# **INAUGURAL - DISSERTATION**

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

> Vorgelegt von Diplom-Biologin Nicole Schmut aus Rodalben / Pfalz

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Analyse der Carboxypeptidase D-unabhängigen und -abhängigen Schritte bei der Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus der Ente

> Gutachter: PD Dr. Stephan Urban Prof. Dr. Hans-Georg Kräußlich

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2001 bis Juni 2005 im Labor von PD Dr. Stephan Urban angefertigt.

#### Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Dr. Stephan Urban bedanken, ohne dessen Unterstützung und Diskussionsbereitschaft diese Arbeit in der vorliegenden Form niemals möglich gewesen wäre.

Bei Dr. Artur Kaul von der Arbeitsgruppe Professor Bartenschlagers bedanke ich mich für seine immerwährende Hilfsbereitschaft bei der Etablierung der Real-Time PCR.

Ich bedanke mich bei allen meinen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dr. Urban und im Besonderen Stefan Seitz. Danke auch an die Kollegen der Arbeitsgruppe Professor Bartenschlager.

Weiter bedanke ich mich bei Dr. Timo Kürschner und Iris Scheirich für die Präparation und Bereitstellung primärer Entenhepatozyten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und ganz besonders meinem Lebenspartner, mit dessen Zuspruch diese Arbeit erst möglich wurde.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kräußlich möchte ich besonders für die unkomplizierte und entgegenkommende Art bei der Übernahme des Koreferates danken.

# Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	1
	Abstract	3
1	Einleitung	5
1.1	Hepatitis	5
1.2	Hepadnaviren	6
1.3	Virusaufbau und Genom	7
1.4	Infektionszyklus	12
1.5	Hüllproteine	15
1.6	Carboxypeptidase D der Ente	18
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	21
2	Ergebnisse	23
2.1	Einfluss des N-terminalen Bereichs Aminosäure 2 - 22 im DHBV L auf die	
	DHBV-Infektion	23
2.1.1	Epitop-Bestimmung der Antikörper MT93 und MT92	23
2.1.2	Infektionsinhibitionsstudie im PDH-DHBV-Infektionsmodell	27
2.1.3	In vitro Bindungsstudie mit fluoreszenz-markierten DHBVpreS 1 - 130	30
2.2	Untersuchung der Rolle der Carboxypeptidase D der Ente bei Bindung,	
	Aufnahme und Infektion	31
2.2.1	Aminosäureaustausche in der alpha-Helix Aminosäure 89 bis 104	32
2.2.2	In vitro Bindungsstudien mit einer löslichen Form der C-Domäne der dCPD	37
2.2.3	Herstellung und Analyse im DHBVpreS/S-Gen mutierter Hepatitis-B-Viren	
	der Ente	41
2.2.4	Analyse des Einflusses des Aminosäureaustauschs an den Stellen R101 und	
	R102 mit Histidin bzw. Leucin	46

2.2.5	Analyse der Bindung und Aufnahme des DHBV R102P im Vergleich zu	
	DHBV wt	52
2.3	Mutation der wahrscheinlichen Protease-Schnittstelle im DHBV L und	
	Einfluss auf die DHBV-Infektion	54
2.3.1	Analyse rekombinanter DHBVpreS Mutanten mit Aminosäureaustauschen an	
	der putativen Schnittstelle im DHBVpreS	57
2.3.2	In vitro Bindungsstudien mit einer löslichen Form der C-Domäne der dCPD	58
2.3.3	Analyse im DHBVpreS/S-Gen Entenhepatitis B Viren mit Mutationen in der	
	putativen Schnittstelle des DHBVpreS	60
2.3.4	Analyse der Bindung und Aufnahme der an der putativen Schnittstelle im	
	DHBVpreS mutierten Viren	63
3	Diskussion	64
3.1	Einfluss des N-terminalen Bereichs Aminosäure 2 - 22 im DHBV L auf die	
	DHBV-Infektion	64
3.1.1	Epitop-Bestimmung der Antikörper MT92 und MT93	65
3.1.2	Immunpräzipitation viraler und subviraler Partikel aus DHBV-positivem	
	Entenserum	66
3.1.3	Infektionsinhibitionsstudie im PDH-DHBV-Infektionsmodell	67
3.1.4	In vitro Bindungsstudie mit fluoreszenz-markierten DHBVpreS 1 - 130	68
3.1.5	Perspektive	69
3.2	Untersuchung der Rolle der Carboxypeptidase D der Ente bei Bindung,	
	Aufnahme und Infektion	69
3.2.1	DHBVpreS Proteine mit Punktmutationen in der amphipathischen Helix	71
3.2.2	Unterschiedliche dCPD-C-Bindefähigkeit der einzelnen DHBVpreS Proteine	71
3.2.3	Einfluss der Aminosäureaustausche auf die Virenproduktion	72
3.2.4	Einfluss der Punktmutationen auf die Infektiosität der entsprechenden Viren	73
3.2.5	Einfluss anderer Aminosäureaustausche an den Stellen R101 und R102P	74
3.2.6	Bindungsstudie mit einer quantitativen Polymerasekettenreaktion auf	
	humanen Hepatomzellinien	74

