen, wie z.B. Wachstumsfaktoren, interagiert und diese hemmen kann, wurde mehrfach beobachtet. Beispielsweise bindet das Harnstoffderivat Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) im katalytischen Zentrum und hemmt diese kompetitiv und reversibel²⁴⁸. Verantwortlich für die hochaffine Bindung sind neben der Molekülstruktur von Suramin dessen Aryl-Sulfonat-Motive. Prinzipiell wäre es daher auch denkbar, dass DHBV vor der Interaktion mit duCPD eben nicht wie HBV mit einem Kohlenhydrat interagiert, sondern mit einem weiteren Protein, welches durch Suramin adressiert und blockiert werden kann.

Nachfolgend sind noch einmal die wichtigsten Ergebnisse/ Schlussfolgerungen zur inhibitorischen Wirkung von Suramin aufgelistet:

1. Suramin inhibiert die DHBV-Infektion vollständig, die Zellassoziation nur maximal zu 80 % (reduziert sie auf 20 %) → Die residuale Zellassoziation ist abortiv. Offen bleibt, ob das Virus oberflächengebunden an irgendeinen unspezifischen Faktor verbleibt, der nichts mit dem authentischen *entry pathway* zu tun hat, oder ob es in PDHs oder über einen alternativen *pathway* internalisiert und dann degradiert wird (= Sackgasse).
2. Suramin wirkt unmittelbar und kurzanhaltend: Die maximale Wirkung wird nur in Gegenwart von Virus erreicht, nicht aber bei Präinkubation von Zellen. Bei einer Postinkubation infizierter Zellen tritt ein schneller Wirkungsverlust ein. → Suramin wirkt eher am Virus, als an der Zelle.
3. Suramin kann kurzfristig noch bereits zellassoziierte Viren daran hindern (Nachbehandlung infizierter Zellen) eine produktive Infektion zu setzen. Die Wirkung von Suramin selbst kommt somit auch als Ursache für die abortive Zellbindung in Frage (siehe 1.). Internalisierte (duCPD-assoziierte) Viruspartikel sind in einem

Suramin-resistenten Zustand und der inhibitorischen Wirkung nicht mehr ausgesetzt (Glycin-Behandlung).

→ Schlussfolgerung: Suramin wirkt unmittelbar und kurzanhaltend inhibierend. Es blockiert in erster Linie die primäre Bindung (= *attachment*), wobei die Hauptwirkung am Wahrscheinlichsten am Virus stattfindet.

3.2.2 Die SIR findet erst nach Aufnahme des superinfizierenden Virus in die Zelle statt

Mittels der etablierten qPCR-Methode und mit Suramin als einer geeigneten internen Messkontrolle war der Einfluss der L-Expression auf die Zellassoziation von DHBV quantitativ untersucht worden (2.4.3). Während die Infizierbarkeit bzw. Superinfizierbarkeit der Zellen mit einem SIA-Faktor_{Ad-DuL_Norm} von etwa 0,03 wie erwartet niedrig ausfiel, zeigte sich für die Virusbindung an Zellen keinerlei Abweichung zur Kontrolle (Abbildung 2-16, Bindung an untransduzierte PDHs für 3 h bei 37 °C). Die Hepatozyten, die 2 Tage zuvor mit Adenoviren transduziert worden waren und effizient L bildeten (35 % Transduktionseffizienz), waren in keiner Weise beeinträchtigt, Viren zu binden. Während weniger als 1 % der Partikel im Inokulum in Anwesenheit von Suramin zellgebunden waren, assoziierten 6 % der Viren an untransduzierte und 8 % an Ad-DuL-transduzierte Zellen. Auf molekularer Ebene bedeutet dies, dass die Zellen trotz der Synthese von L nach wie vor die entsprechenden Bindefaktoren zur Verfügung stellten. Eine produktive Infektion der Zellen schlossen sie aber aufgrund der L-Expression effektiv aus.

Das Ergebnis demonstrierte, dass die L-vermittelte Blockade der DHBV-Infektion zu einem späteren Zeitpunkt als der Zellbindung im Infektionszyklus, nämlich nach Internalisierung der Partikel stattfinden muss. Versuche mit Rhodamin-markierten Partikeln hatten zwar bereits Hinweise darauf geben können, dass virale Partikel ebenso erfolgreich an uninfizierte wie an infizierte Hepatozyten zu binden scheinen¹⁸⁰. Erst allerdings mittels der hier angewandten qPCR-Methode kann die Frage nach dem Einfluss von L auf die frühe Zellassoziation quantitativ beantwortet und eindeutig verneint werden.

Zusammengefasst zeigte sich, dass die L-Expression keine veränderte bzw. beeinträchtigte initiale Interaktion von DHBV mit seiner Wirtszelle zur Folge hat. Die Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Stelle, an der die Blockade einer SI manifest wird, nicht an der Zelloberfläche liegt bzw. nicht auf Ebene der Rezeptorbindung stattfindet. Aufgrund der Tatsache, dass duCPD hauptsächlich intrazellulär, nämlich im TGN, und eben nicht auf der

Zelle lokalisiert ist, stellt sich die Frage, ob sich eine, wenn auch signifikante Verringerung der Anzahl des Rezeptors auf der Zelloberfläche durch Herabregulierung merklich abgezeichnet hätte und dieser Effekt mittels der hier verwendeten PCR-Technik messbar gewesen wäre? Ein Einfluss von L auf einen anderen Binfaktor, der zahlreich auf der Zelloberfläche vertreten ist und der Anreicherung von Partikeln auf der Zelle dient, bevor diese zur hochaffinen Komplexbildung mit duCPD übergehen, kann an dieser Stelle aber ausgeschlossen werden.

3.3 Mutationsanalyse zur Identifizierung von SIR-Determinanten in L

Nachdem die L-vermittelte SIR bei DHBV quantitativ evaluiert worden war, waren im Rahmen einer Mutationsanalyse i) die Subdomänen pre-S und S sowie ii) definierte Determinanten innerhalb von pre-S adressiert worden. In einer SIA-Analyse im Anschluss wurde ihre potentielle Rolle im SIR-Mechanismus untersucht. Die unter 2.3.1 etablierte Quantifizierungsmethode bot auch hier ein ideales *tool*, indem sie, wie schon unter 3.1 dargelegt, 1) einen quantitativen Vergleich der unterschiedlichen SIA-Phänotypen erlaubte, die zudem an Zellen aus unterschiedlichen Leberzellpräparationen ermittelt worden waren und 2) die Signifikanz der entsprechenden Phänotypen aufzeigen konnte.

Während der SIA-Phänotyp von S (DuS) isoliert betrachtet wurde, war die pre-S-Domäne in Form einer DHBV/HBV L-Chimäre (Dupre-S) studiert worden. Zusammen mit einer analogen Untersuchung, bei der Zellen das L-Protein des nahverwandten HBV vom Graureiher (HHBV) exprimierten, erlaubte die Chimäre Rückschlüsse zur Speziespezifität der SIR. Ob Sequenzbereiche in pre-S, die an L die Funktionen der Rezeptor- oder Kapsidbindung vermitteln, sowie Modifizierungsstellen in pre-S (Phosphorylierungs-, Myristoylierungs- und Proteaseschnittstelle) quantitativ einen Beitrag zur SIR leisten, war durch Setzen von Punktmutationen und das Einführen von Deletionen untersucht worden.

3.3.1 Die SIR funktioniert speziesspezifisch und kann weder von DHBV S noch von pre-S alleine vermittelt werden

Das große Hüllprotein von DHBV besteht aus den beiden Subdomänen S und pre-S, wobei die C-terminale S-Domäne von L koterminale identisch mit dem kleinen Hüllprotein (SDHBsAg) ist. Zwar konnte die SIR-Kompetenz von Zellen bereits eindeutig der Expression von L zugeordnet werden (2.3.2), ob diese Funktion aber nur von einer der Subdomänen übernommen wird und falls ja, von welcher, galt es noch zu klären. Wie sich im ersten Ansatz zeigte (2.5.1, Abbildung 2-17) waren PDHs, welche nur das S-Protein exprimierten, nicht in der Lage, eine SI auszuschließen, der SIA-Phänotyp Ad-DuS-transduzierter Zellen wich nicht vom Phänotyp der Kontrolle ab (mittlere SIA-Faktoren: 1,35 (Ad-DuS) und 1,51 (Ad-GFP)). Indirekt argumentierte dieses Ergebnis für eine SIR-vermittelnde Determinante in pre-S.

Diese potentiell hinreichende Rolle von pre-S wurde in einem zweiten Ansatz an einer L-Chimäre überprüft, bei der die DHBV S-Domäne durch die analoge Domäne von HBV ersetzt worden war (Abbildung 2-28). Interessanterweise ergab sich für den SIA-Phänotyp_{Ad-Dupre-}

S/*HuS* ein ganz ähnliches Bild (2.5.2.6), ein SIA-Faktor_{Norm} von 0,93 spiegelte wider, dass auch die Expression von pre-S alleine, d.h. im Kontext der Chimäre, nicht in der Lage war, eine SI der Hepatozyten zu verhindern.

Die L-Chimäre erlaubte es des Weiteren, der Frage nachzugehen, ob möglicherweise eine erfolgreiche Translokation von pre-S eine Voraussetzung für die Funktion von L ist, eine Zweitinfektion auszuschließen. Die Analyse der intrazellulären Transmembrantopologie von *L*_{wt} und der Chimäre (Proteaseschutzexperiment in 2.5.2.6) ergab, dass beim Wildtyp mehr als ein Drittel von pre-S bereits über die Membran transloziert worden war und die luminaire pre-S-Konformation erreicht hatte, während die Translokation von pre-S in der Chimäre fast vollständig ausgeblieben war und der pre-S-Teil primär in der i-pre-S-Konformation vorlag (Abbildung 2-29). Zum einen lässt sich daraus ableiten, dass TM2 in der HBV S-Domäne, welche maßgeblich den Translokationsprozess von HBV L steuert^{249,84}, offenbar nur zusammen mit der entsprechenden HBV pre-S Domäne funktioniert. Die Translokation der DHBV pre-S-Region konnte das Transmembransegment nicht übernehmen, Grund mag die fehlende Sequenzübereinstimmung der pre-S-Regionen beider Hepadnaviren sein¹⁰⁹. Im Gegensatz zu HBV ist bei DHBV die Translokation von pre-S abhängig von der Koexpression des kleinen Hüllproteins¹⁰⁷. Da das Konstrukt Ad-Dupre-S/*HuS* die Expression von HBV S durch interne Initiation prinzipiell erlaubte, konnte, auch wenn aus technischen Gründen in dieser Arbeit kein separater S-Nachweis erfolgte, davon ausgegangen werden, dass neben der L-Chimäre auch SHBsAg gebildet wurde. Aus dem Proteaseschutzversuch lässt sich demnach alternativ schlussfolgern, dass das S-Protein von HBV nicht in der Lage ist, die Funktion von SDHBsAg bei der pre-S-Translokation effizient zu übernehmen. Da die Translokation anscheinend aber nicht vollständig ausgeblieben war, wäre es wiederum auch möglich, dass HBV S prinzipiell die Funktion von DHBV S kompensieren könnte, allerdings müssten Einbußen in der Qualität mit Quantität wettgemacht werden. Die für die Translokation von pre-S wichtigen strukturellen Determinanten in TM1 von DHBV S (K24, E27 und Leucin-Zipper-ähnliches Motiv) sind zwar in HBV S konserviert, ausreichend sind sie demnach aber nicht¹⁰⁸.

Diese Erkenntnisse sprechen für ein Zusammenspiel der beiden Subdomänen im pre-S-Translokationsprozess bei Hepadnaviren. Die beiden Virustypen haben aber offensichtlich, darauf weisen schon andere Studien hin, ganz unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um die für die Rezeptorbindung relevante Domäne von L über die Membran zu translozieren^{249,84,108,98}. Die Tatsache, dass Hüllproteine von HBV zusammen mit

Hüllproteinen des nahverwandten Woodchuck HBV (WHV) in SVPs und Virionen eingebaut werden können, dieses Mischen aber nicht mit Hüllproteinen vom entfernter verwandten Entenvirus funktioniert¹⁰⁹, verdeutlicht die Notwendigkeit einer speziesspezifischen (mindestens bezogen auf Ortho- und Avihepadnaviren) Interaktion der Subdomänen beim *assembly* und unterstreicht die Beobachtungen an der translokationsdefizienten L-Chimäre.

Hinsichtlich des Verlusts der SIR-Kompetenz von Dupre-S/HuS sind verschiedene Interpretationsansätze möglich:

1) Die Tatsache, dass die DHBV/HBV L-Chimäre weder in der Lage war, eine SIR, noch die Translokation von pre-S erfolgreich zu vermitteln, wies zunächst darauf hin, dass eine effiziente SIR pre-S auf luminaler Seite bedarf. Dies wiederum würde für eine eher indirekte Rolle von pre-S im zugrunde liegenden SIR-Mechanismus sprechen. Transaktivierende Eigenschaften von phosphoryliertem und zytosolisch exponiertem pre-S sind von Rothmann und Kollegen beschrieben worden⁹⁶. Vorstellbar wäre, dass i-pre-S hemmend auf die Expression oder die Aktivierung eines SIR-Faktors wirkt und erst die Translokation von pre-S über die Membran zur Aufhebung dieser Hemmung führt. Gegen einen solchen indirekten und langwierigen Mechanismus über Signaltransduktionskaskaden sprechen allerdings die Beobachtungen, dass i) die kinetische Analyse aus 2.3.3 eindeutig ausweist, dass der L-vermittelte Effekt ein schneller und direkter Effekt sein muss und ii) L-Mutanten mit ausbleibender Phosphorylierung in PDHs trotzdem den SIA-Phänotyp von L_{wt} vermitteln (2.5.2.1). Um weiterführend zu untersuchen, ob tatsächlich kein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Phänomenen pre-S-Translokation und SIR besteht, wäre es interessant, mit der von Lambert²⁴⁹ beschriebenen Methode zu testen, ob eine Kotransduktion von Hepatozyten mit Ad-Dupre-S/HuS und Ad-DuS sowohl einen positiven Effekt auf die pre-S-Translokation als auch auf den Erfolg einer SIR hätte. Um einen Beitrag von S, welches durch interne Initiation der Translation entstehen kann, vollständig auszuschließen, könnte ein L-Konstrukt ohne das S-Startcodon (DuL_s-) verwendet werden. Da die Messung (k)eines Zusammenhangs beider Ereignisse anhand einer Dosis-/Wirkungsbeziehung noch evident wäre, könnte nach der Expression von DuL_s- in Hepatozyten Ad-DuS zutitriert werden.

2) Der SIR-Mechanismus könnte auch auf einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis von i-pre-S- und e-pre-S-Konformation beruhen, welches im Fall von Ad-Dupre-S/HuS-transduzierten Zellen ungünstiger Weise (hinsichtlich der SIR-Effizienz) auf Seiten zytosolisch orientierter Moleküle lag. Eine bestimmte Stöchiometrie als Voraussetzung

könnte wiederum sterische Gründe haben. Mutationen, die eine kotranslationale Translokation von pre-S herbeiführen^{93,107} müssten sich demnach erwartungsgemäß ebenfalls negativ auf die SIR auswirken. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich z.B. Mutationen in der Bindestelle für Hsc70^{250,251}, einem Faktor mit entscheidender Rolle bei der zytoplasmatischen Retention von pre-S, auf den SIA-Phänotyp von L_{wt} auswirken würden.

3) Für die SIR könnte auch eine direkte Interaktion von DHBV pre-S und S notwendig sein, ein sogenannter „*crossstalk*“ beider Domänen. Für den pre-S-Translokationsmechanismus wurde ein solcher Kontakt von pre-S und S bereits postuliert²⁴⁹. Der Phänotyp der L-Chimäre könnte so interpretiert werden, dass HBV S eben diesen Kontakt nicht komplementieren kann. Eine Interaktion der Domänen wäre somit für beide Ereignisse (Translokation und SIR) notwendig, beide Phänomene würden aber prinzipiell unabhängig voneinander stehen. Im Zusammenhang mit den Kapsid-bindedefizienten L-Mutanten werden die hier aufgestellten Hypothesen noch einmal aufgegriffen und weiter diskutiert (siehe 3.3.5).

Dass ein hohes Maß an Sequenzhomologie in der S-Domäne alleine nicht ausreicht, um die Funktion von DHBV L in der SIR übernehmen zu können, offenbarte auch die SIA-Analyse am L-Protein des nahverwandten HHBV. Dass Ad-HHBV_L ebenso wenig wie SDHBsAg und die DHBV/HBV L-Chimäre in der Lage war, eine SI zu verhindern, argumentiert für einen speziesspezifischen SIR-Effekt. Wie unter 2.5.2.7 bereits ausgeführt, teilen die beiden Avihepadnaviren beim Eintritt in die Zelle verschiedene Schritte, die über ihre pre-S-Regionen vermittelt werden, wie z.B. die Interaktion mit duCPD und einem noch nicht identifizierten Korezeptor. Diesen Gemeinsamkeiten liegen dabei aber sehr wahrscheinlich weniger Ähnlichkeiten in der Sequenz des viralen Liganden zugrunde, die pre-S-Sequenzen variieren um 50 %, sondern eher Analogien in der Ausbildung definierter dreidimensionaler Strukturen bei der Rezeptorinteraktion¹⁷⁵. Schritte im Infektionszyklus bei denen die Viren divergieren (z.B. wirtsspezifische Eintrittsmechanismen) erfordern im Gegensatz dazu vermutlich die exakte Abfolge in der Primärsequenz von pre-S. Der Grund für die fehlende SIR-Kompetenz HHBV_L-exprimierender Zellen könnte somit ebenfalls in der fehlenden Sequenzhomologie entsprechender Abschnitte liegen. Unter 3.3.5 wird dieser Aspekt noch einmal aufgegriffen.

Zusammengefasst deuteten die Beobachtungen bis zu diesem Punkt auf i) einen speziesspezifischen SIR-Effekt und ii) ein Zusammenspiel der beiden Subdomänen beim zugrunde liegenden SIR-Mechanismus hin. Dass die alleinige Expression von L, nicht aber

die von S, den Infektionsausschluss vermitteln kann, spricht aber zum anderen iii) für eine essentielle Rolle einer Determinante in pre-S. Diese galt es zu identifizieren.

3.3.2 Die duCPD/pre-S-Interaktion spielt für den SIR-Mechanismus keine Rolle

Breiner *et al.* konnten zeigen, dass sowohl in DHBV-infizierten Entenlebern, als auch in kultivierten und infizierten PDHs die Menge der DHBV-Rezeptorkomponente duCPD deutlich reduziert ist. Diese L-Protein-vermittelte Herabregulierung des DHBV-Rezeptors geschieht im Laufe einer Infektion, wobei das dort vorgestellte Modell von einer frühen Interaktion von Rezeptor (duCPD) und viralem Ligand (pre-S) im Biosyntheseweg des Rezeptormoleküls ausgeht und final der Abbau des Rezeptors steht¹⁷⁹. Prinzipiell wäre die Herabregulierung des eigenen Rezeptors, analog zur Situation bei HIV und anderen Viren, auch ein denkbarer SIR-Mechanismus für DHBV. In ersten Studien durch Walters *et al.* zeigte sich interessanterweise, dass L auch noch mit einer 27 aa-Deletion in seiner duCPD-Binderegion (L_{Δ83-109}) in der Lage war, eine Zweitinfektion effizient auszuschließen.

Im Rahmen der hiesigen Arbeit wurde die potentielle Beteiligung der duCPD-Binderegion in der SIR reevaluiert. Anhand von L-Mutanten mit Deletionen kürzerer Aminosäurebereiche und sogar Punktmutationen wurde dies studiert und quantitativ bewertet. Die Quantifizierungsmethode machte auch an dieser Stelle einen differenzierten Vergleich möglich, nämlich den der unterschiedlichen potentiellen Beteiligung der beiden Subdomänen der duCPD-Binderegion in pre-S.

Es zeigte sich (2.5.2.3), dass in transduzierten Zellen weder Mutationen im stabilisierenden, noch im essentiellen Bereich der Bindedomäne zu einer signifikant gesteigerten Akzeptanz für eine SI führten. Für die Mutante DuL_{Δ85-96} ließ sich reproduzierbar kein vom Wildtyp divergierender SIA-Phänotyp detektieren. Nachweislich führt die Mutation aber zu einem absoluten Verlust der duCPD-Bindefähigkeit von pre-S¹⁷⁸. Da bezüglich der Rezeptor-Bindekompetenz für die Mutante DuL_{R102P} dasselbe gilt und die Mutation im viralen Kontext außerdem in einem vollständigen Verlust der Infektiosität resultiert, ist an dieser Stelle davon auszugehen, dass die leicht variierenden Ergebnisse zum SIA-Phänotyp dieser Mutante (Ente_1 vs. Ente_2) auf Variationen im Detektionssystem zurückzuführen sind (Abbildung 2-24). Ob dasselbe auch für DuL_{Δ101-109} und DuL_{Δ110-117} gilt, oder aber eine Überlappung mit dem Sequenzbereich, der die Interaktion mit dem viralen Kapsid vermittelt, vorliegt (siehe pre-S-Schema in Abbildung 1-7) und daher eine positive Abweichung im SIA-Phänotyp resultiert, wird unter 3.3.5 wieder aufgegriffen.

Die Beobachtung, dass rekombinantes DHBV pre-S Peptid mit einer Deletion der Reste 52-61 (pre-SΔ52-61) in Infektionskompetitionsstudien keine inhibitorische Eigenschaften mehr hat und außerdem seine Fähigkeit, duCPD zu binden, deutlich beeinträchtigt ist, unterstreicht die entscheidende Funktion dieses Sequenzabschnitts im Infektionsprozess^{175,171}. In der hiesigen SIA-Analyse war der SIA-Phänotyp, der eben diese Region adressiert hatte (DuL_{Δ51-58}), mit einem SIA-Faktor_{Norm} von 0,25 tendenziell auffällig (Abbildung 2-23). Die Tatsache, dass Deletionen in den direkt angrenzenden N- bzw. C-terminalen Bereichen keinerlei Einfluss zeigten (normierte SIA-Faktoren: DuL₄₃₋₅₀ = 0,07, DuL₅₉₋₆₆ = 0,03) und dass sich im Gesamtbild der Analysen generell kein Verlust der SIR bei Zellen abzeichnete, die L-Mutanten mit Mutationen im essentiellen duCPD-Bindebereich exprimierten, führt allerdings zu der begründeten Annahme, dass die beobachtete positive Abweichung im Bereich der möglichen Schwankungen der Quantifizierungsmethode liegt.

Der Verlust der duCPD-Bindefähigkeit von pre-S geht schlussendlich damit einher, dass entsprechendes L_{mut} nicht mehr in der Lage ist, die Herabregulierung des Rezeptors zu vermitteln. Da diese Mutanten aber ausnahmslos ihre Fähigkeit behielten, effektiv eine SI auszuschließen, bestätigen die Daten indirekt einen Mechanismus, der bei DHBV unabhängig von einer Herabregulierung des Rezeptors funktioniert. Diese Verzichtbarkeit der duCPD/pre-S-Interaktion für den SIR-Mechanismus, die im Kontrast zur unerlässlichen Interaktion im Infektionsprozess steht, wurde hier erstmals quantitativ erfasst.