3.2.7 3.2.8	Bindungsstudie mit einer quantitativen Polymerasekettenreaktion auf primären Entenhepatozyten Perspektive		
3.3.1 3.3.2	Mutation der wahrscheinlichen Protease-Schnittstelle im DHBV L und Einfluss auf die DHBV-Infektion Perspektive	78 80	
4	Material	82	
4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 4.1.8 4.1.9 4.1.10	Biologische Materialien Zellen Bakterienstämme Antiseren Zellkulturmedien Plasmide Oligonukleotide Adenoviren sdCPD-C Hexahistin-DHBVpreS bzw. HHBVpreS Proteine zur Epitopanalyse Proteinmolekulargewichtsmarker	82 82 82 83 84 84 85 85 85 86 86	
4.2	Kits	86	
5	Methoden	87	
5.1 5.1.1 5.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) Gen SOEing-PCR Quantitative Real-Time PCR (TaqMan)	87 87 87	
5.2	Sequenzierung	88	
5.3	Antikörperreinigung	88	
5.4 5.4.1 5.4.2	Hexahistidin-Fusionsproteine Expression Reinigung	88 88 88	
5.5 5.5.1 5.5.2 5.5.2.1 5.5.2.2 5.6	Biochemischer Bindungsassay DHBVpreS Sepharose Bindungsreaktion DHBVpreS Talon-Beads Bindungsreaktion Proteinanalyse	89 89 90 90 90	
5.7	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	90	
5.8	Proteinfällung mit Antikörpern und Pansorbin	91	
5.9	Virusherstellung klonierter Genome	91	

5.10	Infektion primärer Entenhepatozyten	92
5.11	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen	92
5.12	Fluoreszenzkonjugate	93
6	Literaturverzeichnis	94
7	Anhang	110
8	Abkürzungen	123
9	Veröffentlichungen	127

## Zusammenfassung

Das Hepatitis-B-Virus der Ente (DHBV) zählt zur Familie *Hepadnaviridae*, einer Gruppe umhüllter DNA-Viren, die sich durch eine enge Wirts- und eine vorwiegend auf Hepatozyten beschränkte Gewebespezifität auszeichnen. Diese doppelte Restriktion im Tropismus wird in erster Linie durch die frühen Schritte des viralen Lebenszyklus bestimmt: (i) die Bindung des Virions an Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der Wirtszelle, (ii) die endozytotische Aufnahme in die Zelle und (iii) die anschließende Membranfusion, die zur Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma führt. DHBV kann sowohl *in vivo* in der Pekingente als auch *in vitro* in primären Entenhepatozyten (PDH) leicht propagiert werden und stellt deshalb ein unverzichtbares Modellsystem dar, die frühen Schritte der hepadnaviralen Infektion zu entschlüsseln. Eine essentielle Funktion hierbei wohnt der preS-Domäne des großen viralen Hüllproteins inne.