Die spezifische Interaktion eines Virus mit einem Zelloberflächen-Rezeptor muss zum einen den viralen Eintritt in die Wirtszelle vermitteln, zum anderen darf in späteren Schritten des Replikationszyklus aber keine Interferenz mit der Produktion von Nachkommenviren auftreten. Vielleicht zeigt sich hier eine Analogie zur retroviralen Infektion: Die Interaktion von HIV mit dem zellulären Rezeptor CD4 auf der Wirtszelle induziert über Konformationsänderungen im viralen Hüllprotein Env die Fusion viraler und zellulärer Membranen und somit den Viruseintritt in die Zelle (für Übersichtsartikel siehe Ref.²⁵²). In späteren Stadien des Infektionszyklus allerdings ist die virusinduzierte Rezeptorunterregulierung eine charakteristische Eigenschaft HIV-infizierter Zellen²⁵³, was unter anderem essentiell wichtig für die Bildung infektiöser Partikel und deren Freisetzung ist^{254,255,256,257}. Dies weist die Rezeptorunterregulierung als einen kritischen Schritt für die virale Replikation aus, obwohl ihre postulierte Rolle in der SIR akut HIV-infizierter Zellen experimentell noch nicht endgültig gesichert ist²⁰⁷. Vorstellbar wäre, dass die Herabregulierung von duCPD im Zuge einer DHBV-Infektion primär den essentiellen Zweck

erfüllt, das Aufeinandertreffen von Virus und Rezeptor im TGN auszuschließen und den Verlust von Viruspartikeln zu minimieren. Bekräftigt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass der Ausschluss einer SI und die Abnahme der Rezeptormenge in infizierten Zellen zeitlich nicht korrelieren, die duCPD-Menge ist erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt reduziert^{180,eigene unpublizierte Daten}.

3.3.3 L muss weder myristoyliert oder phosphoryliert, noch proteolytisch geschnitten werden, um eine SIR zu vermitteln

DHBV L wird zwar nicht, wie es für das humane Hepadnavirus der Fall ist, glykosyliert, jedoch myristoyliert und phosphoryliert. Die kovalente Assoziation der Myristinsäure an Gly2 ist dabei zwar nicht für die Neusynthese von Viren, aber für die Infektiosität von essentieller Bedeutung (siehe 2.5.2.1). Obwohl aufgrund des Lipidcharakters eine Interaktion des myristoylierten pre-S-Teils mit zellulären Membranen während des Zelleintritts des Virus naheliegt, ist der molekulare Ablauf des Fusionsprozesses im Detail nicht aufgeklärt. Allerdings wird die kompetitive Fähigkeit von synthetischen pre-S-Peptiden, eine Infektion zu inhibieren, drastisch gesteigert, wenn ihr N-Terminus myristoyliert ist. Dies und das Auftreten eines N-terminalen Degradationsprodukts (P28) von L in infizierten Entenlebern (siehe 2.5.2.2), das auf einen proteolytischen Schnitt nach Aufnahme des Virus möglicherweise zwischen R71 und R72 hinweist, boten die Grundlage für die Untersuchungen in den Abschnitten 2.5.2.1 und 2.5.2.2. Ein Austausch (Ad-DuL_{RR71,72AA}) bzw. eine Deletion (Ad-DuL_{ARR71,72}) der putativen Schnittstelle zum einen, das Verhindern der N-terminalen Myristoylierung zum anderen, sollten Aufschluss zur Hypothese geben, ob die Freisetzung eines myristoylierten pre-S-Peptids für den SIR-Mechanismus von Bedeutung ist. Die mögliche Aktivierung eines solchen Peptids durch proteolytischen Verdau wäre ein Mechanismus, der sehr schnell nach der Primärinfektion etabliert wäre, eine weitere Infektion der Zelle wäre sogar noch vor der Genexpression des zuerst infizierenden Virus blockiert. Die Ergebnisse zur SIR-Kinetik (2.3.3), die bereits unter 3.1 diskutiert wurden, fänden hier Bestätigung. Die eingeführten Mutationen hatten dabei keinen Einfluss auf die duCPD-Bindfähigkeit der jeweiligen L-Proteine.

Die aus der SIA-Analyse gewonnenen Erkenntnisse ergaben ein eindeutiges Bild (Abbildung 2-19 und Abbildung 2-21): Mittlere SIA-Faktoren_{Norm} von höchstens 0,1 (Ad-DuL_{Myr(-)} und Ad-DuL_{RR71,72AA}) sprachen hier für sich. Ein SIA-Faktor_{Norm} <0,01, der aus dem Entfernen der Schnittstelle resultierte (Ad-DuL_{ARR71,72}) entkräftete eine mögliche Rolle der

Schnittstelle vollständig. Demnach spielt weder die N-terminale Modifizierung, noch das Vorhandensein einer intakten Schnittstelle, beides essentielle Parameter für die Infektiosität des Virus, bei der SIR eine Rolle. Die Hypothese des freigesetzten Peptids, welches auf sekundär in die Zelle gelangtes Virus evtl. in intrazellulären Vesikeln trifft und so eine produktive Zweitinfektion verhindert, wurde damit widerlegt.

Die hepadnavirale Replikationsstrategie stellt sowohl im Lebenszyklus von HBV, als auch von DHBV, ein gut ausbalanciertes System dar und ermöglicht so eine optimale Virus/Wirt-Interaktion. Voraussetzung für ein optimiertes „Zusammenspiel“ der Wirtszelle und dem persistierenden Pathogen sind regulatorische Faktoren, die die virale Genexpression dahingehend modulieren können, dass sie auf intrazelluläre Veränderungen (als Reaktion auf extrazelluläre Signale) reagierten und ein Ungleichgewicht zwischen den „Parteien“ verhindert wird. Ein Homologon zum HBxAg der Orthohepadnaviren, einem Transaktivator zellulärer und viraler Gene, ist für Avihepadnaviren nicht bekannt. Bei einer DHBV-Infektion werden zytopathische Effekte, welche durch Aktivierung des Immunsystems im Wirt entstehen können, weitestgehend schon durch den vertikalen Übertragungsweg der Infektion verhindert. Allerdings konnte durch Rothmann *et al.* eine transaktivierende Aktivität auf die Genexpression und somit regulatorische Funktion für DHBV L gezeigt werden, welche zwar keine essentielle Bedeutung für die virale Replikation, die Bildung neuer Partikel oder die Infektiosität hat aber eindeutig mit der Phosphorylierung des Proteins an Ser118 durch eine MAP-Kinase vom Typus *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK) korreliert⁹⁶. Die L-Protein-vermittelte Inhibition einer SI könnte dahingehend einen Beitrag liefern, dass durch den Ausschluss einer weiteren Infektion der Zelle ein Gleichgewicht zwischen zellulären und viralen Interessen erhalten bleiben würde. Eine regulierte Genexpression, vermittelt durch phosphoryliertes L, könnte beispielsweise die Expression des noch unbekanntes Korezeptors auf Hepatozyten betreffen, mit dem DHBV über den N-terminalen Bereich von pre-S früh im Infektionszyklus interagiert. Ob der Phosphorylierungsstatus von L für die SIR eine Rolle spielt, wurde in der Mutationsanalyse in Abschnitt 2.5.2.1 verfolgt. Das Zerstören des ERK-spezifischen Phosphorylierungsmotifs (PXSP) durch Einführung eines Alanins anstelle des Serins an Position 118 (Ad-DuL_{S118A}) hatte allerdings keine Auswirkungen auf den SIA-Phänotyp von L. Die Akzeptanz der Hepatozyten gegenüber einer SI konnte durch Expression dieser L-Mutante nicht gesteigert werden, der Phosphorylierungsstatus von L ist demnach nicht entscheidend für die Etablierung einer erfolgreichen SIR. Die Ergebnisse aus 2.3.3, nämlich, dass die Expression von L und die SIR zeitlich unmittelbar zusammenhängen,

schließt eigentlich *per se* die Involvierung langer Signaltransduktionskaskaden aus. Das Ausbleiben eines Effekts durch die Mutante DuL_{S118A} unterstreicht dies.

3.3.4 N-terminal verkürztes L ist nicht in der Lage eine effiziente SIR zu vermitteln

Im N-Terminus von pre-S sind Determinanten lokalisiert, die vor allem im frühen Infektionsprozess für DHBV von essentieller Bedeutung sind. Wie bereits dargelegt, ist rekombinantes myristoyliertes DHBV pre-S Peptid DpreS2-41^{myr} in Wettbewerbsstudien in der Lage, die DHBV-Infektion zu inhibieren und an Zellen zu binden, ohne dabei die Rezeptorbindedomäne (duCPD-Bindedomäne = aa 30-115) zu enthalten, was demonstriert, dass das Virus über diesen Bereich in duCPD-unabhängiger Weise mit der Wirtszelle interagiert¹⁸². Anhand von Ergebnissen aus Immunpräzipitationsstudien wird für den Sequenzbereich aa 12-22 postuliert, dass dieser exponiert auf der Oberfläche von Viruspartikeln liegt und beim Viruseintritt in die Zelle mit einem für den Infektionsprozess wichtigen Kofaktor interagiert¹⁷⁷. Ob der Sequenzbereich vor der Rezeptorbinderegion einen Beitrag zum Superinfektionsausschluss einer infizierten Zelle leistet, wurde in Abschnitt 2.5.2.5 untersucht. Die Analyse umfasste die Reste ab Aminosäure 3, dass die Myristoylierung an Gly2 keine Rolle spielt, wurde bereits diskutiert (siehe 3.3.3). Die Deletion der insgesamt ersten 18 Aminosäuren in pre-S hatte interessanterweise SIA-Phänotypen zur Folge, die sich durch eine signifikant gesteigerte Akzeptanz der Zellen gegenüber einer weiteren Infektion der Zelle auszeichneten und mit Deletionen Richtung C-Terminus hin sukzessive wieder abnahmen (Abbildung 2-27). Der maximal erreichte Verlust der SIR-Kompetenz wurde beim Fehlen der N-terminalen Sequenz (Δ 3-10) gemessen, im Vergleich zu L_{wt}-exprimierenden Zellen war die Akzeptanz der Zellen um das 10-fache gesteigert. Die SIR-Kompetenz der Mutante DuL Δ 19-26 war noch halb so hoch wie die des Wildtyps, allerdings wurde diese Mutante nur einmalig analysiert und das Ergebnis könnte auch nur eine Schwankung im System widerspiegeln.

Für das Freisetzen DNA-haltiger Viruspartikel aus der infizierten Zelle ist bei DHBV die Koexpression von beiden viralen Hüllproteinen, L und S, erforderlich. Wird L alleine exprimiert, wird es als Membranprotein im ER zurückgehalten. Diese Rückhaltefunktion von L im ER wird bei DHBV vom Bereich zwischen aa 9 und aa 28 in pre-S vermittelt⁹⁷. N-terminal verkürztes L-Protein wird in Form nicht-infektöser Viruspartikel schnell aus der Zelle sekretiert, wobei die gesteigerte Freisetzung von Partikeln gleichzeitig mit einem Akkumulieren von cccDNA im Zellkern einhergeht^{177,80,258,259,97}. Um diese regulatorische

Funktion von L aufrechtzuerhalten, ist eine höhere Syntheserate erforderlich. Dies wiederum könnte durch gesteigerte cccDNA- und damit auch RNA-Level kompensiert werden.

Dieses Phänomen könnte auch einen Erklärungsansatz für die Beobachtungen an PDHs bieten, die die Deletionsmutanten DuL_{Δ3-10} und DuL_{Δ11-18} exprimierten (2.5.2.5): Beide Polypeptide ließen sich zum einen im Western Blot reproduzierbar nur sehr schwach detektieren (Abbildung 2-27 B), wobei ein Verlust des Epitops als Folge der Deletionen ausgeschlossen werden kann. Der völlige oder teilweise Verlust der SIE-Kompetenz der N-terminalen Deletionsmutanten ist also am Plausibelsten auf deren niedrige intrazelluläre Konzentration, bedingt durch die schnelle Sekretion, zurückzuführen. Da eine Hochregulierung der cccDNA-Menge im verwendeten System außerdem entfiel, reichte die L-Proteinmenge evtl. nicht aus, um einen vollständigen Superinfektionsausschluss zu vermitteln. Nach der hiesigen Mutationsanalyse würde der verantwortliche Bereich auf die Reste aa 3-18 entfallen.

3.3.5 Die SIR-Determinante kolokalisiert mit der Matrixdomäne in pre-S

In einer letzten SIA-Analyse (2.5.2.4) wurde die C-terminale pre-S Region von Aminosäure 110 bis einschließlich Aminosäure 157 untersucht. Unter anderem enthält dieser Bereich die Determinante, die die Neuumhüllung von Nachkommenviren reguliert^{97,128}. In der Untersuchung zeigte sich, dass die Deletionen über den gesamten Bereich in eindrucklicher Weise zu einer signifikanten Abnahme der Fähigkeit der entsprechenden L-Proteine führten, eine Superinfektion der Zellen auszuschließen (Abbildung 2-26). Dies stellte sich wie folgt dar: Ausgehend von einer Deletion der Reste aa 110 bis aa 125, zeichnete sich eine sukzessiv ansteigende Akzeptanz der Hepatozyten gegenüber einer Zweitinfektion ab und resultierte bei der Mutante DuL_{Δ126-133} sogar in einem vollständigen SIR-Verlust der transduzierten Zellen (Abbildung 2-26 C, Ente_1, SIA-Faktor_{Norm} DuL_{Δ126-133}= 1,07). Allein dieses Teilergebnis steht dabei in großem Gegensatz zu den Resultaten aller vorangehenden SIA-Analysen. Mit weiteren 8-aa-Deletionen in 3'-Richtung nahm die SIA der Zellen dann schrittweise wieder ab, die am Weitesten C-terminal eingeführte Deletion vermittelte aber immer noch eine halbmaximale Akzeptanz (Abbildung 2-26 D, SIA-Faktor_{Norm} DuL_{Δ150-157}=0,45).

Diesen Resultaten zufolge ist die SIR-Determinante in einem 32 aa-langen Bereich von pre-S, einschließlich der Reste aa 118 bis 149, lokalisiert (siehe Abbildung 3-1).

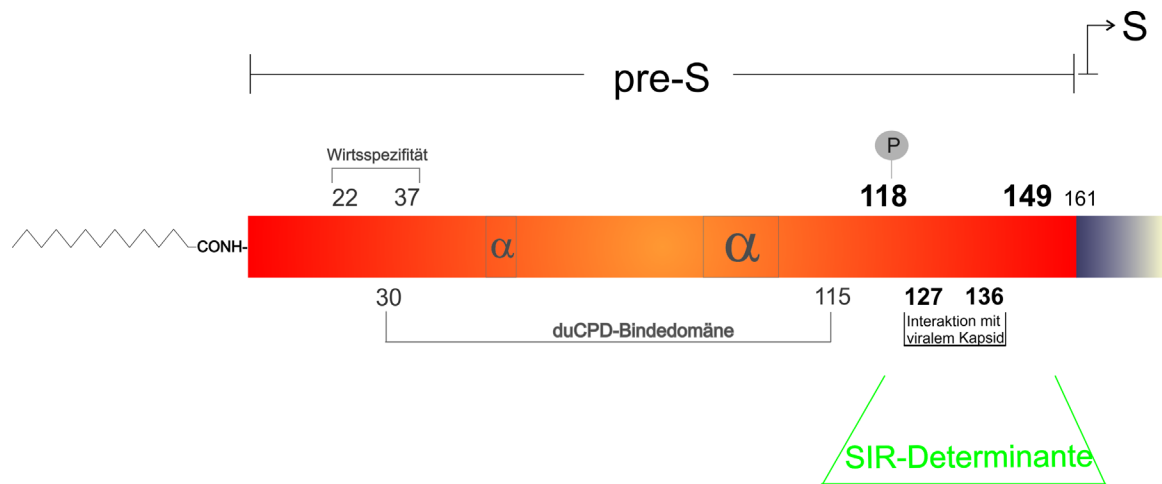


Abbildung 3-1 Lokalisation der SIR-Determinante in DHBV pre-S.

Die via Mutations- und SIA-Analyse identifizierte SIR-Determinante umfasst die Reste aa 118-149 in pre-S und umschließt damit auch die Matrixdomäne (aa 127-136) des großen Hüllproteins.

Die hiesigen Ergebnisse weisen es zwar aus, inwiefern es sich beim Sequenzbereich aa 126-133 um eine SIR-Hauptdeterminante handelt, lässt sich an dieser Stelle nicht mit hundertprozentiger Sicherheit beantworten. Interessant sind in diesem Zusammenhang Parallelen zu den Erkenntnissen von Lenhoff und Summers¹²⁸: Beginnend mit der Beobachtung, dass in der pre-S Region zwischen Aminosäure 117 und 136 die Fähigkeit von L liegt, neugebildete Kapside zu umhüllen (und damit indirekt die Amplifikation von ccc-DNA negativ zu regulieren) konnten die Autoren via *linker-scanning*-Mutagenese die Matrixdomäne in L final auf den Sequenzabschnitt aa 127-136 eingrenzen. Sogar Punktmutationen an den Positionen D128 und L131 zeigten sich als ausreichend um die Matrixfunktion von pre-S zu vermitteln. Der Abschnitt aa 126-133 in pre-S, dessen Verlust in der hier vorliegenden Arbeit in transduzierten Zellen eine maximale SIA induzierte, würde demnach vollständig mit der definierten Matrixdomäne in pre-S kolokalisieren. Interessant wäre es natürlich, den SIA-Phänotyp von L mit Punktmutationen an Position 128 bzw. 131 weiter zu untersuchen.

Für die Effizienz einer SIR ist es entscheidend, den Kerntransport von Kapsiden, die mit einer Zweitinfektion in die Hepatozyte gelangen, zu verhindern. Einen plausiblen Erklärungsansatz für den bei DHBV zugrunde liegenden SIR-Mechanismus bietet eben diese Funktion von L, nämlich Kapside zu umhüllen und die Freisetzung umhüllter Partikel aus der Zelle über den sekretorischen Weg zu initiieren. Das an dieser Stelle entwickelte Modell (siehe Abbildung

3-2) geht daher davon aus, dass virale Partikel aus einer Sekundärinfektion an Hepatozyten binden und auch, basierend auf den Daten der Bindeanalyse (2.4.3, Abbildung 2-16), in die Zellen aufgenommen werden. Nach Freisetzung des Kapsids ins Zytoplasma erfolgt dann allerdings, statt einer zweiten Infektion des Zellkerns, direkt eine Interaktion mit im ER lokalisiertem und im Zuge der Primärinfektion neusynthetisiertem L. Daraufhin resultiert eine Neu- bzw. Re-Umhüllung der Kapside, gefolgt von deren Ausschleusung aus der Zelle. Das superinfizierende Virus würde somit daran gehindert werden einen cccDNA-Pool seines eigenen Genoms zu etablieren. Die durch L mittelbar negativ regulierte Amplifikation von cccDNA^{260,97} würde damit nicht nur bei der Primär- sondern auch bei einer Superinfektion der Zelle zum Tragen kommen.

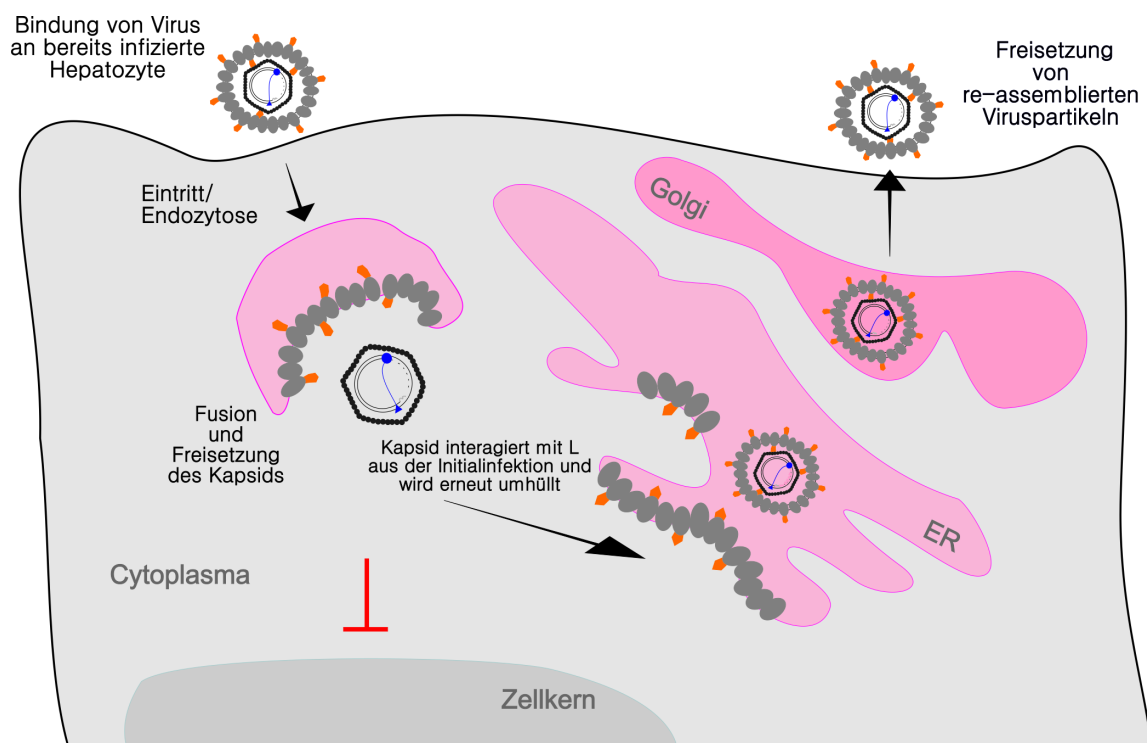


Abbildung 3-2 Modell zum SIR-Mechanismus.

Superinfizierendes Virus bindet an eine bereits mit DHBV infizierte Hepatozyte und wird internalisiert. Im Zytoplasma interagieren die freigesetzten Kapside mit bereits vorhandenem L an intrazellulären Membranen und werden neu umhüllt. Re-Assemblierte Viruspartikel werden aus der infizierten Zelle freigesetzt. Ein Import des viralen Genoms in den Zellkern bzw. die Etablierung eines eigenen cccDNA-Pools des sekundär infizierenden Virus wird so verhindert.

Die Notwendigkeit der Differenzierung seitens des primär infizierenden Virus zwischen „eigenen“, d.h. gerade assemblierten aber noch unreifen Kapsiden und „fremden“ Kapsiden,

d.h. Nukleokapsiden des superinfizierenden Virus, könnte dadurch bewerkstelligt werden, dass die sekundär ins Zytoplasma entlassenen Kapside direkt in einem reifen Zustand vorliegen, ohne den eine Umhüllung am ER nicht eingeleitet werden kann²⁶¹. Mittels eines synchronisierten Replikationssystems gelang es Perlman und Kollegen zu zeigen, dass die Sekretion umhüllter Viren erst spät im Infektionszyklus stattfindet, und eine Umhüllung generell ein Kapsid mit doppelsträngigem, reifem DNA-Genom erfordert²⁶². Der Übergang von einem unreifen in einen reifen Zustand ist bei DHBV außerdem an Strukturänderungen des Kapsids, an den Phosphorylierungszustand des Core-Proteins und Signalstrukturen, die die Membranassoziation des Kapsids gefolgt vom *virus budding* induzieren, gekoppelt²⁶³. Dieser multifaktorielle Mechanismus erlaubt es dem Virus zwischen intrazellulären Kapsiden unterschiedlicher Reifegrade zu unterscheiden. Beruhend auf diesen Grundlagen und der Tatsache, dass die SIR zeitlich direkt mit der Expression von L eintritt (2.3.3), könnte auch die Differenzierung zwischen „eigenen“ und „fremden“ Kapsiden funktionieren. Die *per se* reifen Kapside aus der Sekundärinfektion würden bei der Interaktion mit L den unreifen Kapsiden aus der Primärinfektion vorgezogen werden.