Als zellulärer preS-Interaktionspartner ist die Carboxypeptidase D der Ente (dCPD) beschrieben. Sie bindet in einem ungewöhnlichen 2-Stufen-Mechanismus zunächst mit niedriger Affinität an einen Bereich innerhalb von preS (AS 86 - 115), der eine amphipathische  $\alpha$ -Helix umfasst, und dann linear fortschreitend an N-terminal davon gelegene Aminosäuren (AS 30 - 85), woraus sekundär ein hochaffiner Komplex resultiert. Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion von preS mit dCPD zu untersuchen, wurden Punktmutationen in die  $\alpha$ -Helix eingeführt, die entweder zur Änderung der Ladungsverteilung oder der Aufhebung der strukturellen Integrität führten. Der Phänotyp dieser preS-Mutanten wurde biochemisch bezüglich der dCPD-Bindefähigkeit charakterisiert: während die Änderung der Amphipathizität ohne Auswirkung blieb, führte die Störung der Helixstruktur zu einer drastischen Reduktion oder zu einem vollständigen Verlust der dCPD-Interaktion. Der Verlust der dCPD-Bindekompetenz war streng korreliert mit einer Aufhebung der Infektiosität der entsprechenden Viren auf PDHs. Erstaunlicherweise wurden diese Defektmutanten unvermindert von Hepatozyten gebunden und internalisiert. Diese Ergebnisse bestätigen die essentielle Funktion der dCPD bei der DHBV-Infektion, sprechen aber gegen eine Rolle als exklusiver Binde- und Aufnahmerezeptor.

Synthetische myristoylierte Peptide, die den N-Terminus des preS (AS 2 - 41) umspannen, kompetitieren äußerst effizient mit der DHBV-Infektion. Um den hierbei adressierten Schritt beim Viruseintritt näher zu definieren, wurden gegen die Peptide gerichtete Antikörper generiert. Diese konnten sowohl virale Partikel präzipitieren als auch ihrerseits selbst die Infektion blockieren, obwohl das von ihnen erkannte Epitop (AS 12 - 23) nicht mit der dCPD-Binderegion überlappt und *in vitro* keine Interferenz mit der dCPD-Interaktion nachweisbar war. Hieraus lässt sich folgern, dass der N-terminale preS-Bereich einen distinkten Schritt beim Viruseintritt vermittelt, der von der preS-dCPD-Komplexbildung funktionell klar abgrenzbar ist

In DHBV-infizierten Entenlebern findet sich regelmäßig eine verkürzte Variante des großen viralen Hüllproteins. Durch die massenspektrometrische Analyse dieser Variante konnte eine putative Proteaseschnittstelle in der preS-Domäne unmittelbar nach den Argininen an Position 71 und 72 identifiziert werden. Der Austausch beider Aminosäuren führte zu einem vollständigen Verlust der Infektiosität ohne die Bindefähigkeit an dCPD und Hepatozyten zu beeinträchtigen. Dieser Befund impliziert eine proteolytische Prozessierung des großen Hüllproteins als notwendigen Teilschritt des Eintrittgeschehens.

Aus den erhobenen Daten lässt sich ein mehrstufiges Modell des Eintritts von DHBV in die Wirtszelle ableiten. Das Virus bindet zunächst an einen bislang unbekannten Faktor auf der Hepatozytenoberfläche. Nach der Internalisierung erfolgt obligat der preS-abhängige Transfer auf dCPD. Die postulierte proteolytische Prozessierung könnte anschließend zur Freisetzung eines fusiogenen Peptids führen, dessen Aktion durch die homologen synthetischen Peptide inhibiert wird.

# Abstract

The Duck Hepatitis B Virus (DHBV) belongs to the *Hepadnaviridae* family, a group of enveloped DNA viruses which reveal a narrow host range and mainly on hepatocytes restricted tissue tropism. This double restriction in the tropism is primarily specified by the early steps in the viral life cycle: (i) binding of the virion to receptor molecules on the surface of the host cell, (ii) endocytotic uptake into the cell and (iii) the resulting fusion with the cellular membrane liberating the capsid into the cytoplasm. DHBV can easily be propagated *in vivo* in the Pekin duck as *in vitro* in primary hepatocytes (PDH) and therefore is an invaluable model system for studies on the early steps of the hepadnaviral infection. Thereby the preS domain of the large viral envelope protein plays an essential role.

The duck Carboxypeptidase D (dCPD) is characterized as a cellular preS interaction partner. dCPD binds with low affinity to the amphipathic helix containing element amino acids 86 to 115 in the preS and then sequentially to N-terminally located amino acids (amino acids 30 to 85) resulting secondarily in a high affinity complex. To study the functional importance of this preS interaction with dCPD, we introduced point mutations into this  $\alpha$ -helix which either lead to a change of charges or to the loss of the structural integrity. The phenotype of the respective mutants regarding their dCPD-binding capacity was bio chemically characterized: whereas altering the amphipathicity remains without any consequences, results disturbing the helical structure in a drastic reduction or in a complete loss of dCPC-interaction. The loss of dCPD-binding competence correlated strictly with cancellation of infectivity of the respective virus on PDHs. Remarkably, hepatocytes bound and internalised undiminishedly these defective mutants. These obtained results corroborate the essential role of dCPD in DHBV infection but disprove clearly its previous postulated function as primary binding- and uptake-receptor.

Synthetic myristoylated peptides comprising the N-terminus of the preS (amino acids 2 to 41) compete extremely efficiently with the DHBV infection. To define the addressed step in the viral entry, antibodies directed against these peptides were generated. These antibodies could as well precipitate viral particles as well as block themselves the infection although antibody binding site (amino acids 12 to 23) does not overlap with the dCPD binding domain and in vitro no detectable interference with dCPD interaction. Thereby it can be concluded that the N-terminal preS part mediates a distinct step in the viral entry which is clearly separated functionally of the preS-dCPD-complex formation.

A shortened variant of the large viral envelope protein is regularly found in DHBV-infected duck livers. Mass spectrometric analysis identified a putative cleavage site in the preS-domain after the Arginines at position 71 and 72. Exchanging both amino acids resulted in a loss of infectivity without any consequences on binding capacity to dCPD and hepatocytes. This result implies a proteolytic processing of the large viral envelope protein as one essential step in viral entry.

From the collected data a multi-stage model of DHBV entry into the host cell can be derived. The viral particle binds a yet unknown factor on the surface of the hepatocytes. Internalisation is followed by the obligatory preS-dependent transfer to dCPD. The postulated proteolytic processing results finally in liberating a fusiogenic peptide which action is inhibited by homologous synthetic peptides.

# 1 Einleitung

#### 1.1 Hepatitis

Unter einer Hepatitis versteht man eine Entzündung der Leber (griech. *hepar*;"Leber" und ...itis). Eine mögliche Ursache dieser Entzündung ist ein viraler Infekt mit einem Hepatitis Virus. Unter den verschiedenen Hepatitis Viren (Hepatitis A, B, C, D, E und G Virus) kommt der Infektion mit dem humanen **H**epatitis-**B**-Virus (HBV) weltweit die größte Bedeutung zu, da 350 Millionen Menschen chronisch infiziert sind, von welchen pro Jahr rund eine Million sterben (Burger et al., 2000; Hollinger et al., 2001; Previsani et al., 2002).

Eine HBV-Infektion führt in Erwachsenen in 95 % zur Ausheilung mit nachfolgender Immunität. Fulminante oder tödliche Verläufe einer akuten Infektion treten selten auf (< 0,1 %). Fünf bis zehn Prozent der Patienten mit akuter Hepatitis B und 90 % der Neugeborenen einer HBV-infizierten Mutter entwickeln eine chronische Hepatitis B, die zur Leberzirrhose und zum Leberkarzinom führen kann. Man geht davon aus, dass in Asien mindestens 23 % und in Afrika acht Prozent der chronischen HBV-Infizierten auf eine perinatale Infektion zurückzuführen sind (Burger et al., 2000; Hollinger and Liang, 2001).

Als präventive Maßnahme bietet sich eine Impfung an. Man unterscheidet aus Serum hergestellte Vakzine (finden in dem hochendemischen asiatischen Raum noch ihren Einsatz, (Hollinger and Liang, 2001)) von rekombinant in Hefezellen hergestellten Vakzine (Valenzuela et al., 1982; McAleer et al., 1984; Wampler et al., 1985), wobei zu beachten bleibt, dass mit dieser Impfung ein Schutz gegen Impfungs-Escape-Mutanten unmöglich ist. Die Infektionen mit Escape-Mutanten sind durch Routine HBsAg-Diagnostik nicht nachweisbar (Wilson et al., 1999). Zusätzlich stellen die hohen Kosten zur Herstellung der Impfung: (Van Damme et al., 1997)).

Zurzeit stellt die HBV-Infektion von Schimpansen (*Pan troglodytes*) das einzige Tiermodell dar, in welchem Tiere mit HBV infiziert werden können. Neben hohen Kosten spricht vor allem der ethische Aspekt dagegen. Als ein alternatives Tiermodell nutzt man deshalb das Enten-Modell mit dem Hepatitis-B-Virus der Ente (engl. *duck Hepatitis-B-Virus*, DHBV) und seinem Wirt der Pekingente (*Anas platyrhynchos forma domestica*). Die Versuchstiere lassen sich einfach halten, und im Gegensatz zur *in vitro* Infektion primärer humaner Hepatozyten mit HBV (Gripon et al., 1988; Galle et al., 1994; Mabit et al., 1996) bieten primäre Entenhepatozyten (engl. *primary duck hepatocytes*, PDHs) ein gutes *in vitro*-Infektionsmodell (Tuttleman et al., 1986a; Pugh et al., 1989).