Eine weitere hoch interessante Fragestellung, die sich aus dem entwickelten Modell, ist, ob die mutmaßlich neuentstehenden re-umhüllten Viruspartikel im Überstand einer Zellkultur nachweisbar sind, und falls ja, ob sie infektiös sind? Die technische Herausforderung würde hierbei darin bestehen, eine valide Nachweismethode zu finden, die eine eindeutige Zuordnung der Kapside und der Hülle hinsichtlich ihrer Herkunft (erstes oder zweites Virus) erlaubt. Ein intrazelluläres *tracking* von z.B. farbstoffmarkierten Kapsiden, wäre aufgrund der extrem niedrigen Quantität der Bindeereignisse und dem hohen technischen Aufwand praktisch kaum durchführbar. Sinnvoller wäre es, Ad-DuL-transduzierte PDHs mit replikationsdefizientem DHBV (z.B. durch vorherige UV-Bestrahlung der Viren) zu infizieren. Entstehende Viruspartikel, d.h. umhüllte Kapside, könnten nur aus einer Re-Umhüllung von Kapsiden aus der Zweitinfektion hervorgehen, da die Transkription inhibiert wäre und demnach weder L noch Core gebildet würden²⁶⁴.

Interessant wäre es auch, eine mikroskopische Analyse Ad-DuL-transduzierter PDHs unter diesem neuen Gesichtspunkt durchzuführen und den von Scheirich beobachteten Nachbarschaftseffekt zu untersuchen¹⁹⁴. Scheirichs Analysen zufolge werden präferentiell Hepatozyten in direkter Nachbarschaft zu Ad-DuL-transduzierten Zellen infiziert, ein Phänomen, das ebenfalls pre-S-vermittelt sein soll. Interessant wäre es zu überprüfen, ob

diese Infektionsereignisse möglicherweise durch re-umhüllte und aus der DuL-exprimierenden Zelle entlassene Viren gesetzt werden.

Bezüglich der Speziespezifität ist es für DHBV nicht relevant, eine Superinfektion durch HBV ausschließen zu können, da das Humanvirus *per se* keine Entenhepatozyten infiziert. Selbst für HHBV stellt sich die Frage kaum, da auch das nahverwandte Avihepadnavirus Pekingtonen nicht effizient infiziert²⁴. An dieser Stelle ist es somit nicht weiter verwunderlich, dass die SIA-Analyse ergeben hatte, dass HHBV L nicht in der Lage ist, eine DHBV-Infektion auszuschließen (2.5.2.7). Ein Vergleich der Matrixdomänen beider Avihepadnaviren zeigt, dass die Sequenz nur etwa zu einem Drittel homolog ist (siehe Alignment unter 2.5.2.7 und Abbildung 2-18, aa 129-DPLL-132), ein weiteres Drittel weist keinerlei Ähnlichkeit auf. Die Tatsache, dass die Generierung von DHBV/HHBV-Pseudopartikeln nur ineffizient funktioniert²⁰⁵, persönliche Kommunikation mit S. Seitz unterstreicht dies, spricht aber auch dafür, dass noch andere Faktoren bzw. spezifische Interaktionen (z.B. mit DHBV S) involviert sind, die HHBV L nicht komplementieren kann.

Die Beobachtung, dass weder DHBV pre-S in Kombination mit HBV S (2.5.2.6), noch DHBV S alleine (2.5.1) es vermochten, eine SIR zu vermitteln, leitet zu der Annahme, dass zusätzlich zu der Interaktion von pre-S und Kapsid entweder i) ein „*crosstalk*“ der beiden Subdomänen oder ii) ein synergistischer Beitrag von S bzw. der S-Domäne für einen effektiven Ausschluss wichtig ist. Die zytoplasmatisch orientierte, hydrophile Schleife in S, die die Transmembranregionen TM-1 und TM-2 verbindet, könnte eine zusätzliche Matrixfläche bei der Kapsidbindung anbieten. Während für HBV schon gezeigt werden konnte, dass i) kurze Deletionen in der C-terminalen Hälfte dieses *loops* die Bildung von Virionen inhibieren²⁶⁵ und ii) dass 2 Segmente in pre-S und S synergistisch bei der Kapsidbindung wirken²⁶⁶, bleibt die Situation bei DHBV noch ungeklärt. Da sich die *loop*-Region beim Vergleich von Säuger- und Vogelhepadnaviren sowohl in der Länge, als auch in der Sequenz weitestgehend konserviert zeigt, liegt die Vermutung nahe, dass sich eine Rolle des *loops* auch beim *assembly* (bzw. *Re-Assembly*) von DHBV bewahrheiten könnte.

Evolutionsbiologisch gesehen liegt bei einem Superinfektionsausschluss der Gewinn für das zuerst infizierende Virus im Erhalt der eigenen genetischen Anlagen. Der nicht-zytopathische Charakter einer Hepadnavirusinfektion weist darauf hin, dass die Viren eine Strategie entwickelt haben, um langfristig und nicht offensichtlich in der Hepatozyte zu persistieren. Wie bereits ausgeführt, ist ein optimiertes „Zusammenspiel“ von Wirtszelle und Pathogen für

diese Eigenschaft unabdingbar. Der SIR könnte in dieser Wechselbeziehung eine bedeutende Rolle zukommen, indem der Ausschluss einer Zweitinfektion dahingehend einen Beitrag leistet, die zellulären Ressourcen nicht mit einem konkurrierenden Virus teilen zu müssen. Wenn es mehreren Viren gelingen würde in derselben Zelle eine produktive Infektion zu setzen, begleitet von einer entsprechend gesteigerten Genexpression und einer höheren lokalen Konzentration viraler Proteine (z.B. Hüllproteine im ER) könnte dies einen toxischen Effekt für die Zelle zur Folge haben. Die Infektion von Enten mit einer DHBV-Variante, die aufgrund eines Verlusts der regulatorischen Fähigkeit von L, deutlich erhöhte cccDNA-Mengen produziert, führte zu pathologischen Folgeerscheinungen der Leber^{204,218}. Daraus wird ersichtlich, wie wichtig es für das Virus ist, die Zelle so früh wie möglich im Infektionszyklus gegen eine weitere Infektion durch ein homologes Virus „abzudichten“.

Dass L in seiner SIR-Funktion Wirkung zeigt sobald es exprimiert ist, konnte demonstriert werden, einen Rückschluss auf den genauen Zeitpunkt der Blockade ist bis dato aber nicht möglich. In Anbetracht dieser Sachlage wäre es interessant, eine durch Obert und Kollegen gemachte bemerkenswerte Beobachtung weiterzuverfolgen. Entgegen dem bis zu diesem Zeitpunkt vorherrschenden Modell zur hepadnaviralen Proteinsynthese an ungespleißten RNAs, konnten die Autoren einen zweiten mRNA-Typ für die Produktion von L nachweisen, die eine gespleißte Form der pregenomischen RNA (*spliced* L-RNA) darstellt⁷⁴. Für den hiesigen Kontext relevant ist dabei die Tatsache, dass diese mRNA zwar für die produktive DHBV-Infektion in infizierten Enten und Hepatozyten wichtig ist, für die Virusbildung in transfizierten Zellen aber keine Rolle spielt, was wiederum auf eine Rolle dieses L-Synthesepathways während eines frühen Schrittes im Infektionszyklus schließen lässt. Zu prüfen wäre ob diese L-RNA (unter anderem) die Funktion hat, das große Hüllprotein so schnell wie möglich in der infizierten Zelle zur Verfügung zu stellen, um z.B. eine SI der Hepatozyte zu verhindern.

Das Phänomen einer SIR ist für das Hepatitis B Virus des Menschen bis dato wenig untersucht. Von größter Bedeutung wäre es zu überprüfen, ob die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse auch Aufschluss zum Superinfektionsausschluss bei der HBV-Infektion geben können.

4 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wie z.B. die Transformation von Bakterien oder die analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden aus „*Molecular cloning: A laboratory manual.*“ (Sambrook et al., (1989), Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York) entnommen und sind daher an dieser Stelle nicht mehr einzeln aufgeführt.

Die Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen in unterschiedlichen Maßstäben, aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen wurden mit den unter 4.1.6 aufgeführten *Kits* nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Protokolle sind daher ebenfalls nicht mehr aufgeführt.

Speziell verwendete *software* ist in den jeweiligen Abschnitten erwähnt. Alle Abbildungen dieser Arbeit wurden in CorelDRAW X3 (Corel) erstellt.

4.1 Material

4.1.1 Puffer und Lösungen

„*Bluebuffer*“ für DNA-Probenpuffer

0,2 % Bromphenolblau
0,2 % Xylencyanol
60 % Glycerol
60 mM EDTA

DNA-Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese (6 x)

100 µl „Bluebuffer“
+ 600 µl Glycerol (99,5 %)
+ 120 µl 0,5 M EDTA
+ 180 µl H₂O

Lagerung bei -80 °C.

ECL-Reagenz

Lösung A

0,08 g 3-Aminophtalhydrazide
in 1,8 ml DMSO lösen

ad 100 ml mit aqua bidest. 900 µl Aliquots bei -20 °C einfrieren (für 50 ml Lösung I).

Lösung B

0,014 g p-Coumarin Säure
in 1 ml DMSO lösen

ad 100 ml mit aqua bidest. 500 µl Aliquots bei -20 °C einfrieren (für 50 ml Lösung I).

Lösung I

Zu 48,6 ml 100 mM Tris, pH 9,35 (autoklaviert) entsprechende Aliquots der Lösungen A und B zugeben, gut mischen und dunkel bei 4 °C lagern.

Lösung II

50 ml 100 mM Tris, pH 9,35 (autoklaviert)
+ 6 µl H₂O₂ (30 %)

Lösung möglichst frisch ansetzen, Lagerung höchstens eine Woche bei 4 °C in lichtundurchlässigem Behältnis.

10x Laufpuffer für SDS-PAGE nach Laemmli

30,28 g Tris
+ 144 g Glycin
+ 10 g SDS
+ 100 mg NaN₃

ad 1000 ml mit aqua bidest. pH stellt sich automatisch auf 8,30 ein. Vor Gebrauch 1:10 verdünnen. Lagerung bei RT.

10 x PBS, pH 7,4

80 g NaCl
+ 2 g KCl
+ 11,5 g Na₂HPO₄-Dihydrat
+ 2 g KH₂PO₄

ad 1 l mit aqua bidest.

Paraformaldehyd (PFA), 4 %

100 ml

4 g PFA in heißem dH₂O aufnehmen
+ einige Tropfen 1 N NaOH
+ 10 ml 10 x PBS, wenn PFA gelöst ist.
Mit 2 N HCl pH 7,4 einstellen. Ad 100 ml dH₂O. Lagerung bei -20 °C.

Sammelgelpuffer (4 x) für SDS-PAGE (nach Laemmli (1970))

500 mM Tris/Cl, pH 6,8
0,4 % SDS
0,01 % Natriumazid

in aqua bidest. Lagerung bei RT.

SDS-Probenpuffer (2 x)

200 mM Tris/Cl, pH 6,8
6 % SDS
20 % Glycerol
10 % DTT
+ 0,1 mg/ml Bromphenolblau
+ 0,1 mg/ml Orange G
in aqua bidest. Lagerung bei -20 °C.

Standard-Salz-Citrat (SSC) (20 x), pH 7,0

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat

TAE (50x) für Agarosegelelektrophorese

242 g Tris
+ 57,1 ml HAc
+ 100 ml 0,5 M EDTA-Stammlösung (pH 8,0)
ad 1000 ml mit aqua bidest. Lösung bei RT lagern.

TBS (10 x)

80 g NaCl
+ 24,2 g Tris
ad 1000 ml mit aqua bidest. pH sollte bei 8,0 liegen. Lagerung der Lösung bei RT.

TE-Puffer (*low*), pH 8

10 mM Tris
0,1 mM EDTA

Transferpuffer für Western Blot nach SDS-PAGE (nach Bjerrum und Schafer-Nielsen)

5,82 g Tris
+ 2,93 g Glycin
+ 3,75 ml 10 % SDS
+ 100 ml Methanol
ad 1000 ml mit aqua bidest. pH sollte zwischen 9,0 und 9,4 liegen. Lagerung bei RT.

Trenngelpuffer (4 x) für SDS- PAGE (nach Laemmli (1970))

1,5 M Tris/Cl, pH 8,80
0,4 % SDS
0,01 % NaN₃
in aqua bidest. Lagerung bei RT.

4.1.2 Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien

Alle Medien sowie Zusätze wurden von Gibco Invitrogen bezogen.

Name	Beschreibung	Referenz
LMH-Zellen	Hühner Hepatoma Zelllinie	Kawaguchi <i>et al.</i> , 1987 ²⁶⁷
293-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie	Graham <i>et al.</i> , 1977 ²⁶⁸

Zelllinie	Medium	Additive	Stock-Konz.	Volumen (ml)
LMH	DMEM/F12			500
		+ FCS (hitzeinaktiviert)		50
		+ Penicillin/ Streptomycin	100 x	5
		+ L-Glutamin	200 mM	5
		+ Nicht-essentielle Aminosäuren	100 x	5
293	DMEM	+ Natrium-Pyruvat	100 mM	5
		+ FCS (nicht-hitzeinaktiviert)		50
		+ Penicillin/ Streptomycin	100 x	5
		+ L-Glutamin	200 mM	5

4.1.3 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Firma/ Referenz
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	BRL
Top 10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen
BJ5183	endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str _r)	Stratagene

4.1.4 Antikörper**Primärantikörper**

Spezifität/ Epitop	Antikörper	Spezies	Verdünnung		Referenz/ Firma
			WB	IFA	
α -DHBV_S aa 266-275 bzw. aa 267-276	7C.12	Maus (Hybridom)	1:5	1:10	Pugh et al., 1995 ¹⁹⁵ Guo and Pugh, 1997 ⁹⁴ Sunyach et al., 1999 ²⁶⁹
α -DHBV_pre-S aa 101-105	4F8	Maus (Hybridom)	1:5		Urban et al., 2000 ¹⁷¹
α -DHBV_pre-S aa 101-109	1H.1	Maus (Hybridom)		1:150	Pugh et al., 1995 ²⁰³
α -DHBV_pre-S aa 10-24 aa 45-60 aa 73-87 aa 85-96	D084	Kaninchen (polyklonales Serum)	1:5 000		Schlicht et al., 1987 ³⁹
α -DHBV_Core	D087	Kaninchen (polyklonales Serum)	-	1: 500	Schlicht et al., 1989 ⁵²
α -HHBV_L	7030	Kaninchen (polyklonales Serum)	1: 5000	-	H. Will
α -HHBV_L	7029	Kaninchen (polyklonales Serum)	1: 5000	-	H. Will
α - Actin Epitop an N- Terminus der β - Isoform von Actin	α - β -Actin Klon AC-15 (A1978)	Maus (monoklonal, Hybridom)	1: 5 000	-	Sigma-Aldrich

Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung		Detektion	Firma
		WB	IFA		
Goat- α -Rabbit (G α R p.o.)	Peroxidase	1:10 000	-	ECL (WB)	Dianova
Goat- α -Mouse (G α M p.o.)	Peroxidase	1:10 000	-	ECL (WB)	Dianova
Goat- α -Rabbit- IRDye800CW	Fluorophor	1:10 000	-	LI-COR (WB)	Rockland
Goat- α -Mouse- IRDye680CW	Fluorophor	1:10 000	-	LI-COR (WB)	Rockland

Goat- α -Rabbit-Alexa546	Fluorophor	-	1:500	Fluoreszenz	Molecular Probes
Goat- α -Rabbit-Alexa 488	Fluorophor	-	1:500	Fluoreszenz	Molecular Probes
Goat- α -Mouse-Alexa 647	Fluorophor	-	1:500	Fluoreszenz	Molecular Probes
Goat- α -Rabbit-Alexa 680	Fluorophor	-	1:500	Fluoreszenz	Molecular Probes

4.1.5 Enzyme

Falls nicht anders vermerkt wurden Enzyme von der Firma New England Biolabs bezogen.

4.1.6 Kits

QIAquick® Gelextraction Kit (Qiagen)

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)

FastPlasmid Mini Kit (VWR)

GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen)

BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Megaprime™ DNA labelling systems (GE Healthcare Life Science)

NucleoSpin® Blood (Macherey und Nagel)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Primärzellkultur

Die Kultivierung von Primärzellen beschränkte sich auf die Präparation und Kultivierung von primären Entenhepatozyten (PDHs).

4.2.1.2 Präparation und Kultivierung primärer Entenhepatozyten

Medium	Benötigtes Medium/ Lösungen	Stock- Konzentrationen	Volumen (ml)
PDH-Mix (à 28,7 ml)	Hepes	1 M	11,5
	+ Glutamin		5,6
	+ Penicillin/ Streptomycin		5,6
	+ Glucose	5 %	6
Waschmedium	Williams` E Medium		500
	+ PDH-Mix		28,7
	+ Insulin	3 mg/ml	0,15
	+ Natrium-Pyruvat		28
Preperfusionsmedium	Waschmedium		100
	+ EGTA	0,1 M, pH 7.4	1,3
	+ Heparin	5 000 E/ml	0,3
Collagenasemedium	Williams` E Medium		500
	+ PDH-Mix		28,7
	+ CaCl ₂	1 M	1,8
	+ Insulin	3 mg/ml	0,15
	+ Natrium-Pyruvat		30
Kulturmedium	Williams` E Medium		500
	+ PDH-Mix	5 mg/ml	28,7
	+ Gentamycin	2,5 mg/ml	0,55
	+ Hydrocortison	3 mg/ml	0,6
	+ Inosin		2,8
	+ Insulin		0,15
	+ DMSO		8,7

Die Präparation primärer Entenleberzellen erfolgte nach der Methode von Berry und Friend (1969²⁷⁰), modifiziert und beschrieben durch Galle *et al.* (1989¹⁵⁸). Für die Präparation wurden 2-3 Wochen alte Pekingenten verwendet, die zunächst mittels PCR auf einen DHBV-negativen Serumstatus hin analysiert wurden. Den Tieren wurde hierfür am Tag vor der Leberpräparation 50-100 µl Blut abgenommen, die DNA isoliert und einer DHBV-

spezifischen PCR unterzogen. Am Folgetag wurden der Ente 30 min vor Präparationsbeginn intravenös 1250-2250 IE Heparin (25000 IE/ 5 ml, B.Braun) injiziert. Eine Braunüle® (B. Braun) wurde über ein Schlauchsystem mit einer peristaltischen Pumpe verbunden und so die Leber über die Pfortader mit erwärmtem (42 °C) Preperfusionsmedium (125 ml bei einer 2-3 Wochen alten Ente) für etwa 10 min gespült, um restliches Blut zu entfernen. Hierbei war die Entfärbung der Leber deutlich zu beobachten. Dem Preperfusionsmedium waren 50 mg Collagenase (Sigma-Aldrich, Typ IV von *Clostridium histolyticum*) pro 100 ml Medium zugesetzt. Danach erfolgte zunächst ein *in vivo* Verdau der Leber, indem diese mit etwa 80 ml Collagenasemedium perfundiert wurde. Die Leber wurde anschließend entnommen, in kleinere Stückchen geschnitten und unter Rühren mit 40-50 ml des Collagenasemediums noch für weitere 30 min bei 37 °C im Inkubator *ex vivo* nachverdaut. Die Leberzellsuspension wurde dann über einmal 8-Lagen Gaze und einmal 12-Lagen Gaze vorfiltriert. Das Homogenat wurde danach in sterilen 50 ml-Reaktionsgefäßen viermal abzentrifugiert (50 x g, 4 min, 20 °C), wieder in ½ des Ausgangsvolumens in Waschmedium aufgenommen und vorsichtig homogenisiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 20 ml warmem Kulturmedium aufgenommen und durch einen 40 µm Filter (Cell Strainer, BD Falcon) gegeben, um restliche Zellaggregate vor dem Ausplattieren zu entfernen. Zur Ermittlung der optimalen Zellzahl pro Schale wurde ein von B. Glass (Labor Prof. Schaller, ZMBH, Heidelberg) empirisch ermitteltes Verfahren zum Ausplattieren der Hepatozyten-Präparation angewendet, wobei die Zelldichte nach folgender Gleichung ermittelt wurde:

$$OD_{260\text{ nm}} = 0,9 \rightarrow 10^6 \text{ Zellen/ } 10 \mu\text{l} \rightarrow 10^8 \text{ Zellen/ } 1 \text{ ml}$$

Pro Schale einer 12-well Platte wurden 1×10^6 Zellen ausgesät. In den ersten 2 Tagen wurde das Medium täglich, danach alle 2 Tage gewechselt. Die Zellen konnten so für ca. 14 Tage in Kultur gehalten werden. In der Regel wurden die ersten Versuche an Tag 4 nach Ausplattieren vorgenommen. Bei einigen Leberpräparationen erfolgte ein zusätzlicher Anreicherungs-schritt der Leberparenchymzellen. Um die Hepatozyten von nichtparenchymatösen und toten Zellen zu separieren, erfolgte eine Zentrifugation über einen Percoll-Dichtegradienten. Folgende Lösung mit einer Dichte von 1,063 g/ml Percoll© (Easycoll-Trennlsg., Biochrom AG, 1,124g/ml (L6143) wurde pro Präparation angesetzt:

$$40 \text{ ml Percoll/PBS-Lösung} \rightarrow 19,49 \text{ ml Easycoll-Trennlösung} + 20,51 \text{ ml } 1 \times \text{PBS}$$

Bis nach dem vierten Zentrifugationsschritt nach dem *ex vivo* Verdau der Leber erfolgte die Präparation analog. Das in 2 50 ml-Reaktionsgefäßen befindliche Zellpellet wurde dann in je 19 ml Percoll/PBS-Lösung aufgenommen und vorsichtig homogenisiert. Es folgte eine

Zentrifugation bei 50 x g für 10 min bei 20 °C ohne Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 ml Waschpuffer gewaschen, indem es vorsichtig resuspendiert und erneut abzentrifugiert wurde (28 x g (S2-Heraeus = 350 rpm) für 5 min bei 20 °C (mit Bremse)). An dieser Stelle wurden die Pellets gepoolt, die Zellen mittels Zellsieb vereinzelt und die Zellen nach der OD-Messung ausplattiert (s.o.).

4.2.1.3 DHBV Infektions- und Bindestudien an primären Entenhepatozyten

Die durchgeführten Infektions- und Bindestudien an PDHs erfolgten mit DHBV-positivem Serum (DHBV-wt), ein Pool aus verschiedenen DHBV-16-positiven Entenseren mit einem Titer von $2,5 \times 10^9$ Viruspartikeln pro ml (bestimmt als Genomäquivalente (GE) via DNA-Dotblot (4.3.1)). In 12-*well* Platten (etwa 1×10^6 PDHs pro *well*) wurde ein Ansatz in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml pro *well* pipettiert, die Virusmenge pro *well* lag zwischen $0,5 \times 10^7$ und $2,5 \times 10^8$, was MOIs von 5-125 entspricht. Die Inkubation der Zellen mit Virus erfolgte für 3 h bei 37 °C. Um eine Aufnahme viraler Partikel zu verhindern erfolgte alternativ die Inkubation bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen. Im Fall einer 4 °C-Inkubation wurde gekühltes PBS verwendet. Wie unter 4.3.3.1 beschrieben, wurden die Zellen für eine anschließende Detektion viraler Zellassoziation (Bindung und Aufnahme) direkt nach Beendigung der Inkubationsphase mit Proteinase-K lysiert und die DNA direkt im Anschluss isoliert (*NucleoSpin Blood kit*, Macherey und Nagel). Die Proben konnten bis zur Aufreinigung auch bei -20 °C gelagert werden. Für die Analyse einer produktiven Infektion wurden die Zellen für weitere 4-7 Tage bei 37 °C kultiviert bevor sie analog weiterbehandelt wurden. Alternativ wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzanalyse wie unter 4.5 beschrieben unterzogen. Die quantitative Analyse der gereinigten DNA-Proben erfolgte mittels *real-time* PCR nach der TaqMan®-Methode, die unter 4.3.3.2 beschrieben ist. Für die statistische Auswertung und Regressionsanalysen wurde das Programm Prism 5 (5.00), GraphPad verwendet.