## 1.2 Hepadnaviren

Das HBV zählt zur Familie *Hepa<u>dna</u>viridae* (*hepato*trope <u>DNA</u>-Viren), die sich durch folgende Gemeinsamkeiten auszeichnet (Übersichtsartikel siehe: (Ganem et al., 2001)):

(1) kleine, membranumhüllte Virionen mit einem 3 bis 3,3-kb großen zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA-Molekül;

(2) das Vorhandensein einer Virion-assoziierten Polymerase, kovalent gebunden am 5'-Ende des kodierenden Stranges (Minusstrang) der partiell doppelsträngigen DNA;

(3) die Produktion eines großen Überschusses **s**ub**v**iraler **P**artikel (SVPs), denen zwar das Nukleokapsid mit dem viralen Genom fehlt, die aber über die Hüllproteine verfügen;

(4) eine ausgeprägte Wirtsspezifität und eine sehr (aber nicht ausschließlich) hepatotrope, persistierende, aber nicht zytopathogene Infektion.

Außer HBV wurden weitere Hepadnaviren isoliert, charakterisiert und in die Genera *Orthohepadnaviren* und *Avihepadnaviren* (lat. *avis*, "Vogel") eingeteilt. *Orthohepadnaviren* infizieren Säugetiere und *Avihepadnaviren* Vögel. In Tabelle 1 sind die Vertreter der zwei Genera aufgeführt, die am besten untersucht wurden.

Genus	Orthohepadnaviren			Avihepadnaviren	
Virus Erstbeschreibung	<b>HBV</b> (Dane et al., 1970)	WHV (Summers et al., 1978)	<b>GSHV</b> (Marion et al., 1980)	DHBV (Mason et al., 1980)	
Genom	3,2 kb	3,3 kb	3,3 kb	3,0 kb	
ORF	C, P, S, X	C, P, S, X	C, P, S, X	C, P, S	
Wirt	Mensch Schimpanse	Waldmurmeltier	Erdhörnchen Waldmurmeltier gestreiftes Eichhörnchen	Ente Gans	
Replikationsort	Leber Niere Pankreas Leukozyten	Leber Niere Pankreas Leukozyten andere	Leber	Leber Niere Pankreas Leukozyten andere	
Krankheiten	ACS Hepatitis Leberzirrhose Leberzellkarzinom	ACS Hepatitis Leberzellkarzinom	ACS Hepatitis Leberzellkarzinom	ACS Hepatitis	

Tabelle 1: Markante Beispiele der *Hepadnaviridae* Familie. ACS, engl. *asymptomatic carrier status*; DHBV, (engl. *duck*) Hepatitis-B-Virus der Ente; HBV, Hepatitis-B-Virus; GSHV, Erdhörnchen (engl. *ground squirrel*) Hepatitis-Virus; ORF, (engl. *open reading frame*, ORF) offener Leserahmen; WHV, Waldmurmeltier (engl. *woodchuck*) Hepatitis-Virus. (Modifiziert nach (Hollinger and Liang, 2001))

Avihepadnaviren besitzen minimal kleinere Genome, deren Nukleotidsequenzen keine sehr große Homologie zu den Orthohepadnaviren zeigen (Mandart et al., 1984). Bei Orthohepadnaviren wie Avihepadnaviren findet die zur Virionenbildung führende Replikation hauptsächlich in der Leber statt, wobei bei Avihepadnaviren neben dieser Leberinfektion virale Antigene und replikative Zwischenprodukte außerhalb in Niere, Pankreas oder Milz nachweisbar sind (Halpern et al., 1983; Halpern et al., 1984; Halpern et al., 1985; Jilbert et al., 1987; Hosoda et al., 1990). Bei HBV kommt es ebenfalls außerhalb der Leber zur Replikation; der dort vorliegende Virustiter ist für gewöhnlich viel geringer im Vergleich zu DHBV. Die Übertragungswege für HBV sind parenteral (Blut, Blutprodukte, Körperflüssigkeiten, Sexualverkehr, (Mahoney, 1999; Ganem and Schneider, 2001; Hollinger and Liang, 2001)), während DHBV fast ausschließlich vertikal vom Muttertier auf die Eier übertragen wird. Weiter unterscheiden sich HBV und DHBV hinsichtlich ihrer Hüllproteine (Pugh et al., 1987; Schlicht et al., 1987), des Vorliegens eines klassischen X-offenen Leserahmens (bei DHBV wurde ein "hidden" X-Leserahmen beschrieben, (Chang et al., 2001)), und der Identifizierung eines Rezeptormoleküls (Kuroki et al., 1994; Kuroki et al., 1995; Tong et al., 1995).

#### 1.3 Virusaufbau und Genom

HBV und DHBV sind sphärische Partikel, welche sich aus einem ikosaedrichen Nukleokapsid (dem Core), das das virale Genom enthält, und einer äußeren lipidhaltigen Proteinhülle zusammensetzen (siehe Abb. 1 obere Hälfte). Die Proteinhülle unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung. Das HBV verfügt über drei Hüllproteine (L = "*Large*", M = "*Middle*" und S = "*Small*"), wohingegen DHBV nur zwei Hüllproteine (L und S) aufweist.

Im Falle von HBV finden sich in der elektronenmikroskopischen Analyse von Patientenserum drei Arten von Partikeln:

(1) 42 - 47 nm große Partikel, so genannte <u>Dane-Partikel</u> (Dane et al., 1970), die im Innern eine hohe Dichte aufweisen, welche dem Nukleokapsid mit der viralen DNA entspricht,

(2) 20 - 22 nm große <u>Sphären</u>, die in großem Überschuss vorkommen und nur die Hüllproteine M und S enthalten,

(3) 20 - 22 nm dicke <u>Filamente</u> von variabler Länge (200-300 nm), die M, S und in geringer Menge L enthalten.

Sphären und Filamente, auch als SVPs bezeichnet (siehe Abb. 1 untere Hälfte links), findet man im Serum HBV-Infizierter in einem  $10^3 - 10^5$ fachen Überschuss gegenüber den DNA-haltigen, infektiösen *Dane*-Partikeln. Im Vergleich dazu weist das Serum einer DHBV-

infizierten Ente Virionen und nur eine Form SVPs (siehe Abb. 1 rechte Hälfte) mit gleicher Größe (55 nm Durchmesser) auf. Auch hier findet sich ein Überschuss  $(10^3)$  an SVPs gegenüber viralen Partikeln.



Abbildung 1: Schematischer Vergleich der Strukturen von HBV mit DHBV. In der oberen Hälfte sind die Viren, in der unteren die subviralen Partikel gezeigt. Angedeutet ist der größenmäßige Unterschied von HBV zu DHBV. Die partiell doppelsträngige virale DNA ist kovalent an das Terminale Protein (TP Domäne der Polymerase) gebunden und befindet sich im Nukleokapsid (Core). Die Hüllproteine (L, M und S in *Orthohepadnaviren* und L und S in *Avihepadnaviren*) liegen in einer Lipidmembran verankert vor. Des Weiteren findet man bei DHBV das zelluläre Hitze-Schock Protein Hsc70 (Hild, 1997). In den Klammern stehen die apparenten Molekulargewichte der Proteine L, M bzw. S, sowie der unglykolysierten (p) oder glykolysierten (gp) Form.

Allen Hepadnaviren gemeinsam ist eine kompakte Genom-Organisation, in der mehrere offene Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF) teilweise über große Bereiche miteinander überlappen. Dies bedingt, dass jedes Nukleotid mindestens Teil der kodierenden Sequenz eines viralen Proteins ist (siehe Abb. 2, (Nassal et al., 1993)).

Bei HBV findet man vier ORFs: C, P, S und X (vgl. Tab. 1), wohingegen bei DHBV nur drei vorliegen: C, P und S (vgl. Tab. 1). Mittlerweile wurde für DHBV ein "verborgener" (engl. folglich *hidden*) X-ORF beschrieben, der *in vitro* in der Zellkultur zur Expression eines regulatorischen X Proteins führte (Chang et al., 2001). Weitere *in vivo* Experimente mit Enten konnten aber keine bedeutende physiologische Funktion des Genproduktes für die DHBV-Infektion nachweisen (Meier et al., 2003).