4.2.1.4 Inhibitionsstudie zur hemmenden Wirkung von Suramin auf die DHBV-Infektion

Die Infektion von PDHs erfolgte in 12- oder 24-*well* Platten (à 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen/Schale) und wie unter 4.2.1.3 beschrieben. Suramin (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) wurde dem Inokulum in gewünschter Konzentration zugefügt, d.h. die Zellen wurden zeitgleich mit dem Harnstoffderivat und mit Virus (25 GE/Zelle) inkubiert. Die Inokulation erfolgte bei 37 °C, um Bindung und Aufnahme viraler Partikel zu untersuchen, und bei 4 °C, um die Zellbindung isoliert zu betrachten. Nach einer Inkubationsdauer von 3 h wurden die Zellen

dreimal mit PBS, welches entsprechend ungekühlt bzw. gekühlt war, gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen wie in Absatz 4.3.3 beschrieben weiterbehandelt, d.h. für Bindestudien wurden die Zellen direkt nach der Inokulation lysiert, die DNA extrahiert und in der PCR gemessen. Für Infektionsstudien wurden die infizierten Zellen für 4 weitere Tage inkubiert, um dann die DNA zu extrahieren und zu quantifizieren oder um Infektionsereignisse auf Einzelzellebene via IFA zu analysieren.

4.2.1.5 Kinetikstudie zum Zeitpunkt der inhibitorischen Wirkung von Suramin auf die DHBV-Infektion

Um kinetische Aspekte der inhibitorischen Wirkung von Suramin zu untersuchen wurde folgende Studie durchgeführt: PDHs wurden alternativ zur zeitgleichen Inkubation mit Suramin und DHBV vor oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation für 3 h bei 37 °C mit Suramin behandelt (siehe Übersichtsschema in Abbildung 2-15). Als Kontrolle für die Inhibition war Suramin nur während der Inokulation zugegen, als Infektionskontrolle dienten unkompetierte Ansätze. Die Studie wurde an Zellen aus 2 unabhängigen Leberzellpräparationen und jeweils im Doppelansatz durchgeführt. Die Suraminkonzentration betrug 120 bzw. 200 µg/ml, die Viruskonzentration lag bei 50 GE/Zelle. Nach Inokulation bzw. Suraminbehandlung wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, in einer der Studien wurden alle Ansätze danach noch für 1 min mit Glycin-Puffer (50 mM Glycin-HCl/0,15 M NaCl, pH 2.2) inkubiert. Bereits gebundene aber noch nicht aufgenommene Viruspartikel wurden so inaktiviert und an einer Infektion gehindert. 4 Tage p.Inf. wurde die DNA der Ansätze wie unter 4.3.3 beschrieben isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert.

4.2.1.6 Transduktion von PDHs mit rekombinanten Adenoviren

PDHs wurden mit den unter 4.2.4.3 generierten und getiterten rekombinanten Adenoviren transduziert. Die Zellen wurden hierfür mit den unaufbereiteten, hochtitrigen 293-Zelllysaten für 2 h bei 37°C inkubiert und dann gründlich mit PBS gewaschen. Die gewünschte Transduktionseffizienz wurde zum einen über die zuvor ermittelte MOI der jeweiligen Viruspräparation auf 293-Zellen erreicht, zum anderen wurden PDHs im Vorfeld testweise transduziert und über die GFP-Fluoreszenz die virale Konzentration ermittelt, die zum einen ein effektives Transduktionsergebnis lieferte, zum anderen aber kein zytotoxischen Effekte wie z.B. das Abrunden der Zellen oder eine übermäßige Vakuolisierung der Zellen beobachten ließ. Da sich PDHs etwa um den Faktor 100 schlechter transduzieren lassen als herkömmliche Zelllinien¹⁹¹, außerdem die Transduktionseffizienz bei 2 Leberpräparationen

schwankt und die Versuchsdauer einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen umfassen konnte, war dies ein wichtiger Vorversuch. Zur Ermittlung der rekombinanten Proteinexpression wurden die transduzierten Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten p.Tr. (z.B. 1 h p.Tr. bedeutet 1 Stunde nach Beendigung der Transduktion) in SDS-Probenpuffer lysiert und einer Western Blot Analyse nach 4.4.2 unterzogen.

4.2.1.7 Infektions- und Bindeanalysen an transduzierten PDHs

2 Tage p.Tr. wurden die Zellen mit DHBV-haltigem Serum überinfiziert und entweder nach 3 weiteren Stunden der Inkubation bei 37 °C in Proteinase-K-Puffer lysiert, die DNA aufgereinigt und in die qRT-PCR eingesetzt oder die Zellen wurden nach gründlichem Waschen für eine Analyse der DHBV-Infektion für weitere 4-6 Tage inkubiert und die DNA dann extrahiert. Alternativ wurden Infektionsereignisse und doppelt infizierte Zellen via IFA ermittelt und quantifiziert. Überblick zum Ablauf gibt Abbildung 2-9. Siehe auch Abschnitte 4.2.1.3, 4.3.3, 4.5. Die in der IFA verwendeten Antikörper sind unter 1.1.1 aufgeführt. Die graphische und statistische Auswertung der Resultate erfolgte mittels der Statistiksoftware Prism 5 (GraphPad).

4.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Gewebekulturflaschen oder Schalen und entsprechendem Medium (siehe 4.1.2) kultiviert. In der Regel wurden sie alle 3 Tage 1:5 bis 1:10 gesplittet.

4.2.3 Topologische Analyse von pre-S in DuL und in der Chimäre Dupre-S/HuS

Für eine vergleichende Analyse der Topologien der pre-S-Region in Dupre-S/HuS bzw. DuL wurden die entsprechenden adenoviralen Konstrukte in LMH-Zellen exprimiert, die Zellen im Folgenden einer Mikrosomen-Präparation unterzogen und mit der so gewonnenen zellulären Fraktion ein Trypsin-Protektionsversuch durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte nach einer Separation der Proteine in einer SDS-PAGE im Western Blot.

LMH-Zellen wurden auf 10 cm Schalen so ausgesät, dass sie am Folgetag zum Zeitpunkt der Transduktion 70-80 % konfluent waren. Die Zellen wurden mit analogen viralen Titern transduziert, wobei hier die unter 4.2.4.3 beschriebene Virustiterbestimmung zugrunde liegt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen einer Präparation der mikrosomalen Membranen unterzogen.

4.2.3.1 Präparation mikrosomaler Membranen

Die Präparation erfolgte anlehnend an die Methode nach Prange und Streeck, 1995⁹¹. Die Zellen wurden einmal mit je 4 ml kaltem 1 x TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) gewaschen. Im Anschluss erfolgte in je 1,4 ml kaltem 0,1 x TBS eine Inkubation für 10 min auf Eis. Die Zellen wurden abgeschabt, in ein entsprechendes Glasgefäß überführt und mit insgesamt 20 Stößen mit einem *Douncer* aufgebrochen und homogenisiert. Nach Zugabe von je 150 µl 10xTBS erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 rpm für 15 min bei 4 °C. Der geklärte Überstand wurde dann auf 2,7 ml 10 %-Sucrose (Carl Roth®) geladen, welche in ein SW60-Röhrchen vorgelegt worden war. Nach Zentrifugation bei 37000 rpm für 30 min bei 4 °C wurde das bräunliche Pellet einmal mit 1xTBS gewaschen, um schließlich in 100 µl 1 x TBS aufgenommen zu werden. Nach zehnmalem Scheren durch eine 23 G-Nadel erfolgte entweder eine qualitative Western Blot Analyse, indem ein Aliquot der Probe mit SDS-Probenpuffer versetzt wurde, bei 70 °C für 30 min erhitzt wurde, um dann einer SDS-PAGE unterzogen zu werden. Alternativ konnte die Probe bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert werden.

4.2.3.2 Trypsin-Protektionsverdau, Western Blot Analyse und Quantifizierung

In je 3 Ansätzen (A-C) à 20 µl wurden die mikrosomalen Membranen aus LMH-Zellen wie folgt behandelt:

		Trypsin	-	+	+
		DTT/NP-40	-	-	+
Lösung	Ansatz	A	B	C	
Mikrosomen Präparation		15 µl	15 µl	15 µl	
1 M Tris-HCl (pH 8)		4 µl	4 µl	-	
100 mM DTT		-	-	2 µl	
in 1 M Tris-HCl (pH 8)					
10 % NP-40		-	-	2 µl	
in 1 M Tris-HCl (pH 8)					
Trypsin in 1mM HCl		-	1 µl	1 µl	
1 mM HCl		1 µl	-	-	

Nach Angaben des Herstellers (Roche) wurden 25 µg Trypsin (modified, sequencing grade, No. 1418025) in 1mM HCl gelöst und für ein Experiment verwendet. Ansatz A fungierte im Experiment als Positivkontrolle, die Gesamtmenge an unverdaulichem L konnte im

nachfolgenden Western Blot detektiert werden. Ansatz C diente als Kontrolle zur Effizienz des Trypsinverdau, die finale Konzentration von DTT und NP-40 lag bei 10 mM bzw. 1 %. Der tryptische Verdau erfolgte für 16-18 h bei 37 °C. Direkt im Anschluss wurde zu jedem Ansatz kochender SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:2 zugegeben und die Proben für 10 min bei 100 °C aufgekocht. Der Auftrennung der Proteine in einer 12 % SDS-PAGE folgte eine wie unter 4.4.2 beschriebene Western Blot Analyse. Für eine quantitative Analyse wurden IRDye-680- bzw. IRDye-800-konjugierte Zweitantikörper verwendet. Die Detektion und die quantitative Auswertung erfolgten am *Odyssey® Infrared Imaging System* (Li-COR Biosciences).

4.2.4 Klonierung adenoviraler Konstrukte und Herstellung rekombinanter Adenoviren

4.2.4.1 *Das pAdEasy-System*

Für die Herstellung rekombinanter Adenoviren wurde das AdEasy-System (Stratagene) verwendet¹⁸⁹. Das Gen von Interesse wird hierbei über einen sogenannten *Shuttle Vector* in *E.coli* eingebracht wo es zur homologen Rekombination mit dem adenoviralen *Backbone Vector* pAdEasy-1 (33 414 bp) kommt. Mit dem rekombinanten pAdEasy-Vektor wird dann eine *Packaging* Zelllinie transfiziert, in der der Replikationsdefekt des adenoviralen Konstrukts komplementiert wird und Viren gebildet werden können. Eine schematische Übersicht zur Prozedur gibt Abbildung 4-1. Die rekombinanten Adenoviren können dann aus den Zellen isoliert und amplifiziert werden. Protokolle und Informationen zur Adenovirusherstellung, weiterführende Literatur und Vektorkarten wurden von Stratagene (Agilent Technologies Genomics) und der *homepage* coloncancer.org/adeasy.htm bezogen.

pAdEasy enthält ein replikationsdefizientes Adenovirus-5-Genom, die E1- und E3-Gene sind deletiert. Als *Shuttle Vector* wurde der Vektor pAdTrack-CMV (9220 bp) genutzt, der es durch eine parallele Expression des einzubringenden Transgens und dem Reporter GFP erlaubt, die Virusproduktion visuell nachzuverfolgen. Die Expression beider Gene unterliegt dabei der Kontrolle separater CMV-Promotoren. Nachdem das Transgen in den *Shuttle Vector* subkloniert worden war, wurde der *E.coli* Stamm BJ5183 mit dem linearisierten Vektor und dem Basisvektor pAdEasy cotransformiert, Klone auf Kanamycin selektioniert, isoliert und durch multiplen Restriktionsverdau analysiert. Mit PacI-linearisierter DNA richtiger Klone wurden 293-Zellen transfiziert.

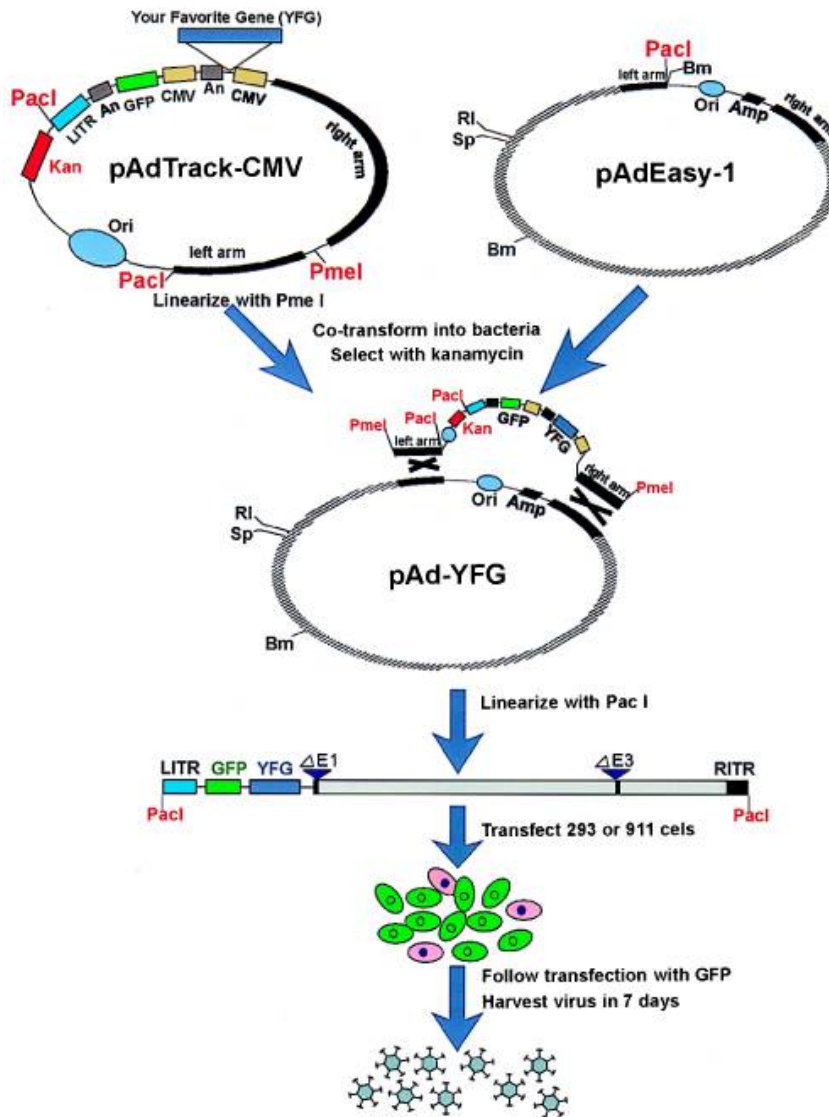


Abbildung 4-1 Schema zur Funktionsweise des AdEasy-Systems.

Nachdem das Gen von Interesse in den Shuttle Vector eingebracht wurde wird das Plasmid linearisiert und kann zusammen mit einem Adenoviralen *backbone* Vektor (z.B. pAdEasy-1) in den *E.coli* BJ5183-Zellen kotransformiert werden. Die DNA von auf Kanamycin selektierten Rekombinanten wird final über einen PacI-Verdau linearisiert und kann so in die Transfektion einer Packaging Cell Line wie 293-Zellen eingesetzt werden. Die Identifizierung rekombinanter Adenivren erfolgt dann mittels des Markerproteins GFP und fluoreszenzmikroskopischer Analyse. An, poly- adenylation site; Bm, BamHI; RI, EcoRI; LTR, left-hand ITR and packaging signal; RITR, right-hand ITR; Sp, SpeI. Aus¹⁸⁹.

4.2.4.2 Transfektion von 293-Zellen

293-Zellen wurden ein Tag vor Transfektion in T-25 Zellkulturflaschen ausgesät, so dass die Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion 50-70 % betrug. Die rekombinanten pAdEasy-Konstrukte wurden mit PacI linearisiert und über eine PEI (Polyethylenimin)-Transfektion in die Zellen eingebracht. Eine Stunde vor Transfektion wurde frisches Medium auf die Zellen

gegeben. In 2 Parallelansätzen wurden 4 µg der verdauten DNA bzw. 45 µl PEI-Lösung (1 mg/ml in Wasser) mit Basismedium (ohne Zusätze) versetzt und je auf ein finales Volumen von 300 µl gebracht. Nach fünfminütiger Inkubation der Ansätze bei Raumtemperatur wurde der PEI-Ansatz unter gleichmäßigem Schütteln zum DNA-Ansatz pipettiert und der Gesamtansatz für weitere 20 min inkubiert, bevor er tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert wurde. Nach 6 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt. Die Reporterexpression bestätigte nach wenigen Tagen eine erfolgreiche Transfektion. Die Ausbreitung der Viren in umliegende Zellen konnte in den folgenden 2 Wochen durch die Entstehung fluoreszierender „Kometen“ beobachtet werden.

4.2.4.3 Virusgewinnung, Amplifizierung und Titerbestimmung der Adenovirusstocks

In der Regel konnten die Zellen 10-14 Tagen nach Transfektion geerntet werden. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgeschabt, in 3 ml PBS aufgenommen, bei 1000 rpm bei 4 °C für 5 min abzentrifugiert und das Pellet wieder in 1,5 ml PBS aufgenommen. In 4 aufeinander folgenden Einfrier- und Auftauzyklen wurden die Zellen aufgebrochen und die Viren nach dem Entfernen von Zelltrümmern (2000 rpm, 10 min, 4 °C) im Überstand gewonnen. Die Lysate wurden mit 10 % Glycerol versetzt bei -80 °C gelagert und ohne weitere Aufreinigungsschritte für eine Amplifikation verwendet. Mit einem Drittel des gewonnenen Lysats wurden erneut 293-Zellen in T25-Flaschen infiziert und die Zellen nach maximal einer Woche nach dem oben beschriebenen Prozedere aufgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt war die Mehrzahl der Zellen GFP-positiv und zeigte bereits deutliche Anzeichen zytopathischer Effekte der Adenovirusinfektion, wie ein Abrunden der Zellen und die Ausbildung von Plaques. Weitere Runden der Amplifikation folgten, wobei hierfür Zellen in T-75-, dann in T-125-Flaschen infiziert wurden. Der jeweilige Virustiter konnte dank Reporterexpression in einer vereinfachten Variante eines Plaque-Assays bestimmt werden. In einer seriellen Verdünnungsreihe wurden 293-Zellen in 6-well Schalen mit dem entsprechenden Lysat infiziert, 18 Stunden später die Anzahl GFP-positiver Zellen durch Auszählen ermittelt und der Titer kalkuliert. Die Viruskonzentration in den SIR-Analysen lag zwischen $1,5 \times 10^9$ und $3,5 \times 10^{10}$ EFU (*expression-forming units*¹⁸⁹) pro ml. Aliquotierte Lysate wurden bei -80°C gelagert und nicht weiter aufbereitet für eine Transduktion von PDHs verwendet.

4.2.4.4 Klonierung von *pAdDuL*, *pAdDuS* und der *pAdDuL*-Mutanten

Für die Generierung rekombinanter Adenoviruskonstrukte, welche für DHBV L bzw. DHBV S kodieren wurde der entsprechende Leserahmen an einem DHBV Genom amplifiziert. Das

Einführen passender Schnittstellen erlaubte dann die Subklonierung in den Vektor pAdTrack-CMV. Als Matrize für den DHBV pre-S/S- bzw. S-Leserahmen diente das Plasmid pCD0, welches auf dem Plasmid pCD10 basiert und ein überlanges DHBV 16-Genom unter Kontrolle des *immediate early* Promotor/Enhancer des Cytomegalievirus (CMV) enthält²⁷¹. Durch entsprechend designte Primer wurde jeweils 5'- zum Leserahmen eine BglII-, 3'- eine NheI- Schnittstelle eingeführt. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht:

Rekombinantes pAdTrack-CMV-Konstrukt	An pCD0-Plasmid amplifizierter Leserahmen	Bezeichnung Oligonukleotid	Reverse Primer	Forward Primer	Eingeführte Schnittstelle	Position Alignment in pCD0 (5'-3')
pAd-DuL	Dupre-S/S	40148		x	BglII	bp 1233-1246
		40151	x		NheI	bp 2347-2355
pAd-DuS	DuS	40149		x	BglII	bp 1734-1747
		40151	x		NheI	bp 2347-2355

Für die Subklonierung wurde pAdTrack-CMV in der MCS (*multiple cloning site*) mit BglII und XbaI geöffnet und das mit BglII und NheI verdaute Insert eingefügt. Die nach erfolgreicher Transformation von *E.coli* Bakterien (Top10) isolierte DNA wurde in verschiedenen Restriktionsverdau analysiert sowie einer DNA-Sequenzierung (siehe 4.3.4) unterzogen. Die DNA richtiger Klone wurde dann PmeI-linearisiert und zusammen mit dem adenoviralen Basiskonstrukt pAdEasy-1 in eine Co-Transformation von BJ5183 Bakterien eingesetzt. Die kleinsten Kolonien wurden gepickt, die DNA isoliert (GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich) und erneut im Restriktionsverdau überprüft. Nach einer Re-Transformation der Konstrukte in Dh5α bzw. Top10 *E.coli* wurden die pAdEasy-Konstrukte in einem PacI-Verdau linearisiert und standen so für eine PEI-Transfektion von 293-Zellen zur Verfügung (siehe 4.2.4.2). Der Vektor pAdTrack-CMV_DuL wurde im Weiteren BglII/KpnI-verdaut, um mit entsprechend amplifizierten und verdauten pre-S-Inserts ligiert zu werden, in die zuvor über Primer-Mutagenese Mutationen eingeführt worden waren (siehe unten und 4.2.4.5).

Die Herstellung der unter 2.5.2 aufgeführten Ad-DuL-Mutanten bzw. die Einführung der Aminosäureaustausche und Deletionen in pre-S wurde mittels der erwähnten Primer-Mutagenese erreicht. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen.

Tabelle 4-1 Übersicht zu verwendeten Primern bei der Klonierung rekombinanter pAdTrack-CMV-Konstrukte.

Rekombinantes pAdTrack-CMV-Konstrukt	Eingeführte Mutation (Nukleotidsequenz 5`-3`)	Aminosäure-Position der Mutation in DHBV L
pAd-DuL_Myr(-)	ggg → gcg	aa 2 (G → A) ^a
pAd-DuL_S118A	tcc → gcc	aa 118 (S → A)
pAd-DuL_S118D	tcc → gac	aa 118 (S → D)
pAd-DuL_R102P	cgt → cct	aa 102 (R → P) ^a
pAd-DuL_R102H	cgt → cat	aa 102 (R → H) ^a
pAd-DuL_RR71,72AA	agg aga → gcg gca	aa 71,72 (RR → AA)
pAd-DuL_RR71,72KK	agg aga → aag aaa	aa 71,72 (RR → KK) ^a
pAd-DuL_Δ71,72	Deletion, gga <u>agg aga</u> gta	R71,R72
pAd-DuL_Δ3-10	Deletion, ggg <u>caa cat cca gca</u> <u>aaa tca atg gac gtc</u>	Q3 bis D10
pAd-DuL_Δ11-18	Deletion, gac <u>gtc aga cgg ata</u> <u>gaa gga gga gaa ata</u>	V11 bis E18
pAd-DuL_Δ19-26	Deletion, gaa <u>ata ctg tta aac</u> <u>caa ctt gcc gga agg</u>	I19 bis G26
pAd-DuL_Δ27-34	Deletion, gga <u>agg atg atc cca</u> <u>aaa ggg act ttg aca</u>	R27 bis L34
pAd-DuL_Δ35-42	Deletion, ttg <u>aca tgg tca gcc</u> <u>aag ttt cca aca cta</u>	T35 bis T42
pAd-DuL_Δ43-50	Deletion, aca <u>cta gat cac gtg</u> <u>tta gac cat gtg caa</u>	L43 bis V50
pAd-DuL_Δ51-58	Deletion, gtg <u>caa aca atg gag</u> <u>gag ata aac acc ctc</u>	Q51 bis T58
pAd-DuL_Δ59-66	Deletion, acc <u>ctc cag aat cag</u> <u>gga gct tgg cct gct</u>	L59 bis W66
pAd-DuL_Δ67-74	Deletion, cct <u>gct ggg gcg</u> <u>gga agg aga gta gga tta</u>	A67 bis G74
pAd-DuL_Δ75-82	Deletion, gga <u>tta tca aat ccg</u> <u>act cct caa gag att</u>	L75 bis E82
pAd-DuL_Δ85-96	Deletion, cct <u>cag ccc cag tgg</u> <u>act ccc gag gaa gac caa aaa</u> <u>gca cgc</u>	Q85 bis A96
pAd-DuL_Δ101-109	Deletion, ttt <u>cgc cgt tat caa</u> <u>gaa gaa aga cca ccg gaa</u>	R101 bis P109
pAd-DuL_Δ110-117	Deletion, ccg <u>gaa acc acc</u> <u>acc att cct ceg tet tcc</u>	E110 bis S117
pAd-DuL_Δ118-125	Deletion, tct <u>tcc cct cct cag</u> <u>tgg aag cta caa ccc</u>	S118 bis Q125
pAd-DuL_Δ126-133	Deletion, caa <u>ccc ggg gac</u> <u>gat cca ctc ctg gga aat</u>	P126 bis G133
pAd-DuL_Δ134-141	Deletion, gga <u>aat cag tct ctc</u> <u>ctc gag act cat ccg</u>	N134 bis H141
pAd-DuL_Δ142-149	Deletion, cat <u>ccg cta tac cag</u> <u>tca gaa cca gcg gtg</u>	P142 bis A149
pAd-DuL_Δ150-157	Deletion, gcg <u>gtg cca gtg ata</u> <u>aaa act ccc ccc ttg</u>	V150 bis P157

^a Mutationen in pre-S lagen bereits im pCD0-Kontext vor. Die pre-S-Region wurde aus dem jeweiligen Plasmid herausamplifiziert und über BglII/KpnI in pAdTrack-CMV subkloniert.

In einer Folge von 2 PCR-Reaktionen (nach 4.3.2) wurde über sogenannte Aussenprimer, und die jeweilige Mutation-tragenden Innenprimer die in Tabelle 4-1 aufgelisteten Mutationen in pre-S eingeführt. Als Matrize diente das Plasmid pCD0. In der ersten PCR-Runde (PCR 1) entstanden durch Kombination des *forward* Aussenprimers und des *reverse* Innenprimers einerseits, sowie des *reverse* Aussenprimers und des *forward* Innenprimers andererseits, in 2 unabhängigen Ansätzen 2 Fragmente, welche aufgereinigt und in PCR 2 eingesetzt wurden.

Bezeichnung Oligonukleotid	Aussen- primer für PCR 1	Primer für PCR 2	Reverse Primer	Forward Primer	Eingeführte Schnittstelle	Position Alignment in pCD0 (5' - 3')
DpreSrevpcd0_2091	x		x		-	bp 2071-2091
DuLfor_pcd0_1044	x			x	-	bp 1044-1064
40148		x		x	BglII	bp 1233-1246
DupreSrevKpnI		x	x		KpnI	bp 1791-1811

In der nächsten PCR-Runde (PCR 2) entstanden in einem Ansatz durch Kombination der in PCR 1 entstandenen 2 Fragmente (pro Mutante) und einem Primerpaar, welches in der 5'-Region des Fragments eine BglII- und in der 3'-Region eine KpnI-Schnittstelle einführt, Amplifikate der gesamten pre-S Region mit insertierter Mutation. Die KpnI/BglII-verdauten PCR-Produkte konnten dann mit dem entsprechend verdauten Vektor pAdTrack-CMV-DuL ligiert und die so generierten rekombinanten pAdTrack-Konstrukte für eine Transformation von Dh5a *E.coli* eingesetzt werden.

4.2.4.5 Generierung von pAd-DuL_S118A, _S118D, _RR71,72KK und _Myr(-)

Alle vier Mutationen lagen bereits im pCD0-Kontext vor und konnten so jeweils für eine Amplifikation alleinig der pre-S-Region, welche die entsprechende Mutation trug, in die PCR eingesetzt werden¹⁷⁷. Durch die verwendeten Primer wurde im Amplifikat 5' jeweils eine BglII (Oligonukleotid: 40148), 3' eine KpnI-Schnittstelle (Oligonukleotid: DupreSrevKpnI) eingeführt. Das verdaute PCR-Produkt wurde dann mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pAdTrack-CMV_DuL ligiert.

4.2.4.6 Klonierung von *pAd_Dupre-S/HuS*

Die Klonierung des Konstrukts *pAdTrack-CMV-Dupre-S/HuS* hatte die Generierung eines L-Expressionsplasmids zum Ziel, von welchem die Synthese eines chimären L-Proteins erfolgen sollte. An die DHBV pre-S-Region sollte sich C-terminal die S-Domäne von HBV anschließen. Die entsprechenden Sequenzen wurden zunächst an 2 Plasmiden amplifiziert, bevor sie in einer zweiten PCR zu einem Leserahmen fusioniert wurden. In PCR 1 erfolgte die Amplifikation der DHBV pre-S-Region am Plasmid *pCD0*, die von HBV S an *pCDNA3.1/Zeo(-)-HBV1*. Beide Amplifikate wurden in PCR 2 mittels DHBV pre-S (Primer 40148) und HBV S (Primer: *Rev_HBV-S_NotI*) spezifischer Oligonukleotide zu einem chimären Leserahmen fusioniert, 5' wurde eine *BglIII*-, 3' eine *NotI*-Schnittstelle eingeführt, über die das finale Fragment dann mit dem entsprechend geschnittenen Vektor *pAdTrack-CMV* ligiert werden konnte. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht zu verwendeten Oligonukleotiden:

Bezeichnung Oligonukleotid	Ampl. Dupre-S	Ampl. HuS	Primer für PCR 1	Primer für PCR 2	Reverse Primer	Forward Primer	Eingeführte Schnittstelle	Position Alignment in <i>pCD0</i> bzw. <i>pCDNA3.1/Zeo(-)-HBV1.1</i> (5'-3')
DuLfor_ <i>pCD0</i> 1044	x		x			x	-	bp 1044-1064 <i>pCD0</i>
Rev-5' HuS/ 3' DpreS	x		x		x		-	bp 1777-1791 <i>pCD0</i>
For_5' HuS/ 3' DpreS		x	x			x	-	bp 2354-2374 <i>pCDNA3.1</i>
Rev_HuS_ <i>pCDNA3.1</i> 40148		x	x		x		-	bp 3014-3034 <i>pCDNA3.1</i>
				x		x	<i>BglIII</i>	bp 1233-1246

4.2.4.7 Klonierung von *pAd_HHBVL*

Der Leserahmen für das große Oberflächenantigen von HHBV wurde am Plasmid *pHHBV-4* amplifiziert²⁴. Über die Primer (forward Primer: *For_BglIII_HHBV-L*, reverse Primer: *Rev_NotI_HHBV-L*) wurde 5' zum ORF eine *BglIII*-, 3' zum Leserahmen eine *NotI*-Schnittstelle eingeführt, das Fragment und *pAdTrack-CMV* entsprechend verdaut und ligiert.

4.3 Analysen und Nachweisverfahren

4.3.1 Quantitativer Nachweis viraler DNA im DNA-Dotblot

Beschrieben durch Mason *et al.* (1982²⁷²), ist es möglich, die Konzentration DNA-haltiger DHBV-Partikel in einer Probe mittels DNA-Dotblot zu ermitteln. Eine vorherige Auftrennung der virushaltigen Probe in einem linearen CsCl-Stufengradienten ermöglicht des Weiteren eine Differenzierung umhüllter DNA-haltiger Viruspartikel von DNA-haltigen aber nicht-umhüllten Core-Partikeln anhand ihrer spezifischen Dichte⁹⁷. Verdünntes DHBV-haltiges Entenserum wurde hierfür auf ein in SW60-Röhrchen (Beranek) vorgelegten Gradienten geladen. Mit ansteigender Dichte wurden Lösungen folgender Dichte und Volumina direkt vor der Analyse vorsichtig übereinandergeschichtet:

	Lösung (Konzentration)	Volumen
OBEN	Probe	0,02 ml Serum ad 2 ml PBS
		2,00 ml (Kulturüberstand ohne Ankonzentrierung)
	Sucrose (20 %)	0,8 ml
	CsCl (1,2 g/ml)	0,5 ml
	CsCl (1,3 g/ml)	0,5 ml
UNTEN	CsCl (1,4 g/ml)	0,5 ml

Die Zentrifugation erfolgte bei 58000 rpm für 3,5 h bei 20 °C (SW-60 Rotor, Beckman Coulter, Inc.). Im Anschluss wurden die Proben mittels eines Fraktionssammlers (Beckman Coulter) à 6 Tropfen (ca. 180 µl) gewonnen.

Benötigte Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
SOAK I	0,5 M NaOH; 1-1,5 M NaCl
SOAK II	0,5 M Tris, pH 7,4; 3 M NaCl
Hybridisierungsmix	6 x SSC; 5 x Denhardt`s; 0,5 % SDS; 10 µg/ml CT-DNA
Denhardt`s (50 x)	1 % BSA; 1 % Polyvinyl-Pyrrolidon; 1 % Ficoll 400
Waschlösung	1 x SSC; 0,5 % SDS

Die Quantifizierung rekombinanter DHBV-Partikel nach einem analytischen CsCl-Gradienten basiert auf der Ermittlung des DNA-Gehalts der einzelnen Fraktionen. Für diese Analyse wurden die zuvor gesammelten Fraktionen komplett auf eine in einer Dotblot-Apparatur

(S&S-Minifold I Dotblot System, Schleicher und Schuell) eingespannte Nylonmembran (Nytran-N, Schleicher und Schuell) übertragen. Diese wurde zuvor je einmal mit 1 x PBS und 0,1 M NaOH gewaschen. Nach dem Probenauftrag wurde die Membran erneut einmal mit 0,1 M NaOH, danach zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die transferierte DNA einer Denaturierung in SOAK I für zweimal 90 sek unterzogen. Nach einer Renaturierung in SOAK II für viermal 60 sek wurde die Membran für mind. 30 min bei 90 °C gebacken und die DNA so fixiert. Für die Hybridisierung der so separierten und fixierten DNA mit einer DHBV-spezifischen ³²P-markierten Sonde wurden 25 ng des Plasmids pCD0-wt mit SacI verdaut, das in einem 3,3 kb Fragment entlassene DHBV-Genom aufgereinigt und dieses einer PCR-Reaktion mit 50 µCi α-³²P-dCTP (PerkinElmer) nach Angaben des Herstellers unterzogen (Megaprime-Labeling-Kit, GE Helathcare). Die radioaktive ³²P-DHBV-Sonde wurde in 20 ml Hybridisierungsmix gegeben und die Membran mit diesem bei 68 °C über Nacht inkubiert. Nach 2 Waschschritten in Waschlösung am Folgetag für je 15 min erfolgte die Exposition für 2 Tage. Die Detektion radioaktiver Signale auf dem Film erfolgte am Phosphorimager (Personal Molecular Imager FX, Biorad). Die Quantifizierung der einzelnen Fraktionen wurde im Programm *Quantity One* (Bio-Rad) in Relation zu einem parallel aufgetragenen DHBV-DNA Standard ausgewertet. Als Standard wurde ein 3 kb DHBV-Genom-Fragment in Konzentrationen von 500; 250; 125; 64; 32; 16 und 8 pg/50 µl eingesetzt, was 1,5x 10⁸ bis 2,5x10⁶ Teilchen pro *spot* entsprach.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der Regel wurde die Reaktion nach Standardprotokoll durchgeführt. Eine genauere Ermittlung der jeweiligen Oligonukleotidsequenz-spezifischen Annealingtemperatur erwies sich als nicht erforderlich. In einen 50 µl Gesamtansatz wurden 10 ng der Matrizen-DNA, 250 µM dNTPs, je 50 pmol der Oligonukleotide und 1 U Deep Vent_R DNA-Polymerase (3'-5'-Exonukleaseaktivität+, NEB) pipettiert. Die PCR-Zyklen wurden wie folgt eingestellt und in einem Mastercycler Personal (Eppendorf) durchgeführt.

Denaturierung: 95 °C → 5 min	} 33 Zyklen
Denaturierung: 95 °C → 30 sek	
Hybridisierung: 48 °C → 1 min	
Elongation: 72 °C → 3 min	
72 °C → 8 min	

Mit je 1 µl des Ansatzes wurde die Anwesenheit und Korrektheit der PCR-Produkte in einem analytischen Agarosegel überprüft.

4.3.3 Quantifizierung der Virsubindung an Zellen mittels qRT-PCR

4.3.3.1 Isolierung von DNA aus Zellen und Zellkulturüberständen nach Infektion

Um nach verschiedenen Inkubationszeiten die Assoziation von DHBV an PDHs zu quantifizieren, erfolgte zunächst eine Isolierung der DNA mittels des *NucleoSpin Blood kits* (Macherey und Nagel). Je nachdem ob es sich um Zellen oder Überstand bzw. Inokulum handelte wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

(1) Zellen → Schale einer 12-well-Platte

Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml PBS wurden zu jeder Schale 200 µl Puffer B3, 200 µl 1 x PBS und 25 µl Proteinase-K-Lösung gegeben. Bei mehreren Proben geschah dies in einem Sammelansatz. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Schale wurde mit 150 µl PBS nachgespült. Die Proben konnten an dieser Stelle bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Der Proteinase-K-Ansatz wurde dann für 40 min bei 56 °C inkubiert, dazwischen wurde 1-2 x gevortext. Zum Fällern der DNA wurden dann 200 µl eisgekühltes Ethanol (absolut) zum Ansatz pipettiert, kurz gevortext, kurz abzentrifugiert und dann der gesamte Ansatz auf ein Säulchen gegeben. Nach einer Zentrifugation bei 11000 rpm für 1 min wurde der Durchfluss verworfen, die Säule mit 500 µl Puffer BW gewaschen, erneut zentrifugiert (11000 rpm, 1 min) und der Durchfluss wieder verworfen. Nach einem analogen Durchgang mit Puffer B5 wurde restliche Flüssigkeit von der Säule entfernt und die DNA konnte eluiert werden. Die Säule wurde hierfür zweimal mit je 100 µl ddH₂O für je 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 2 min zentrifugiert.

(2) Zellkulturüberstand/Inokulum

Die Prozedur der DNA-Isolierung folgte prinzipiell dem in (1) beschriebenen Protokoll. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 200 µl und wurde zu Beginn nur mit Puffer B3 und Proteinase-K versetzt. Die Inkubation bei 56 °C konnte hier auf 15 min reduziert werden. Die DNA wurde ebenfalls in 200 µl ddH₂O eluiert. Die so aufgereinigte DNA konnte bei -20 °C gelagert werden oder stand direkt für eine Analyse mittels qPCR zur Verfügung.

4.3.3.2 Quantitative real-time PCR (TaqMan®)

Das in dieser Arbeit eingesetzte Echtzeit Taqman® qPCR-Verfahren basiert auf der Detektion der Ziel-DNA durch eine sequenzspezifische, fluoreszierende Sonde. Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 4-2 aufgelistet. Sie wurden so konstruiert, dass sie entweder innerhalb des DHBV *Pol*-Gens oder im S-Gen hybridisierten und kamen in Abhängigkeit vom Probenmaterial zum Einsatz: Adeno-transduzierte und gleichzeitig DHBV-infizierte Zellen wurden einer qRT-PCR mit einer Sonde unterzogen, welche im Pol-Gen bindet (Sonde 2). Bei Kompetitionsanalysen an untransduzierten PDHs kam eine Sonde zum Einsatz, welche im S-Gen hybridisiert (Sonde 1). Die Enden der Sonden (sogenannte *double-dye probe*) sind mit 2 verschiedenen Fluorophoren markiert, mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende (= FAM) und einem Quencher am 3'-Ende (=TAMRA). Während des ungebundenen Zustands der Sonde oder aber nach der DNA-Assoziation der Sonde und vor Einsetzen der Polymeraseaktivität, wird Energie, welche vom kurzwelligen Fluorophor (= Reporter) emittiert wird, ohne Emission eines Protons zum langwelligen Fluorophor (= Quencher) transferiert (= FRET). Die 5'-3'-Exo-Nuklease-Aktivität der Polymerase resultiert dann in einer Separation der beiden Fluorophore, welche wiederum eine Emission seitens des Reporter-Fluorophors zur Folge hat. Die Quantifizierung erfolgt anhand der Detektion dieses Fluoreszenzsignals, welches proportional mit der Menge der amplifizierten DNA im Laufe der Zyklen zunimmt und in einem bestimmten Zyklus der PCR eine Intensität erreicht, die über einem definierten Hintergrund bzw. Schwellenwert liegt (= *threshold cycle* = CT). An diesem Punkt der exponentiellen Phase findet die Detektion statt. Ein entsprechendes Programm zeichnet das Signal auf und gibt es in einer Amplifikationskurve wieder. Eine Verdünnungsreihe des Plasmids pCD0 diente als externer Standard und wurde in jeder PCR mitgeführt. Dies erlaubte die Erstellung einer Standardkurve (Abbildung 4-2) und die absolute Quantifizierung der DNA im Probenmaterial.

Tabelle 4-2 In der real-time PCR verwendete TaqMan®-Sonden und Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Name	Sequenz (5'-3')	X-mer	Position (bp) in pCD0-wt
Sonde_1	dHBVTaqMan	tgagaccgacgccattggagc	22	2130-2109
Hin-Oligo_1	dhbv-1_for	gcttgctgtatctgacggacaa	22	2066-2087
Rück-Oligo_1	dhbv-2_rev	gatccgagggcagtagtgaaga	22	2170-2149
Sonde_2	dHBVTaqMan_2	tgactccagccaaattctggccca	24	1075-1098

Hin-Oligo_2	DHBV_Taq2_for	tgagtgccttcccga	18	1046-1063
Rück-Oligo_2	DHBV_Taq2_rev	ctggacaggaaagtaggaaatgct	24	1124-1101

Sonde_1 wurde in Kombination mit dem Hin- und- Rück-Oligo_1, Sonde_2 mit den entsprechenden Oligos_2 verwendet. Während die Zielsequenz von Sonde_1 im Gen für S liegt, hybridisiert Sonde_2 im Pol-Gen, in einer Sequenz zwischen dem core- und dem L-Gen. Die Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL bezogen.

Tabelle 4-3 Pipettierter Ansatz pro DNA-Probe.

Reagenz	Konzentration Stock	Volumen pro 25 µl Ansatz	Finale Konzentration
QPCR-Mix	2 x	12,5 µl	1x
Oligo Hin	100 pmol/µl	0,15 µl	15 pmol
Oligo Rück	100 pmol/µl	0,15 µl	15 pmol
Sonde	100 pmol/µl	0,75 µl	75 pmol
dH ₂ O		7,45 µl	
Probe		4 µl	

Der QPCR-Mix (ABsolute QPCR Rox Mix) wurde von der Firma ABgene bezogen.

Die PCR-Reaktion wurde in einem ABI Prism 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) durchgeführt. Wie aus Tabelle 4-3 ersichtlich, wurden in jede Reaktion 4 µl der jeweiligen Probe bzw. 1/50 der Probe aus der DNA-Isolierung (siehe 4.3.3.1) pipettiert, was dem Äquivalent von 4×10^4 Zellen oder 10 µl Kulturmedium entspricht. Als Negativkontrollen dienten Wasser und analog gereinigte Hepatozyten-DNA aus Proben ohne Zusatz von Virusinokulum. In diesen Ansätzen konnte kein Wert definiert werden, was bedeutet, dass der jeweilige Wert unter der Nachweisgrenze lag (Daten nicht gezeigt). Für die PCR wurden folgende Einstellungen gewählt:

Schritt	Temperatur	Zeit (min)	Anzahl Zyklen
1	50°C	2 min	1x
2	95°C	15 min	1x
3	95°C	15 sek	40x
4	60 °C	60 sek	
5	72°C	60 sek	

Die Analyse der Messdaten erfolgte mit der entsprechenden ABI PRISM 7000 SDS *software* und die Auswertung mit Excel (Microsoft). In SigmaPlot 10.0 (SigmaPlot) und GraphPad

Prism 5 (5.00) (GraphPad) wurden die Ergebnisse graphisch umgesetzt und gegebenenfalls statistisch ausgewertet. Als DNA-Standard für die qRT-PCR diente das mit *EcoRI* linearisierte Plasmid pCD0-wt (6291 bp), das ein 1,1-faches DHBV Überlänge genom enthält (Bartenschlager 1990). Die Stock-Lösung enthielt 1×10^{10} Teilchen pro μl und wurde in ddH₂O in eine Verdünnungsreihe mit 1×10^8 - 1×10^{10} Teilchen/ 25 μl -Ansatz eingesetzt. Für jeden PCR-Lauf wurde die Reihe, im Doppel- oder Dreifachansatz, neu pipettiert und analysiert.

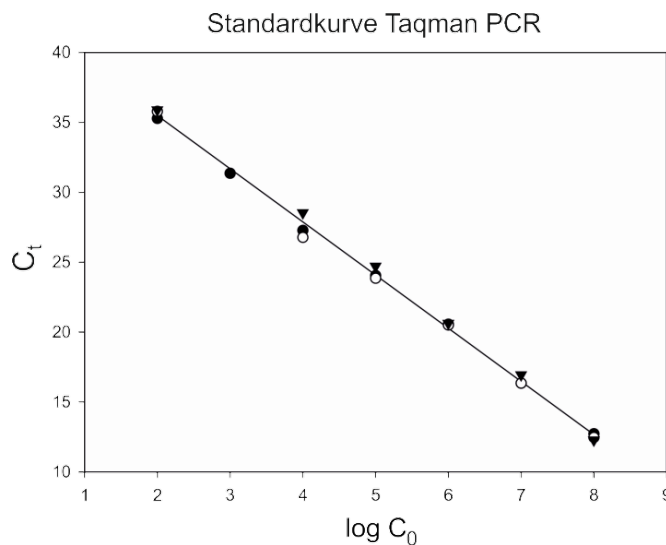


Abbildung 4-2 Regressionsgerade zum DNA-Standard einer exemplarischen qRT-PCR-Analyse.

Messdaten entstammen der PCR-Analyse zur Suraminkinetik in 2.4.1. Der jeweilige C_t-Wert (=threshold cycle) ist gegen den dekadischen Logarithmus der Ausgangsmenge an DHBV-Genomen aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient (R²) beträgt 0,997. Für die Detektion wurde eine S-Gen-spezifische Sonde verwendet, das PCR-Produkt hat eine Länge von 105 bp.