**Abbildung 2: Genomorganisation von HBV und DHBV.** Die Kreise symbolisieren von außen nach innen: (sub)genomische RNAs, wobei die Pfeilspitzen Transkriptionsstarts markieren; genomische partiell doppelsträngige DNAs, in denen in Elipsen mit 1 und 2 die *direct repeats* (DR1 und DR2) eingezeichnet sind, sowie mit Enh die Enhancer Elemente; und die Genprodukte C, P, S und X. Das  $\varepsilon$  und D $\varepsilon$  bezeichnen die RNA-Haarnadelstrukturen, die als Verpackungssignale und Replikationsstart für die reverse Transkription dienen. Das D $\varepsilon$  II repräsentiert ein zweites RNA-Element, das bei den *Avihepadnaviren* für die Verpackung essentiell ist. Der rosa farbene Kreis am Minusstrang steht für das terminale Protein der Polymerase (Modifiziert nach (Schultz et al., 2004)).

Beide viralen Genome liegen relaxiert-zirkulär, überwiegend doppelsträngig vor, wobei beide DNA-Stränge nicht perfekt symmetrisch sind. Der virale kodierende Minusstrang der Genome ist jeweils komplett und mit seinem 5'-Ende kovalent an das Terminale Protein (TP) der Polymerase gebunden (Gerlich et al., 1980; Molnar-Kimber et al., 1983). Im Gegensatz dazu ist der Plusstrang jeweils unvollständig und trägt am 5'-Ende ein kurzes Oligoribonukleotid mit mRNA-ähnlicher CAP-Struktur (Lien et al., 1986; Seeger et al., 1986; Will et al., 1987). Im Bereich ihrer 5'-Enden befinden sich kurze direkte Sequenzwiederholungen (engl. *direct repeat*, DR1 und DR2) von 11 Basenpaaren-Länge. Am 5'-Ende des Minusstrangs liegt der DR1. Der Plusstrang beginnt mit dem DR2 (Molnar-Kimber et al., 1983; Lien et al., 1986; Seeger et al., 1986; Will et al., 1987). Beide DRs spielen eine wichtige Rolle beim Priming und der Initiierung der Synthese ihrer entsprechenden DNA-Stränge. Bei HBV werden die vier ORFs durch zwei Enhancer Elemente (s. Abb. 2 Enh I und Enh II) und vier Promotoren (preS1 Promotor, preS2/S Promotor, preC/C Promotor und X Promotor) kontrolliert, die zur Transkription der entsprechenden Gene führen (Cattaneo et al., 1983; Siddiqui et al., 1986; Antonucci et al., 1989; Honigwachs et al., 1989; Guo et al., 1991). Die Transkription vom

preC/C Promotor ist dabei sehr leberspezifisch (Honigwachs et al., 1989; Raney et al., 1997). Die Leberspezifität des preS1 Promotors beruht auf seiner Abhängigkeit vom in der Leber angereichert vorkommenden Transkriptionsfaktor HNF 1 (engl. *hepatocyte nuclear factor* 1, HNF1, (Courtois et al., 1988). Die Kompaktheit des Genoms mit seinen Promotoren und Enhancern innerhalb kodierender und damit überlappender Bereiche erfordert komplexe regulatorische Kontrollen. Studien zeigten u.a. das Herunterregulieren des preS1 Promotors bewirkt durch den S Promotor (Bulla et al., 1988; Lu et al., 1995) zur Kontrolle der Menge des L Proteins, welches für seinen inhibitorischen Effekt auf die Virussekretion bekannt ist.