4.3.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Nach dem Subklonieren des gewünschten DNA-Konstrukts wurde dessen Richtigkeit in der Sequenz durch eine modifizierte Weise der biochemischen Didesoxy- oder Kettenabbruch-Sequenzierungsmethode von F. Sanger *et al.* (1977²⁷³) überprüft. Genutzt wurde hier der *Big Dye-Mix*[®] (Applied Biosystems), welcher neben dem definierten Puffer und der Taq-Polymerase auch einen dNTP-Mix und die fluorchrom-gekoppelten Terminatoren der Reaktion enthält. Pro Ansatz wurden 200 ng mit Big Dye v1.1 (Applied Biosystems) und 5 pmol des spezifischen Oligonukleotids versetzt. Die Amplifikation erfolgte dann im Thermo-Cycler in 30 Zyklen: 95 °C → 10 sek, 55 °C → 15 sek, 60 °C → 4 min → die Reaktion wurde dann auf 4 °C gehalten. Die Sequenz der gefällten und in HiDi-Formamid aufgenommenen DNA wurde im *Genetic Analyzer* (ABI PRISM™ 310) analysiert, wobei die von einem Laser angeregten Fluoreszenzsignale hierbei von einem Detektorsystem gelesen und dann durch ein entsprechendes Programm in Chromatogrammform dargestellt wurden. Alternativ wurde die zu analysierende DNA mit einer Konzentration von 30-100 ng/ μl zu GATC Biotech versendet.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970²⁷⁴)

Für die Analyse der Expression adenoviral transduzierter Gene wurden Zellen zum jeweils angegebenen Zeitpunkt nach Transduktion mit PBS gewaschen und in einem Volumen von 400 µl (12-well) (250 µl 2xSDS-Probenpuffer, 150 µl PBS) aufgenommen, aufgeköcht, und dann neben einem Protein-Standard-Marker (Amersham Rainbow Molecular Weight Markers, RPN 755 (low) 2 500-45 000 Da, RPN 756 (high) 14 300-220 000 Da, GE Healthcare Life Science; Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard 3 500 – 260 000 Da, Life Technologies) auf das Gel geladen. 20 µl des Zelllysats wurden standardmäßig pro Gelspur aufgetragen, was 5×10^4 Zellen eines wells (1×10^6 Zellen/12-well) entsprach. Für das elektrophoretische Trennverfahren wurde das *Mighty Small*-System von Hofer genutzt. Je nach Molekulargewicht wurde die Prozentigkeit des Trenngels variiert, betrug in der Regel aber 12 oder 15 %. In einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) erfolgte dann der Transfer in Bjerrum-Schafer-Nielsen-Puffer im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Protran®, Schleicher und Schuell) für 30 min bei einer Spannung von 15 V.

4.4.2 Western Blot Analyse

Nach erfolgter Separation eines Proteingemisches mittels SDS-Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulose wurde die Membran zum Abblocken unspezifischer Bindestellen in Blocklösung (5 % (w/v) Magermilchpulver/ TBS-Tween-20 (0,05 %)) inkubiert, dann erfolgte eine Inkubation mit spezifischen primären Antiseren bzw. Hybridomüberständen für mind. 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, um sie dann mit Enzym- oder Alexa-gekoppelten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur zu inkubieren. Beide Antikörpertypen wurden in Blocklösung angesetzt. Die Detektion wurde im Falle eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers mit ECL (*Enhanced Chemiluminescence System*) gewährleistet. Für die Detektion und die quantitative Auswertung im Falle der IRDye-680 oder -800 gekoppelten Zweitantikörper wurde das *Odyssey Infrared Imaging System* von LICOR verwendet.

4.5 Immunfluoreszenzanalyse

Um die Expression eines Proteins auf Einzelzellebene zu analysieren, wurde zur Detektion des entsprechenden Antigens eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA) durchgeführt. Verschiedene Zelltypen als auch verschiedene Antigene wurden der Analyse unterzogen und falls nicht anders vermerkt, wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Benötigte Puffer/ Lösungen	Anwendung
4 % Paraformaldehyd (PFA)	Fixierung
2 % BSA/ PBS + 0,25 % Triton-X	Blocklösung
2 % BSA/ PBS + 0,25 % Triton-X	Erstantikörper-Lösung
PBS/ 0,25 % Triton-X	Waschpuffer
2 % BSA/ PBS	Zweitantikörper-Lösung
VectaShield, Entellan, Fluoromount G	Einbettmedium
DAPI	Kernfärbung

Fixierung der Zellen

Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen in 12-well Platten dreimal mit 1 x PBS gewaschen. In je 0,5 ml 4 % PFA wurden die Zellen während einer 20 minütigen Inkubation bei RT fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen konnten die Platten in PBS bei 4 °C bis zum weiteren Vorgehen gelagert werden.

Antikörperinkubation und Einbetten der Zellen

Freie und unspezifische Bindestellen wurden durch eine Inkubation in Blocklösung für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Um eine gleichmäßige Verteilung der jeweiligen Lösung auf dem Zellrasen zu erlauben, erfolgten alle Inkubationen auf einem Schüttler. Der jeweilige Erstantikörper wurde entsprechend der Tabelle in 1.1.1 in Erstantikörper-Lösung verdünnt, in einem Volumen von 300 µl pro *well* auf die Zellen gegeben und für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Entsprechend dem Erstantikörper wurde der speziesspezifische Fluoreszenz-konjugierte-Zweitantikörper ausgewählt, in einem Volumen von 350 µl, verdünnt in Zweitantikörper-Lösung, auf die Zellen pipettiert und diese für mindestens 1,5 h bei RT inkubiert. Parallel wurden die Zellkerne mit DAPI (100 mg/ml, Roche) eingefärbt. Befanden sich die Zellen auf *coverslips* wurden sie dann mittels Entellan® (Merck Millipore) oder Fluoromount-G (Southern Biotechnology Assoc.) eingebettet. Die

Analyse erfolgte an einem Invers-Fluoreszenzmikroskop (Leica, DM IRB), die graphische Auswertung im Programm SPOT Advanced (SPOT Imaging Solutions). Eingebettete Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop Leica CR Mic und dem Programm Leica FW4000 analysiert. Die Aufnahmen erfolgten bei maximaler Fluoreszenz nach unterschiedlichen Belichtungszeiten und Vergrößerungen.

Quantifizierungsmethode in der Immunfluoreszenzanalyse

Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden in Form von Bilddateien festgehalten, so dass im Anschluss eine manuelle Quantifizierung unterstützt vom Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* erfolgen konnte. Die Transgenexpression (L und GFP) wurde via GFP-Autofluoreszenz detektiert, DHBV-infizierte PDHs wurden indirekt mit einem polyklonalen α -Core Primärantikörper (Liste Antikörper unter 1.1.1) nachgewiesen. Infektions- und Transduktionsraten wurden über die jeweilige Gesamtzellzahl (Zählen DAPI-gefärbter Zellkerne) pro Schale ermittelt. Das Auszählen erfolgte manuell, unterstützt vom Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ*. Pro Ansatz wurden in der Regel 10-30 mikroskopische Bilddateien und insgesamt 1 065-22 800 Zellen ausgewertet. Für die Quantifizierung superinfizierter Zellen, d.h. Zellen, die zugleich Core-, als auch GFP-positiv waren, wurden softwareunterstützt korrespondierende Bilddateien aus der mikroskopischen Analyse von Transduktions- und Infektionsereignissen übereinandergelegt und dann ausgewertet, d.h. doppelt infizierte Zellen ausgezählt.

5 Anhang

5.1 Statistik zu den Titrationsstudien aus Abschnitt 2.2

Die Regressionsanalysen wurden im Programm Prism 5 (5.00), GraphPad durchgeführt.

5.1.1 Regressionsanalyse zu den Infektionskontrollen aus Titrationsanalyse 1

Die Schwankungsbreite bei Infektionen von PDHs, die einer Leberzellpräparation entstammen aber auf unterschiedlichen Zellkulturplatten ausgesät und infiziert wurden, wurde untersucht (2.2.1) und statistisch bewertet. Zellen der Kontrolle 1 befanden sich auf der Zellkulturplatte, die mit Ad-GFP transduziert wurde, wobei die Kontrollzellen mit DHBV infiziert wurden, ohne zuvor transduziert worden zu sein. Mit Zellen der Kontrolle 2 wurde analog verfahren, sie befanden sich auf der entsprechenden Ad-DuL-Platte. Nachfolgende Tabellen geben die statistischen Kennwerte der Analyse wieder. Die Auswertung (siehe Kasten) weist aus, dass sich beide Datensätze nicht signifikant unterscheiden und daher eine Darstellung der Infektionseffizienz in Abhängigkeit von der DHBV-Konzentration im Inokulum als gemeinsame Regression (linear bzw. nichtlinear) für beide Kontrollen das präferierte Modell ist (siehe Graphiken unten und Abbildung 2-7).

Lineare Regression

	Kontrolle_1	Kontrolle_2
Best-fit values		
Slope	0.06200 ± 0.008485	0.08420 ± 0.0001447
Y-intercept when X=0.0	1.832 ± 0.6250	0.6178 ± 0.01066
X-intercept when Y=0.0	-29,54	-7,337
1/slope	16,13	11,88
95% Confidence Intervals		
Slope	-0.04581 to 0.1698	0.08237 to 0.08604
Y-intercept when X=0.0	-6.109 to 9.772	0.4824 to 0.7533
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 64.38	-9.091 to -5.640
Goodness of Fit		
r²	0,9816	1,000
Sy.x	0,7715	0,01316

Is slope significantly non-zero?

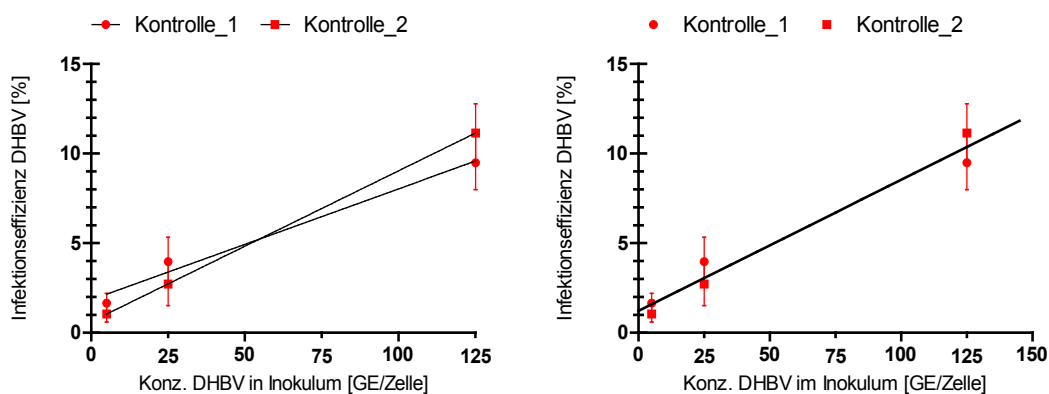
F	53,39	338600
DFn, DFd	1.000, 1.000	1.000, 1.000
P value	0,0866	0,0011
Deviation from zero?	Not Significant	Significant

Data

Number of X values	3	3
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	3	3
Number of missing values	16	16

Runs test

Points above line	1	2
Points below line	2	1
Number of runs	3	3
P value (runs test)	1,0000	1,0000
Deviation from linearity	Not Significant	Not Significant

Tabelle_Kennwerte der Regressionsanalyse (linear) zu den Kontrollinfektionen 1 und 2.

Graphiken: Präsentation der Daten zu den Kontrollinfektionen 1 und 2 als separate (links) und gemeinsame (rechts) lineare Regression.

Are lines different?

Are the slopes equal?

$F = 6.8473$. $DF_n=1$ $DF_d=2$

$P=0.1203$

If the overall slopes were identical, there is a 12% chance of randomly choosing data points with slopes this different. You can conclude that the differences between the slopes are not significant.

Since the slopes are not significantly different, it is possible to calculate one slope for all the data. The pooled slope equals 0.0731007

Are the elevations or intercepts equal?

$F = 0.00752314$. $DF_n=1$ $DF_d=3$

$P=0.9363$

If the overall elevations were identical, there is a 94% chance of randomly choosing data points with elevations this different. You can conclude that the differences between the elevations are not significant. Since the Y intercepts are not significantly different, it is possible to calculate one Y intercept for all the data. The pooled intercept equals 1.22471

Nichtlineare Regression

	Kontrolle 1 GFP Platte	Kontrolle 2 DuL Platte	Global (shared)
Comparison of Fits			
Null hypothesis			One curve for all data sets
Alternative hypothesis			Different curve for each data set
P value			0,1884
Conclusion (alpha = 0.05)			Do not reject null hypothesis
Preferred model			One curve for all data sets
F (DFn, DFd)			4.307 (2,2)
Different curve for each data set			
Best-fit values			
BMAX	13,74	41,70	
KD	56,87	343,0	
Std. Error			
BMAX	2,099	25,56	
KD	21,12	281,3	

95% Confidence Intervals

BMAX	-12.92 to 40.41	-283.1 to 366.5
KD	-211.5 to 325.3	-3232 to 3917
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	1	1
R ²	0,9893	0,9963
Absolute Sum of Squares	0,3458	0,2152
Sy.x	0,5880	0,4639

One curve for all data sets

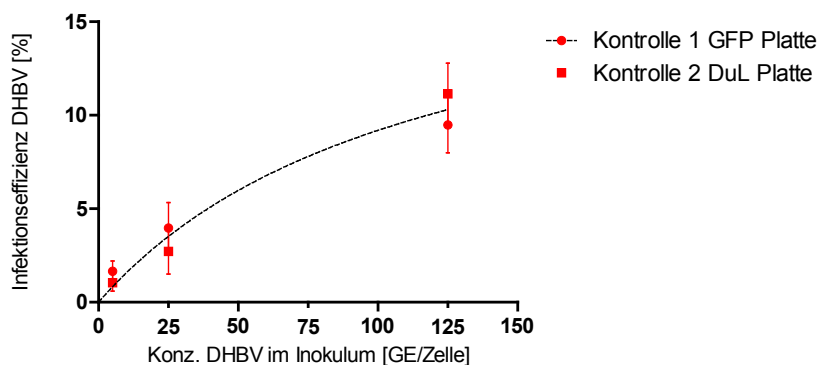
Best-fit values

BMAX	19,90	19,90	19,90
KD	116,6	116,6	116,6
Std. Error			
BMAX	5,430	5,430	5,430
KD	59,81	59,81	59,81
95% Confidence Intervals			
BMAX	4.827 to 34.98	4.827 to 34.98	4.827 to 34.98
KD	-49.44 to 282.6	-49.44 to 282.6	-49.44 to 282.6

Goodness of Fit

Degrees of Freedom			4
R ²	0,9517	0,9759	0,9673
Absolute Sum of Squares	1,565	1,413	2,977
Sy.x			0,8627
Constraints			
BMAX	BMAX is shared	BMAX is shared	
KD	KD is shared	KD is shared	
Number of points			
Analyzed	3	3	

Tabelle_Kennwerte der Regressionsanalyse (nichtlinear) zu den Kontrollinfektionen 1 und 2.



Graphik: Nichtlineare Regression zur Analyse der Kontrollinfektionen 1 und 2.

5.1.2 Regressionsanalysen zur Abhängigkeit der Infektionseffizienz von der Rate Ad-GFP- und Ad-DuL-transduzierter Zellen

Die Auswertung betrifft die Titrationsstudien in Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3. PDHs waren mit ansteigendem Titer Adenoviren (Ad-GFP bzw. Ad-DuL) transduziert und mit DHBV (5, 25 bzw. 125 GE/Zelle) überinfiziert worden. Der Einfluss beider Adenovirustypen wurde in jeweils 2 unabhängigen und analog durchgeführten Studien (V1 und V2) untersucht und der Einfluss der jeweiligen Transduktionsrate auf die resultierende Infektionseffizienz statistisch bewertet. Die Auswertung erfolgte analog zu der unter 5.1.1 gezeigten Analyse.

Regressionsanalyse zu Studie 1 (Ad-GFP):

DHBV-Titer (GE/ml)	5	25	125
Best-fit values			
Slope	2.020 ± 0.6666	-0.4121 ± 1.152	-0.7798 ± 1.963
Y-intercept when X=0.0	1.266 ± 0.4124	3.306 ± 0.7127	8.349 ± 1.215
X-intercept when Y=0.0	-0,6267	8,022	10,71
1/slope	0,4951	-2,426	-1,282
95% Confidence Intervals			
Slope	-0.8486 to 4.888	-5.368 to 4.544	-9.228 to 7.668
Y-intercept when X=0.0	-0.5089 to 3.040	0.2395 to 6.373	3.122 to 13.58
X-intercept when Y=0.0	-infinity to 0.1213	0.9510 to +infinity	1.282 to +infinity
Goodness of Fit			
r ²	0,8211	0,06016	0,07312
Sy.x	0,4949	0,8552	1,458
Is slope significantly non-zero?			
F	9,180	0,1280	0,1578
DFn, DFd	1.000, 2.000	1.000, 2.000	1.000, 2.000
P value	0,0938	0,7547	0,7296
Deviation from zero?	Not Significant	Not Significant	Not Significant
Data			
Number of X values	4	4	4
Maximum number of Y replicates	1	1	1
Total number of values	4	4	4
Number of missing values	0	0	0

Runs test

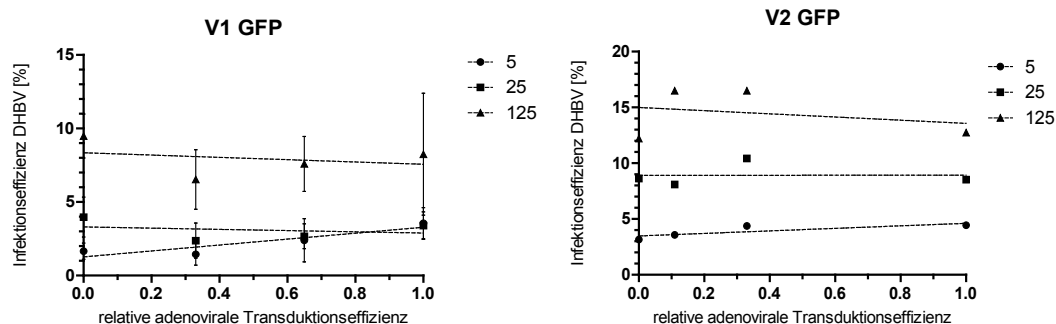
Points above line	2	2	2
Points below line	2	2	2
Number of runs	3	3	3
P value (runs test)	0,6667	0,6667	0,6667
Deviation from linearity	Not Significant	Not Significant	Not Significant

Tabelle_Kennwerte der Regressionsanalyse zur Titrationsstudie 1 an Ad-GFP-transduzierten Zellen (V1 Ad-GFP).

Regressionsanalyse zu Studie 2 (Ad-GFP):

DHBV-Titer (GE/ml)	5	25	125
Best-fit values			
Slope	1.134 ± 0.5839	0.02458 ± 1.629	-1.426 ± 3.538
Y-intercept when X=0.0	3.477 ± 0.3091	8.904 ± 0.8626	14.99 ± 1.873
X-intercept when Y=0.0	-3,066	-362,2	10,52
1/slope	0,8817	40,68	-0,7015
95% Confidence Intervals			
Slope	-1.378 to 3.647	-6.987 to 7.036	-16.65 to 13.80
Y-intercept when X=0.0	2.147 to 4.807	5.193 to 12.62	6.936 to 23.05
X-intercept when Y=0.0	-infinity to -0.6562	-infinity to -0.8461	1.147 to +infinity
Goodness of Fit			
r ²	0,6536	0,0001138	0,07510
Sy.x	0,4532	1,265	2,746
Is slope significantly non-zero?			
F	3,774	0,0002276	0,1624
DFn, DFd	1.000, 2.000	1.000, 2.000	1.000, 2.000
P value	0,1915	0,9893	0,7260
Deviation from zero?	Not Significant	Not Significant	Not Significant
Data			
Number of X values	4	4	4
Maximum number of Y replicates	1	1	1
Total number of values	4	4	4
Number of missing values	0	0	0
Runs test			
Points above line	1	1	2
Points below line	3	3	2
Number of runs	3	3	3
P value (runs test)	1,0000	1,0000	0,6667
Deviation from linearity	Not Significant	Not Significant	Not Significant

Tabelle_Kennwerte der Regressionsanalyse zur Titrationsstudie 2 an Ad-GFP-transduzierten Zellen (V2 Ad-GFP).



Graphiken: Regressionen zu den Studien 1 und 2 Ad-GFP-transduzierter und DHBV-infizierter PDHs.

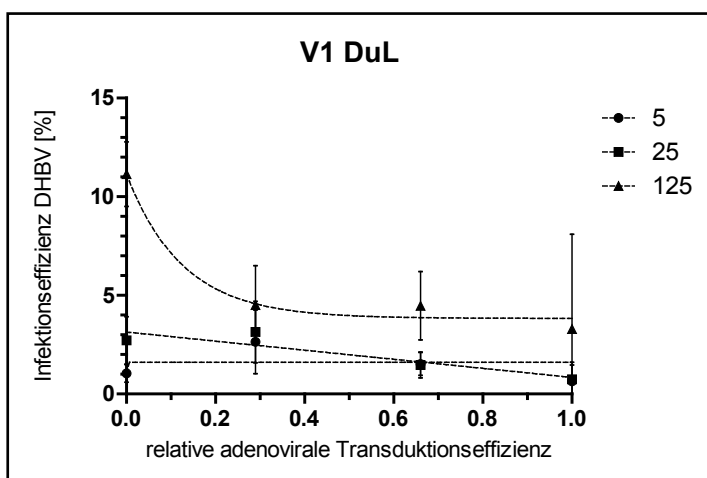
Regressionsanalyse Studie 1 (Ad-DuL):

DHBV-Titer (GE/ml)	5	25	125
Best-fit values			
Slope	-0.7704 ± 1.294	-2.298 ± 0.7603	-6.787 ± 3.255
Y-intercept when X=0.0	1.842 ± 0.7973	3.136 ± 0.4686	9.163 ± 2.006
X-intercept when Y=0.0	2,391	1,365	1,350
1/slope	-1,298	-0,4352	-0,1474
95% Confidence Intervals			
Slope	-6.337 to 4.796	-5.570 to 0.9735	-20.79 to 7.220
Y-intercept when X=0.0	-1.589 to 5.273	1.119 to 5.153	0.5294 to 17.80
X-intercept when Y=0.0	-infinity to	0.7279 to +infinity	0.5581 to +infinity
Goodness of Fit			
r^2	0,1506	0,8204	0,6849
$S_{y.x}$	0,9758	0,5735	2,456
Is slope significantly non-zero?			
F	0,3547	9,136	4,347
DFn, DFd	1.000, 2.000	1.000, 2.000	1.000, 2.000
P value	0,6119	0,0942	0,1724
Deviation from zero?	Not Significant	Not Significant	Not Significant
Data			
Number of X values	4	4	4
Maximum number of Y replicates	1	1	1
Total number of values	4	4	4
Number of missing values	0	0	0

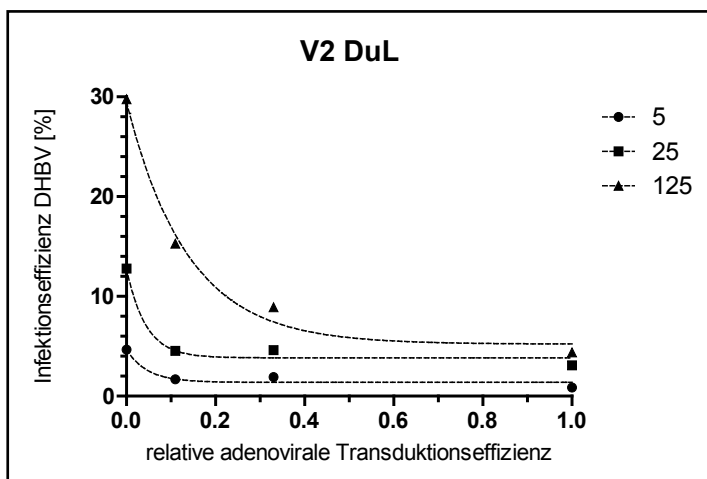
Runs test

Points above line	2	1	2
Points below line	2	3	2
Number of runs	3	3	3
P value (runs test)	0,6667	1,0000	0,6667
Deviation from linearity	Not Significant	Not Significant	Not Significant

Tabelle_Kennwerte der Regressionsanalyse zur Titrationsstudie 1 an Ad-DuL-transduzierten Zellen (V1 Ad-DuL).



Graphik: Regressionen Studie 1 zur Infizierbarkeit Ad-DuL-transduzierter PDHs. Während sich die Daten, die aus Infektionen mit 5 bzw. 25 DHBV GE/ml resultierten, besser in Form linearer Regressionen darstellen ließen, war für die Infektion mit höherem DHBV-Titer (125 GE/ml) eine nichtlineare Regression optimal.



Graphik: Regressionen Studie 2 zur Infektionseffizienz Ad-DuL-transduzierter PDHs.

Regressionsanalyse Studie 2 (Ad-DuL):

DHBV-Titer (GE/ml)	5	25	125
One-phase association			
Best-fit values			
Y0	4,653	12,80	29,49
PLATEAU	1,385	3,841	5,213
K	21,18	22,97	7,242
Tau	0,04721	0,04353	0,1381
Half-time	0,03272	0,03017	0,09571
Span	-3,268	-8,956	-24,28
Std. Error			
Y0	0,7372	1,083	1,907
PLATEAU	0,5284	0,7730	1,751
K	25,42	16,60	1,926
Span	0,9065	1,330	2,493
95% Confidence Intervals			
Y0	-4.715 to 14.02	-0.9660 to 26.56	5.264 to 53.72
PLATEAU	-5.329 to 8.098	-5.981 to 13.66	-17.03 to 27.46
K	0.0 to 344.2	0.0 to 233.9	0.0 to 31.71
Tau			
Half-time			
Span	-14.79 to 8.250	-25.86 to 7.946	-55.96 to 7.399
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	1	1	1
R ²	0,9329	0,9799	0,9899
Absolute Sum of Squares	0,5435	1,173	3,706
Sy.x	0,7372	1,083	1,925
Constraints			
K	K > 0.0	K > 0.0	K > 0.0
Number of points			
Analyzed	4	4	4

Tabelle_Kennwerte der Regressionsanalyse zur Titrationsstudie 2 an Ad-DuL-transduzierten Zellen (V2 Ad-DuL).

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Phylogenetischer Stammbaum der Avihepadnaviren.	4
Abbildung 1-2 Morphologie und Aufbau von Virionen und subviralen Partikeln von HBV und DHBV.	5
Abbildung 1-3 Genomorganisation von HBV und DHBV.	7
Abbildung 1-4 Hüllproteine von HBV und DHBV.	11
Abbildung 1-5 Duale Topologie und Funktion von DHBV pre-S.	12
Abbildung 1-6 Schematische Darstellung des hepadnaviralen Replikationszyklus.	15
Abbildung 1-7 Schematische Darstellung funktioneller pre-S Subdomänen im DHBV L-Protein.	21
Abbildung 1-8 Schematische Präsentation von gp180/duCPD.	21
Abbildung 2-1 Schematischer Aufbau der Expressionskassetten für DHBV L und GFP im AdEasy-Vektor.	26
Abbildung 2-2 Detektion der Expression von L und GFP in transduzierten PDHs.	27
Abbildung 2-3 Koexpression von L und GFP in Ad-DuL-transduzierten PDHs.	28
Abbildung 2-4 Kinetik der L-Proteinexpression in PDHs.	29
Abbildung 2-5 Titrationsanalyse zur Abhängigkeit der Infizierbarkeit von PDHs von der Quantität L- bzw. GFP-exprimierender Zellen.	31
Abbildung 2-6 Die Expression von L, nicht aber die des Reporterproteins oder die adenovirale Transduktion, limitiert signifikant die Infizierbarkeit von PDHs.	33
Abbildung 2-7 Die Suszeptibilität von PDHs einer Zellcharge weist keine signifikanten Schwankungen auf.	33
Abbildung 2-8 Die L-Expression beeinträchtigt konzentrationsabhängig eine nachfolgende Infektion.	36
Abbildung 2-9 Versuchsaufbau zur quantitativen Analyse der Superinfizierbarkeit L-exprimierender PDHs.	39
Abbildung 2-10 Etablierung einer Methode zur Quantifizierung DHBV-superinfizierter PDHs.	40
Abbildung 2-11 Ad-GFP-transduzierte PDHs zeigen eine maximale Akzeptanz für eine Superinfektion.	42
Abbildung 2-12 Die Expression von L resultiert in einem Verlust der Akzeptanz der Zellen für eine Superinfektion.	45
Abbildung 2-13 Die L-Protein vermittelte SIR wird schon früh nach der Genexpression etabliert.	47
Abbildung 2-14 Quantitative Analyse zur hemmenden Wirkung von Suramin auf die Zellbindung und Infektion von DHBV.	52
Abbildung 2-15 Untersuchung zur Kinetik der inhibitorischen Wirkung von Suramin auf die DHBV-Infektion.	55
Abbildung 2-16 Die Expression von DHBV-L hat keinen negativen Einfluss auf die Assoziation von DHBV an PDHs.	57
Abbildung 2-17 DHBV S-exprimierende PDHs tolerieren eine nachfolgende Überinfektion mit DHBV.	59
Abbildung 2-18 Schematischer Überblick über die eingeführten Mutationen in pre-S.	62
Abbildung 2-19 Die Myristoylierung von pre-S hat keinen Einfluss auf die L-Protein-vermittelte SIR.	64
Abbildung 2-20 Die Eliminierung der Phosphorylierung an Ser118 resultiert im Wildtyp SIA-Phänotyp.	67
Abbildung 2-21 Ein proteolytischer Verdau des L-Proteins an der putativen Schnittstelle RR71,72 spielt keine Rolle im Ausschluss einer DHBV-Superinfektion.	70
Abbildung 2-22 Expressionsanalyse der adenoviralen L-Konstrukte mit Punktmutationen bzw. Deletionen in der duCPD-Binderegion (aa 30-115) von pre-S.	74

Abbildung 2-23 Reste in der stabilisierenden Region der duCPD-Binderegion von pre-S sind nicht verantwortlich für die Etablierung der SIR.....	76
Abbildung 2-24 Eine duCPD/pre-S-Interaktion ist für den SIR-Mechanismus nicht notwendig.....	78
Abbildung 2-25 Expressionsanalyse von L-Mutanten mit 8-aa-Deletionen in der Matrixdomäne von pre-S.	80
Abbildung 2-26 Die Interaktion von viralem Kapsid und L-Protein ist essentiell für den Ausschluss einer Superinfektion.	82
Abbildung 2-27 Deletionen im N-terminalen Bereich von pre-S resultieren in einer signifikant erhöhten SIA...	84
Abbildung 2-28 Die zelluläre Expression des chimären DHBV/HBV L- Konstrukts.	87
Abbildung 2-29 Analyse der Superinfektionsakzeptanz Dupre-S/HuS-exprimierender Hepatozyten.	88
Abbildung 2-30 Trypsinschutzversuch zur Studie der Topologie der L-Chimäre Dupre-S/HuS.....	89
Abbildung 2-31 Sequenzvergleich der großen Hüllproteine von HHV und DHBV.	91
Abbildung 2-32 DHBV-L kann im Vermitteln der SIR nicht durch das Hüllprotein vom Graureiher HBV substituiert werden.....	93
Abbildung 3-1 Lokalisation der SIR-Determinante in DHBV pre-S.	123
Abbildung 3-2 Modell zum SIR-Mechanismus.	124
Abbildung 4-1 Schema zur Funktionsweise des AdEasy-Systems.	141
Abbildung 4-2 Regressionsgerade zum DNA-Standard einer exemplarischen qRT-PCR-Analyse.....	152

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Übersicht zu Avi- und Orthohepadnaviren und ihren Wirten.	3
Tabelle 4-1 Übersicht zu verwendeten Primern bei der Klonierung rekombinanter pAdTrack-CMV-Konstrukte.	144
Tabelle 4-2 In der <i>real-time</i> PCR verwendete TaqMan®-Sonden und Oligonukleotide.	150
Tabelle 4-3 Pipettierter Ansatz pro DNA-Probe.	151

6 Literaturverzeichnis

1. Ganem, D. and Schneider, R. *Fields Virology*. Vol. 2, pp. 2923-2971, (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001).
2. Hollinger, F.B. and Liang, T.J. *Fields Virology*. Vol. 2, pp. 2971-3036, (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001).
3. Beasley, R. P. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61, 1942–1956 (1988).
4. Ganem, D. & Prince, A. M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med* 350, 1118–1129 (2004).
5. Chisari, F. V. & Ferrari, C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 29–60 (1995).
6. McAleer, W. J. *et al.* Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307, 178–180 (1984).
7. Beasley, R. P., Trepo, C., Stevens, C. E. & Szmuness, W. The e antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am. J. Epidemiol.* 105, 94–98 (1977).
8. Stevens, C. E., Beasley, R. P., Tsui, J. & Lee, W. C. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N. Engl. J. Med.* 292, 771–774 (1975).
9. Lok, A. S. Natural history and control of perinatally acquired hepatitis B virus infection. *Dig Dis* 10, 46–52 (1992).
10. Okada, K., Kamiyama, I., Inomata, M., Imai, M. & Miyakawa, Y. e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N. Engl. J. Med.* 294, 746–749 (1976).
11. World Health Organization Media Centre, Fact sheet N°204. Hepatitis B. (2013).
12. M. Cornberg, U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer, T. Berg, W. Jilg, A. Erhardt, S. Wirth, C. Sarrazin, & M. M. Dollinger, P. Schirmacher, K. Däthe, I. B. Kopp, S. Zeuzem, W. H. Gerlich, M. P. Manns. Aktualisierung der S3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion.
13. Liaw, Y. F. *et al.* Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 119, 172–180 (2000).
14. Zoulim, F. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. *J. Clin. Virol.* 21, 243–253 (2001).
15. Petersen, J. *et al.* Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* 26, 335–41 (2008).
16. *Videoabstract* 'The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks...' (2013). at <http://www.youtube.com/watch?v=n_icLWfsm3A&feature=youtube_gdata_player>
17. Volz, T. *et al.* The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J. Hepatol.* 58, 861–867 (2013).
18. Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. & Charnay, P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281, 646–650 (1979).

19. Vaudin, M., Wolstenholme, A. J., Tsiquaye, K. N., Zuckerman, A. J. & Harrison, T. J. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J. Gen. Virol* 69 (Pt 6), 1383–1389 (1988).
20. Norder, H., Ebert, J. W., Fields, H. A., Mushahwar, I. K. & Magnius, L. O. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* 218, 214–223 (1996).
21. Grethe, S., Heckel, J. O., Rietschel, W. & Hufert, F. T. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J. Virol* 74, 5377–5381 (2000).
22. Warren, K. S., Heeney, J. L., Swan, R. A., Heriyanto & Verschoor, E. J. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J. Virol* 73, 7860–7865 (1999).
23. Mason, W. S., Seal, G. & Summers, J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol* 36, 829–836 (1980).
24. Sprengel, R., Kaleta, E. F. & Will, H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol* 62, 3832–3839 (1988).
25. Pult, I. *et al.* Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* 289, 114–128 (2001).
26. Prassolov, A. *et al.* New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J. Virol* 77, 1964–1976 (2003).
27. Chang, S. F. *et al.* A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology* 262, 39–54 (1999).
28. Gilbert, C. & Feschotte, C. Genomic fossils calibrate the long-term evolution of hepadnaviruses. *PLoS Biol.* 8, (2010).
29. Dane, D. S., Cameron, C. H. & Briggs, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 695–698 (1970).
30. Lanford, R. E., Chavez, D., Brasky, K. M., Burns, R. B. & Rico-Hesse, R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 5757–5761 (1998).
31. Summers, J., Smolec, J. M. & Snyder, R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 75, 4533–4537 (1978).
32. Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H. & Robinson, W. S. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 77, 2941–2945 (1980).
33. Testut, P. *et al.* A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J. Virol* 70, 4210–4219 (1996).
34. Drexler, J. F. *et al.* Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 110, 16151–16156 (2013).
35. Funk, A., Mhamdi, M., Will, H. & Sirma, H. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* 13, 91–103 (2007).

36. Guo, H. *et al.* Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity. *J. Virol.* 79, 2729–2742 (2005).
37. BLUMBERG, B. S., ALTER, H. J. & VISNICH, S. A 'NEW' ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *JAMA* 191, 541–546 (1965).
38. Weinberger, K. M., Wiedenmann, E., Böhm, S. & Jilg, W. Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J. Virol. Methods* 85, 75–82 (2000).
39. Schlicht, H. J., Kuhn, C., Guhr, B., Mattaliano, R. J. & Schaller, H. Biochemical and immunological characterization of the duck hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol* 61, 2280–5 (1987).
40. Chen, L. B. *et al.* Ultrastructural study of hepatitis B virus in biliary epithelial cells of duck liver. *Chin. Med. J* 103, 447–450 (1990).
41. McCaul, T. F., Tsiquaye, K. N. & Zuckerman, A. J. Studies by electron microscopy on the assembly of duck hepatitis B virus in the liver. *J. Med. Virol* 16, 77–87 (1985).
42. Nassal, M. & Schaller, H. Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol* 1, 221–8 (1993).
43. Lien, J. M., Petcu, D. J., Aldrich, C. E. & Mason, W. S. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J. Virol.* 61, 3832–3840 (1987).
44. Pasek, M. *et al.* Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 282, 575–579 (1979).
45. Mandart, E., Kay, A. & Galibert, F. Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J Virol* 49, 782–92 (1984).
46. Schaller, H. & Fischer, M. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 168, 21–39 (1991).
47. Guo, W., Chen, M., Yen, T. S. & Ou, J. H. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 443–448 (1993).
48. Di, Q., Summers, J., Burch, J. B. & Mason, W. S. Major differences between WHV and HBV in the regulation of transcription. *Virology* 229, 25–35 (1997).
49. Raney, A. K., Johnson, J. L., Palmer, C. N. & McLachlan, A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J. Virol.* 71, 1058–1071 (1997).
50. Milich, D. & Liang, T. J. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 38, 1075–1086 (2003).
51. Chang, C. *et al.* Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. *J. Virol.* 61, 3322–3325 (1987).
52. Schlicht, H. J., Bartenschlager, R. & Schaller, H. 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, 2995–3000 (1989).

53. Roseman, A. M., Berriman, J. A., Wynne, S. A., Butler, P. J. G. & Crowther, R. A. A structural model for maturation of the hepatitis B virus core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15821–15826 (2005).
54. Nassal, M., Rieger, A. & Steinau, O. Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. *J. Mol. Biol.* 225, 1013–1025 (1992).
55. Kenney, J. M., von Bonsdorff, C. H., Nassal, M. & Fuller, S. D. Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure* 3, 1009–1019 (1995).
56. Gallina, A. *et al.* A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.* 63, 4645–4652 (1989).
57. Nassal, M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.* 66, 4107–4116 (1992).
58. Zlotnick, A. *et al.* Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9556–9561 (1997).
59. Nassal, M. Hepatitis B virus morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, 297–337 (1996).
60. Radziwill, G., Tucker, W. & Schaller, H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J. Virol.* 64, 613–620 (1990).
61. Chang, L. J., Pryciak, P., Ganem, D. & Varmus, H. E. Biosynthesis of the reverse transcriptase of hepatitis B viruses involves de novo translational initiation not ribosomal frameshifting. *Nature* 337, 364–368 (1989).
62. Ou, J. H., Bao, H., Shih, C. & Tahara, S. M. Preferred translation of human hepatitis B virus polymerase from core protein- but not from precore protein-specific transcript. *J. Virol.* 64, 4578–4581 (1990).
63. Hu, K. Q., Vierling, J. M. & Siddiqui, A. Trans-activation of HLA-DR gene by hepatitis B virus X gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7140–7144 (1990).
64. Twu, J. S. & Schloemer, R. H. Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J. Virol.* 61, 3448–3453 (1987).
65. Colgrove, R., Simon, G. & Ganem, D. Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J. Virol.* 63, 4019–4026 (1989).
66. Spandau, D. F. & Lee, C. H. trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 62, 427–434 (1988).
67. Chen, H. S. *et al.* The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J. Virol.* 67, 1218–1226 (1993).
68. Yang, W. *et al.* Capsid assembly and involved function analysis of twelve core protein mutants of duck hepatitis B virus. *J. Virol.* 68, 338–345 (1994).
69. Büscher, M., Reiser, W., Will, H. & Schaller, H. Transcripts and the putative RNA pregenome of duck hepatitis B virus: implications for reverse transcription. *Cell* 40, 717–24 (1985).

70. Günther, S., Sommer, G., Iwanska, A. & Will, H. Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology* 238, 363–371 (1997).
71. Nassal, M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 42, 100–116 (1999).
72. Soussan, P. *et al.* Expression of defective hepatitis B virus particles derived from singly spliced RNA is related to liver disease. *J. Infect. Dis.* 198, 218–225 (2008).
73. Chowdhury, J. B., Roy, D. & Ghosh, S. Identification of a unique splicing regulatory cluster in hepatitis B virus pregenomic RNA. *FEBS Lett.* 585, 3348–3353 (2011).
74. Obert, S. *et al.* A splice hepadnavirus RNA that is essential for virus replication. *EMBO J* 15, 2565–2574 (1996).
75. Peterson, D. L., Nath, N. & Gavilanes, F. Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J. Biol. Chem.* 257, 10414–10420 (1982).
76. Schultz, U., Grgacic, E. & Nassal, M. Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection. *Adv. Virus Res* 63, 1–70 (2004).
77. Grgacic, E. V. L. & Anderson, D. A. 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, 5346–5352 (2005).
78. Stibbe, W. & Gerlich, W. H. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* 46, 626–628 (1983).
79. Heermann, K. H. *et al.* Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol* 52, 396–402 (1984).
80. Persing, D. H., Varmus, H. E. & Ganem, D. The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol* 61, 1672–7 (1987).
81. Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. & Guguen-Guillouzo, C. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213, 292–299 (1995).
82. Macrae, D. R., Bruss, V. & Ganem, D. Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology* 181, 359–363 (1991).
83. Glebe, D. & Urban, S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13, 22–38 (2007).
84. Lambert, C. & Prange, R. Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 22265–22272 (2001).
85. Stirk, H. J., Thornton, J. M. & Howard, C. R. A topological model for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 33, 148–158 (1992).
86. Eble, B. E., Lingappa, V. R. & Ganem, D. Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1454–1463 (1986).

87. Eble, B. E., MacRae, D. R., Lingappa, V. R. & Ganem, D. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3591–3601 (1987).
88. Eble, B. E., Lingappa, V. R. & Ganem, D. The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J. Virol.* 64, 1414–1419 (1990).
89. Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R. & Gerlich, W. H. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J* 13, 2273–2279 (1994).
90. Ostapchuk, P., Hearing, P. & Ganem, D. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J.* 13, 1048–1057 (1994).
91. Prange, R. & Streeck, R. E. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J* 14, 247–56 (1995).
92. Seitz, S. Ein neuartiger viraler Reifungsmechanismus: Hepatitis-B-Viren werden durch einen Wandel der Hüllprotein-Topologie langsam infektiös. (Ruprecht-Karls-Universität, 2011).
93. Swameye, I. & Schaller, H. Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing pre-S translocation and glycosylation. *J. Virol.* 71, 9434–9441 (1997).
94. Guo, J. T. & Pugh, J. C. Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis. *J Virol* 71, 1107–14 (1997).
95. Hild, M., Weber, O. & Schaller, H. Glucagon treatment interferes with an early step of duck hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 72, 2600–2606 (1998).
96. Rothmann, K. *et al.* Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J. Virol* 72, 10138–10147 (1998).
97. Summers, J., Smith, P. M., Huang, M. J. & Yu, M. S. Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus. *J Virol* 65, 1310–7 (1991).
98. Bruss, V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 13, 65–73 (2007).
99. Klingmüller, U. & Schaller, H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J. Virol* 67, 7414–7422 (1993).
100. Chojnacki, J., Anderson, D. A. & Grgacic, E. V. L. A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome. *J. Virol* 79, 14945–14955 (2005).
101. Grgacic, E. V. & Schaller, H. 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, 5116–5122 (2000).
102. Löffler-Mary, H., Werr, M. & Prange, R. Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* 235, 144–152 (1997).

103. Prange, R., Werr, M. & Löffler-Mary, H. Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis. *Biol. Chem.* 380, 305–314 (1999).
104. Lambert, C. & Prange, R. Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5199–5204 (2003).
105. Cho, D.-Y., Yang, G.-H., Ryu, C. J. & Hong, H. J. Molecular chaperone GRP78/BiP interacts with the large surface protein of hepatitis B virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* 77, 2784–2788 (2003).
106. Berting, A., Hahnen, J., Kröger, M. & Gerlich, W. H. Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* 38, 8–15 (1995).
107. Grgacic, E. V., Kuhn, C. & Schaller, H. Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation. *J. Virol* 74, 2455–2458 (2000).
108. Grgacic, E. V. L. Identification of structural determinants of the first transmembrane domain of the small envelope protein of duck hepatitis B virus essential for particle morphogenesis. *J. Gen. Virol* 83, 1635–1644 (2002).
109. Gerhardt, E. & Bruss, V. Phenotypic mixing of rodent but not avian hepadnavirus surface proteins into human hepatitis B virus particles. *J. Virol* 69, 1201–1208 (1995).
110. Neurath, A. R., Kent, S. B., Strick, N. & Parker, K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46, 429–436 (1986).
111. Yeh, C. T., Liaw, Y. F. & Ou, J. H. The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.* 64, 6141–6147 (1990).
112. Eckhardt, S. G., Milich, D. R. & McLachlan, A. Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J. Virol.* 65, 575–582 (1991).
113. Köck, J. & Schlicht, H. J. 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, 4867–4874 (1993).
114. Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H. & Helenius, A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 145, 45–55 (1999).
115. Rall, L. B., Standing, D. N., Laub, O. & Rutter, W. J. Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1766–1773 (1983).
116. Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M. & Schaller, H. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol* 64, 5324–32 (1990).
117. Bartenschlager, R. & Schaller, H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J* 11, 3413–20 (1992).
118. Hirsch, R. C., Lavine, J. E., Chang, L. J., Varmus, H. E. & Ganem, D. Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature* 344, 552–555 (1990).

119. Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R. & Schaller, H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 9, 3389–3396 (1990).
120. Calvert, J. & Summers, J. Two regions of an avian hepadnavirus RNA pregenome are required in cis for encapsidation. *J. Virol.* 68, 2084–2090 (1994).
121. Nassal, M. & Rieger, A. A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first-strand DNA synthesis. *J. Virol.* 70, 2764–2773 (1996).
122. Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J. M. & Peterson, D. L. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 7770–7777 (1982).
123. Sonveaux, N., Thines, D. & Ruyschaert, J. M. Characterization of the HBsAg particle lipid membrane. *Res. Virol.* 146, 43–51 (1995).
124. Tuttleman, J. S., Pourcel, C. & Summers, J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47, 451–60 (1986).
125. Wu, T. T., Coates, L., Aldrich, C. E., Summers, J. & Mason, W. S. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* 175, 255–61 (1990).
126. Zhang, Y.-Y. *et al.* Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12372–12377 (2003).
127. Zhu, Y. *et al.* Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J. Virol.* 75, 311–322 (2001).
128. Lenhoff, R. J. & Summers, J. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J. Virol.* 68, 4565–71 (1994).
129. Newbold, J. E. *et al.* The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* 69, 3350–3357 (1995).
130. Barker, L. F. *et al.* Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 127, 648–662 (1973).
131. Will, H., Kuhn, C., Cattaneo, R. & Schaller, H. Structure and function of the hepatitis B virus genome. *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund* 12, 237–247 (1982).
132. Gripon, P. *et al.* Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Virol.* 62, 4136–4143 (1988).
133. Galle, P. R. *et al.* In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 106, 664–673 (1994).
134. Will, H. *et al.* Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* 61, 904–911 (1987).
135. Sells, M. A., Chen, M. L. & Acs, G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1005–1009 (1987).
136. Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. & Koike, K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 2678–2682 (1987).

137. Ladner, S. K. *et al.* Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1715–1720 (1997).
138. Sureau, C., Romet-Lemonne, J. L., Mullins, J. I. & Essex, M. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47, 37–47 (1986).
139. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1, e00049 (2012).
140. Yang, P. L., Althage, A., Chung, J. & Chisari, F. V. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13825–13830 (2002).
141. Guidotti, L. G., Matzke, B., Schaller, H. & Chisari, F. V. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 69, 6158–6169 (1995).
142. Dandri, M. *et al.* Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33, 981–988 (2001).
143. Dandri, M. *et al.* Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* 34, 824–833 (2001).
144. Lavanchy, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 11, 97–107 (2004).
145. Hughes, S. A., Wedemeyer, H. & Harrison, P. M. Hepatitis delta virus. *Lancet* 378, 73–85 (2011).
146. Lütgehetmann, M. *et al.* Human chimeric uPA mouse model to study hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology* (2011). doi:10.1002/hep.24758
147. Yan, R. Q. *et al.* Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 122, 283–288 (1996).
148. Köck, J. *et al.* Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J. Virol* 75, 5084–5089 (2001).
149. Walter, E., Keist, R., Niederöst, B., Pult, I. & Blum, H. E. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 24, 1–5 (1996).
150. Gripon, P., Cannie, I. & Urban, S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 79, 1613–22 (2005).
151. Glebe, D. *et al.* Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J. Virol* 77, 9511–9521 (2003).
152. Schulze, A., Mills, K., Weiss, T. S. & Urban, S. Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* (2011). doi:10.1002/hep.24707
153. Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15655–60 (2002).
154. Tagawa, M., Robinson, W. S. & Marion, P. L. Duck hepatitis B virus replicates in the yolk sac of developing embryos. *J. Virol.* 61, 2273–2279 (1987).

155. Mason, W. S. *et al.* Experimental transmission of duck hepatitis B virus. *Virology* 131, 375–84 (1983).
156. O'Connell, A. P., Urban, M. K. & London, W. T. Naturally occurring infection of Pekin duck embryos by duck hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1703–1706 (1983).
157. Tuttleman, J. S., Pugh, J. C. & Summers, J. W. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J Virol* 58, 17–25 (1986).
158. Galle, P. R., Schlicht, H. J., Kuhn, C. & Schaller, H. Replication of duck hepatitis B virus in primary duck hepatocytes and its dependence on the state of differentiation of the host cell. *Hepatology* 10, 459–65 (1989).
159. Pugh, J. C. & Summers, J. W. Infection and uptake of duck hepatitis B virus by duck hepatocytes maintained in the presence of dimethyl sulfoxide. *Virology* 172, 564–72 (1989).
160. Condreay, L. D., Aldrich, C. E., Coates, L., Mason, W. S. & Wu, T. T. Efficient duck hepatitis B virus production by an avian liver tumor cell line. *J Virol* 64, 3249–58 (1990).
161. Schulze, A., Gripon, P. & Urban, S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 46, 1759–68 (2007).
162. Offensperger, W. B., Offensperger, S., Walter, E., Blum, H. E. & Gerok, W. Suramin prevents duck hepatitis B virus infection in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother* 37, 1539–1542 (1993).
163. Funk, A., Hohenberg, H., Mhamdi, M., Will, H. & Sirma, H. Spread of hepatitis B viruses in vitro requires extracellular progeny and may be codetermined by polarized egress. *J. Virol* 78, 3977–3983 (2004).
164. Cheung, R. C., Robinson, W. S., Marion, P. L. & Greenberg, H. B. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibodies against duck hepatitis B virus. *J. Virol.* 63, 2445–2451 (1989).
165. Cheung, R. C., Trujillo, D. E., Robinson, W. S., Greenberg, H. B. & Marion, P. L. Epitope-specific antibody response to the surface antigen of duck hepatitis B virus in infected ducks. *Virology* 176, 546–552 (1990).
166. Kuroki, K., Cheung, R., Marion, P. L. & Ganem, D. A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. *J. Virol* 68, 2091–2096 (1994).
167. Tong, S., Li, J. & Wands, J. R. Interaction between duck hepatitis B virus and a 170-kilodalton cellular protein is mediated through a neutralizing epitope of the pre-S region and occurs during viral infection. *J. Virol* 69, 7106–7112 (1995).
168. Kuroki, K. *et al.* gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem* 270, 15022–15028 (1995).
169. Eng, F. J., Novikova, E. G., Kuroki, K., Ganem, D. & Fricker, L. D. gp180, a protein that binds duck hepatitis B virus particles, has metallopeptidase D-like enzymatic activity. *J. Biol. Chem* 273, 8382–8388 (1998).

170. Gomis-Rüth, F. X. *et al.* Crystal structure of avian carboxypeptidase D domain II: a prototype for the regulatory metallo-carboxypeptidase subfamily. *EMBO J.* 18, 5817–5826 (1999).
171. Urban, S. *et al.* Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction. *EMBO J* 19, 1217–27 (2000).
172. Eng, F. J., Varlamov, O. & Fricker, L. D. Sequences within the cytoplasmic domain of gp180/carboxypeptidase D mediate localization to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* 10, 35–46 (1999).
173. Breiner, K. M., Urban, S. & Schaller, H. Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J Virol* 72, 8098–104 (1998).
174. Breiner, K. M. & Schaller, H. Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection. *J Virol* 74, 2203–9 (2000).
175. Urban, S., Breiner, K. M., Fehler, F., Klingmüller, U. & Schaller, H. Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180. *J Virol* 72, 8089–97 (1998).
176. Ishikawa, T., Kuroki, K., Lenhoff, R., Summers, J. & Ganem, D. Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus. *Virology* 202, 1061–1064 (1994).
177. Dipl.Biol. Nicole Schmut. Analyse der Carboxypeptidase D-unabhängigen und -abhängigen Schritte bei der Infektion mit dem Hepatitis B Virus der Ente. (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2005).
178. Urban, S., Kruse, C. & Multhaup, G. A soluble form of the avian hepatitis B virus receptor. Biochemical characterization and functional analysis of the receptor ligand complex. *J. Biol. Chem* 274, 5707–5715 (1999).
179. Breiner, K. M., Urban, S., Glass, B. & Schaller, H. Envelope protein-mediated down-regulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes. *J Virol* 75, 143–50 (2001).
180. Walters, K.-A., Joyce, M. A., Addison, W. R., Fischer, K. P. & Tyrrell, D. L. J. Superinfection exclusion in duck hepatitis B virus infection is mediated by the large surface antigen. *J. Virol* 78, 7925–7937 (2004).
181. Tong, S., Li, J. & Wands, J. R. Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor. *J. Virol* 73, 8696–8702 (1999).
182. Urban, S. & Gripon, P. Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. *J Virol* 76, 1986–90 (2002).
183. Köck, J., Borst, E. M. & Schlicht, H. J. Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J. Virol.* 70, 5827–5831 (1996).
184. Funk, A., Mhamdi, M., Hohenberg, H., Will, H. & Sirma, H. pH-independent entry and sequential endosomal sorting are major determinants of hepadnaviral infection in primary hepatocytes. *Hepatology* 44, 685–693 (2006).
185. Lenhoff, R. J., Luscombe, C. A. & Summers, J. Competition in vivo between a cytopathic variant and a wild-type duck hepatitis B virus. *Virology* 251, 85–95 (1998).

186. Zhang, Y. Y. & Summers, J. Enrichment of a precore-minus mutant of duck hepatitis B virus in experimental mixed infections. *J. Virol* 73, 3616–3622 (1999).
187. Zhang, Y. Y. & Summers, J. Low dynamic state of viral competition in a chronic avian hepadnavirus infection. *J. Virol* 74, 5257–5265 (2000).
188. Protzer, U., Nassal, M., Chiang, P. W., Kirschfink, M. & Schaller, H. Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 10818–10823 (1999).
189. He, T. C. *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 2509–2514 (1998).
190. Luo, J. *et al.* A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2, 1236–1247 (2007).
191. Sprinzl, M. F., Oberwinkler, H., Schaller, H. & Protzer, U. Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. *J. Virol.* 75, 5108–5118 (2001).
192. Grgacic, E. V. & Anderson, D. A. The large surface protein of duck hepatitis B virus is phosphorylated in the pre-S domain. *J. Virol* 68, 7344–7350 (1994).
193. Mabit, H., Knaust, A., Breiner, K. M. & Schaller, H. 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, 2157–64 (2003).
194. Dipl. Ing. Iris Eva Maria Scheirich. Frühe Schritte der Enten Hepatitis B Virus Infektion: Zellassoziation und intrazelluläre Degradation als Hauptdeterminanten der Infektionseffizienz in vivo und in vitro. (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2006).
195. Funk, A., Mhamdi, M., Lin, L., Will, H. & Sirma, H. Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry. *J. Virol* 78, 8289–8300 (2004).
196. Petcu, D. J., Aldrich, C. E., Coates, L., Taylor, J. M. & Mason, W. S. Suramin inhibits in vitro infection by duck hepatitis B virus, Rous sarcoma virus, and hepatitis delta virus. *Virology* 167, 385–392 (1988).
197. Rigg, R. J. & Schaller, H. Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH. *J. Virol.* 66, 2829–2836 (1992).
198. Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E. & Galle, P. R. Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* 218, 396–399 (1996).
199. Fernholz, D., Wildner, G. & Will, H. Minor envelope proteins of duck hepatitis B virus are initiated at internal pre-S AUG codons but are not essential for infectivity. *Virology* 197, 64–73 (1993).
200. Yokosuka, O., Omata, M. & Ito, Y. Expression of pre-S1, pre-S2, and C proteins in duck hepatitis B virus infection. *Virology* 167, 82–86 (1988).
201. Nethe, M., Berkhout, B. & van der Kuyl, A. C. Retroviral superinfection resistance. *Retrovirology* 2, 52 (2005).

202. Grgacic, E. V., Lin, B., Gazina, E. V., Snooks, M. J. & Anderson, D. A. Normal phosphorylation of duck hepatitis B virus L protein is dispensable for infectivity. *J. Gen. Virol* 79 (Pt 11), 2743–2751 (1998).
203. Pugh, J. C., Di, Q., Mason, W. S. & Simmons, H. Susceptibility to duck hepatitis B virus infection is associated with the presence of cell surface receptor sites that efficiently bind viral particles. *J Virol* 69, 4814–22 (1995).
204. Lenhoff, R. J. & Summers, J. Construction of avian hepadnavirus variants with enhanced replication and cytopathicity in primary hepatocytes. *J. Virol* 68, 5706–5713 (1994).
205. Ishikawa, T. & Ganem, D. The pre-S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 6259–6263 (1995).
206. Moebes, A. *et al.* Human foamy virus reverse transcription that occurs late in the viral replication cycle. *J. Virol.* 71, 7305–7311 (1997).
207. Lama, J. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr. HIV Res* 1, 167–184 (2003).
208. Geleziunas, R., Bour, S. & Wainberg, M. A. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *FASEB J* 8, 593–600 (1994).
209. Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S. & Trono, D. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol. Rev* 168, 51–63 (1999).
210. Huang, I.-C. *et al.* Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. *J. Virol* 82, 4834–4843 (2008).
211. Webster, R. G., Laver, W. G., Air, G. M. & Schild, G. C. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 296, 115–121 (1982).
212. Parrish, C. R. & Kawaoka, Y. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 553–586 (2005).
213. Belshe, R. B. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. *N. Engl. J. Med.* 353, 2209–2211 (2005).
214. Nelson, M. I. & Holmes, E. C. The evolution of epidemic influenza. *Nat. Rev. Genet.* 8, 196–205 (2007).
215. Schaller, T. *et al.* Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J. Virol.* 81, 4591–4603 (2007).
216. Zhong, J. *et al.* Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J. Virol.* 80, 11082–11093 (2006).
217. Lee, Y.-M., Tscherne, D. M., Yun, S.-I., Frolov, I. & Rice, C. M. Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. *J. Virol.* 79, 3231–3242 (2005).
218. Lenhoff, R. J., Luscombe, C. A. & Summers, J. Acute liver injury following infection with a cytopathic strain of duck hepatitis B virus. *Hepatology* 29, 563–571 (1999).
219. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5547–5551 (1992).

220. Dimitrov, D. S. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 109–122 (2004).
221. Breiner, K. M., Schaller, H. & Knolle, P. A. Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology* 34, 803–8 (2001).
222. Gagliardi, A. R., Taylor, M. F. & Collins, D. C. Uptake of suramin by human microvascular endothelial cells. *Cancer Lett.* 125, 97–102 (1998).
223. Klöcker, U., Schultz, U., Schaller, H. & Protzer, U. Endotoxin stimulates liver macrophages to release mediators that inhibit an early step in hepadnavirus replication. *J. Virol.* 74, 5525–5533 (2000).
224. Kondo, J. *et al.* Mutations in the hepatitis B virus preS2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. *Acta Med. Okayama* 56, 193–198 (2002).
225. Blomhoff, R., Eskild, W. & Berg, T. Endocytosis of formaldehyde-treated serum albumin via scavenger pathway in liver endothelial cells. *Biochem. J.* 218, 81–86 (1984).
226. Wright, T. L., Roll, F. J., Jones, A. L. & Weisiger, R. A. Uptake and metabolism of polymerized albumin by rat liver. Role of the scavenger receptor. *Gastroenterology* 94, 443–452 (1988).
227. Gritli-Linde, A., Ruch, J. V., Mark, M. P., Lécolle, S. & Goldberg, M. Effects of suramin, a polyanionic drug inducing lysosomal storage disorders on tooth germs in vitro. *Biol. Cell* 81, 143–152 (1994).
228. Baghdiguian, S., Boudier, J. A., Boudier, J. L. & Fantini, J. Co-localization of suramin and serum albumin in lysosomes of suramin-treated human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 101, 179–184 (1996).
229. Huang, S. S., Koh, H. A. & Huang, J. S. Suramin enters and accumulates in low pH intracellular compartments of v-sis-transformed NIH 3T3 cells. *FEBS Lett.* 416, 297–301 (1997).
230. Tsiquaye, K. & Zuckerman, A. Suramin inhibits duck hepatitis B virus DNA polymerase activity. *J. Hepatol.* 1, 663–669 (1985).
231. Tsiquaye, K. N., Collins, P. & Zuckerman, A. J. Antiviral activity of the polybasic anion, suramin and acyclovir in Hepadna virus infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 Suppl B, 223–228 (1986).
232. Lakadamyali, M., Rust, M. J., Babcock, H. P. & Zhuang, X. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9280–9285 (2003).
233. Seisenberger, G. *et al.* Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294, 1929–1932 (2001).
234. White, J., Kartenbeck, J. & Helenius, A. Fusion of Semliki forest virus with the plasma membrane can be induced by low pH. *J. Cell Biol.* 87, 264–272 (1980).
235. Collins, J. M. *et al.* Clinical pharmacokinetics of suramin in patients with HTLV-III/LAV infection. *J Clin Pharmacol* 26, 22–26 (1986).
236. Leistner, C. M., Gruen-Bernhard, S. & Glebe, D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell. Microbiol.* 10, 122–133 (2008).

237. Sureau, C. & Salisse, J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* 57, 985–994 (2013).
238. Armistead, J. S., Wilson, I. B. H., van Kuppevelt, T. H. & Dinglasan, R. R. A role for heparan sulfate proteoglycans in *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion of anopheline mosquito salivary glands. *Biochem. J.* 438, 475–483 (2011).
239. Zhang, J. P. & Stephens, R. S. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* 69, 861–869 (1992).
240. Shieh, M. T., WuDunn, D., Montgomery, R. I., Esko, J. D. & Spear, P. G. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Biol.* 116, 1273–1281 (1992).
241. Aguilar, J. S., Rice, M. & Wagner, E. K. The polysulfonated compound suramin blocks adsorption and lateral diffusion of herpes simplex virus type-1 in vero cells. *Virology* 258, 141–151 (1999).
242. Baba, M. *et al.* Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6132–6136 (1988).
243. Mitsuya, H. *et al.* Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells. *Science* 240, 646–649 (1988).
244. Moelling, K., Schulze, T. & Diring, H. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 RNase H by sulfated polyanions. *J. Virol.* 63, 5489–5491 (1989).
245. Patel, M. *et al.* Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 167–174 (1993).
246. Yahi, N. *et al.* Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269, 24349–24353 (1994).
247. Offensperger, W. B., Offensperger, S., Walter, E., Blum, H. E. & Gerok, W. Sulfated polyanions do not inhibit duck hepatitis B virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2431–2433 (1991).
248. Zhang, Y. L., Keng, Y. F., Zhao, Y., Wu, L. & Zhang, Z. Y. Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 273, 12281–12287 (1998).
249. Lambert, C. Untersuchungen zur posttranslationalen präS-Translokation des großen Hüllproteins des Hepatitis-B-Virus. (Johannes Gutenberg-Universität, 2001).
250. Swameye. The hepadnaviral large envelope protein: a membrane protein with two alternative topologies. (1996).
251. Hild, M. Zelluläre Funktion während der frühen und späten Schritte im Infektionszyklus des Enten Hepatitis B Virus. (Heidelberg).
252. Doms, R. W. & Trono, D. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev.* 14, 2677–2688 (2000).
253. Mariani, R. & Skowronski, J. CD4 down-regulation by nef alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5549–5553 (1993).

254. Marshall, W. L., Diamond, D. C., Kowalski, M. M. & Finberg, R. W. High level of surface CD4 prevents stable human immunodeficiency virus infection of T-cell transfectants. *J. Virol.* 66, 5492–5499 (1992).
255. Lama, J., Mangasarian, A. & Trono, D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.* 9, 622–631 (1999).
256. Cortés, M. J., Wong-Staal, F. & Lama, J. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J. Biol. Chem.* 277, 1770–1779 (2002).
257. Ross, T. M., Oran, A. E. & Cullen, B. R. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr. Biol.* 9, 613–621 (1999).
258. Standring, D. N., Ou, J. H. & Rutter, W. J. Assembly of viral particles in *Xenopus* oocytes: pre-surface-antigens regulate secretion of the hepatitis B viral surface envelope particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9338–9342 (1986).
259. Kuroki, K., Russnak, R. & Ganem, D. Novel N-terminal amino acid sequence required for retention of a hepatitis B virus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 9, 4459–66 (1989).
260. Summers, J., Smith, P. M. & Horwich, A. L. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol* 64, 2819–24 (1990).
261. Bruss, V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res.* 106, 199–209 (2004).
262. Perlman, D. & Hu, J. Duck hepatitis B virus virion secretion requires a double-stranded DNA genome. *J. Virol.* 77, 2287–2294 (2003).
263. Mabit, H. & Schaller, H. Intracellular hepadnavirus nucleocapsids are selected for secretion by envelope protein-independent membrane binding. *J. Virol.* 74, 11472–11478 (2000).
264. Walters, K.-A., Joyce, M. A., Addison, W. R., Fischer, K. P. & Tyrrell, D. L. J. Superinfection exclusion in duck hepatitis B virus infection is mediated by the large surface antigen. 7925–7937 (2004).
265. Löffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C. & Prange, R. Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* 270, 358–367 (2000).
266. Tan, W. S., Dyson, M. R. & Murray, K. Two distinct segments of the hepatitis B virus surface antigen contribute synergistically to its association with the viral core particles. *J. Mol. Biol.* 286, 797–808 (1999).
267. Kawaguchi, T., Nomura, K., Hirayama, Y. & Kitagawa, T. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res* 47, 4460–4 (1987).
268. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59–74 (1977).
269. Sunyach, C. *et al.* Residues critical for duck hepatitis B virus neutralization are involved in host cell interaction. *J Virol* 73, 2569–75 (1999).

270. Berry, M. N. & Friend, D. S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43, 506–20 (1969).
271. Bartenschlager, R. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des P-Proteins der Hepatitis B Viren. (Ruprecht-Karls-Universität, 1990).
272. Mason, W. S., Aldrich, C., Summers, J. & Taylor, J. M. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3997–4001 (1982).
273. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–7 (1977).
274. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5 (1970).

Publikationsliste

Publikation

“Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein”, Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, von Weizsäcker F, Haberkorn U, Fischer L, Pollok JM, **Erbes B**, Seitz S, Urban S. (2008) Nature Biotechnology. 26(3): 335- 41.

Kongressbeiträge

Vorträge

- 1) “Reassessment of the role of carboxypeptidase D in DHBV infection”, **Lange B**, Schmut N, Urban S. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Heidelberg, Deutschland, 2005.
- 2) “In vivo inhibition of HBV infection by acylated preS peptides in the urokinase-type plasminogen activator (uPA) mouse model”, Petersen J, Dandri M, Lütgehetmann M, Volz T, Mier W, Haberkorn U, **Lange B**, Urban S. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, Deutschland, 2006.
- 3) “DHBV/carboxypeptidase D (CPD) interaction is dispensable for DHBV infection but does not mediate binding/ uptake into primary duck hepatocytes”, **Lange B**, Schmut N, Urban S. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Vancouver, Kanada, 2006.
- 4) “L-protein mediated DHBV superinfection exclusion (SIE) requires the integrity of the nucleocapsid-binding site in the pre-S domain”, **Erbes B**, Urban S. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Tours, Frankreich, 2009.

Poster

- 1) “Mutational analysis of DHBV preS binding to variants of the duck carboxypeptidase D C-domain”, Schmut N, **Lange B**, Urban S. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Bergamo, Italien, 2003.
- 2) “Mutational analysis of the duck hepatitis B virus receptor binding domain: influence on receptor interaction and infectivity”, Schmut N, **Lange B**, Urban S. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 2004.
- 3) “Reassessment of the role of carboxypeptidase D in duck hepatitis B virus infection”, **Lange B**, Schmut N, Urban S. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, 2006.
- 4) “Comparative analysis of the large viral surface-protein mediated superinfection exclusion of human and duck hepatitis B virus infection“, **Erbes B**, Reinhardt C, Urban S. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 2008

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Urban für seine große Unterstützung und stete Bereitschaft für anregende Diskussionen bedanken. An seiner unbändigen Begeisterung für die Wissenschaft möchte ich mir ein Beispiel nehmen.

Bei allen „Urbanern“ bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Unendlich großer Dank gebührt Dr. Stefan Seitz, besonders für seine Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Daten. Durch seine wertvollen Einwände und konstruktive Kritik konnte diese Arbeit erst in der vorliegenden Form entstehen. Seine ständige Motivation hat meine Begeisterung für diese Arbeit nie müde werden lassen. P.S. Ich lebe schon!

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die konstruktiven Diskussionen während der Seminare. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Artur Kaul für seine Hilfe bei der Etablierung der qRT-PCR und Fredy Huschmand für das geduldige Ertragen jedweder Computerfragen.

Bei den von mir betreuten Diplomandinnen Constanze Heß und Christine Reinhardt bedanke ich mich für ihre Wissbegierde, ihren großartigen Fleiß und die auch für mich lehrreiche Zusammenarbeit.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Steffi Held und Martina Spille, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich rund um die Leberzellpräparationen unterstützten. Bei Kuno bedanke ich mich für kleine Anekdoten aus der (Schaller'schen-)HBV-Forschung und ihre Hilfe bei der Anfertigung histologischer Schnitte und der Bereitstellung erforderlicher Geräte. Bei Prof. Dr. Hans Will bedanke ich mich herzlichst, zum einen für die Bereitstellung von Heron HBV L-spezifischen Antisera und zum anderen für seine Lebensweisheit ohne die ich evtl. nicht diesen Weg eingeschlagen hätte.

Prof. Dr. Ursula Klingmüller danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Studien-Freundinnen Isabel Hohneck, Dr. Iris Kaspar und Dr. Eva Hesser danke ich von Herzen für ihren unaufhaltsam positiven Zuspruch. Der Zweitgenannten danke ich besonders für eine unvergessliche Zeit im Labor, die von konstruktiven Diskussionen vor allem weit außerhalb der Seminare und einer unvergleichbaren Zusammenarbeit geprägt war, bei der ich viel lernen durfte und professionell in die Welt des „(H)Entchen haltens“ eingeführt wurde. Ihr und der Letztgenannten danke ich auch für kostbare Kommentare zu meiner Arbeit und der Korrektur des vorliegenden Textes.

Unendlich großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann und meinen Kindern, sowie unseren Freunden. Nur dank ihrer Hilfsbereitschaft und Geduld konnte ich diese Arbeit fertigstellen.