Der C-Leserahmen besitzt zwei Translationsstartkodons, von denen das erste Start-Kodon zur Synthese des preCore-Proteins führt, das nach Prozessierung und posttranslationeller Modifikation als e-Antigen (HBeAg bzw. DHBeAg) sezerniert wird (Takahashi et al., 1983; Schlicht et al., 1987; Bruss et al., 1988; Garcia et al., 1988). Die Menge des ins Serum sezernierten e-Antigens spiegelt dabei die Menge der prägenomischen RNA wider, da diese der Translation des preCore-Proteins und des e-Antigens zu Grunde liegt (Yokosuka et al., 1988; Schneider et al., 1991). Folglich kann das e-Antigen im immunologischen Nachweis als Infektionsmarker genutzt werden (Mushahwar et al., 1978; Mushahwar et al., 1981, Rigg et al., 1992). Das Core Protein wird vom zweiten Start-Kodon synthetisiert (HBcAg bzw. DHBcAg) (Pasek et al., 1979) und besitzt eine zwei-Domänen-Struktur: die größere Nterminale Domäne besitzt die Fähigkeit zu aggregieren, während die C-terminale Argininreiche Domäne Nukleinsäure zu binden vermag. Eine Funktion des Core Proteins liegt in der Bildung des Nukleokapsids, welches schützend das virale Genom umgibt. Dieser Schritt der Verpackung der endogenen Polymerase und des viralen Genoms wird von der Polymerase selbst vermittelt (Hirsch et al., 1990). Eine weitere Funktion ist der Transport des Genoms zum Kern, in dem es zur Schließung und Bildung der kovalent geschlossenen zirkulären DNA (engl. covalently closed circular DNA, cccDNA) kommt. Im Fall des HBV wird dies in einem Importin  $\alpha/\beta$ -abhängigen Prozess durch ein oder mehrere Kernlokalisierungssignale (engl. *nuclear localization signals*, NLS) im Arginin-reichen C-terminalen Bereich vermittelt (Kann et al., 1999). Dies zeigt die Vielfalt der Funktionen des Core Proteins, welche immer reversibel sein müssen, um den vollständigen Infektionszyklus zu gewährleisten. Core Proteine müssen sowohl assemblieren als auch zerfallen können; es müssen genomische Nukleinsäuren gebunden und freigesetzt werden; dem Transport des viralen Genoms muss, falls die Replikation es erfordert, ein Export folgen, in Folge dessen neu gebildete Viren freigesetzt werden. Es gibt zwei mögliche, sich offensichtlich gegenseitig beeinflussende Kontrollstufen: die quartäre Struktur (assembliert gegenüber unassembliert) und chemische Modifikationen. Ein wichtiger Regulationsmechanismus scheint die Phosphorylierung des Core Proteins durch verschiedene Kinasen, einschließlich der **P**rotein**k**inase **C** (PKC; (Kann et al., 1993)), zu sein, dessen Hauptphosphorylierungsstellen im Arginin-reichen C-terminalen Bereich liegen. Es handelt sich um Serine und Threonine, denen ein Prolin folgt (HBc: S155, S162, S170; DHBc: T139, S245, S257, S259).

Für die Umhüllung des Nukleokapsids (Cores) ist die spezifische Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen preS des L mit dem Nukleokapsid wichtig (Bruss et al., 1995; Summers et al., 1991).

Der <u>P-Leserahmen</u> ist mit ca. 80 % des gesamten Genoms der größte ORF. Er überlappt mit kodiert ein anderen vorhandenen Leserahmen allen und aus drei Domänen zusammengesetztes, multifunktionelles Protein. N-terminal beginnt die Polymerase mit dem über ein Tyrosin kovalent an den Minusstrang-gebundenen TP, mit dem an der prägenomischen RNA die Synthese des DNA-Minusstranges initiiert (Bartenschlager et al., 1988; Bosch et al., 1988). Dem TP folgt eine variable, nicht-essentielle Spacer-Region, die Aminosäureaustausche, Deletionen und Insertionen toleriert (Sprengel et al., 1985; Li et al., 1989; Chang et al., 1990). Dieser Spacer verbindet das TP mit der reversen Transkriptase, die C-terminal über eine RNAseH-Aktivität verfügt (Radziwill et al., 1988; Nassal et al., 1996). Die RNAseH-Aktivität führt zum selektiven Verdau der RNA aus einem DNA/RNA-Hybrid (Radziwill et al., 1990). Eine weitere wichtige Funktion der Polymerase liegt neben der reversen Transkription durch ihre Aktivität einer RNA- und DNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase, (Summers et al., 1982)) in der Verpackung der prägenomischen RNA (Bartenschlager et al., 1990; Hirsch et al., 1990), wozu bereits der Bereich ohne Polymerase Aktivität oder RNAseH Funktion ausreicht (Hirsch et al., 1990; Radziwill et al., 1990).

Der <u>S-Leserahmen</u> (S-ORF) besitzt ähnlich dem C-ORF mehrere Translationsstartkodons und kodiert die viralen Hüllproteine. Bei DHBV führt das erste Start-Kodon zur Synthese des L- und das zweite zur Synthese des S-Proteins (bei HBV: Synthese des L-, des M- und des S-Proteins) mit einem identischen Carboxyterminus (S) und unterschiedlichen N-terminalen (preS) Regionen (Sprengel et al., 1985; Pugh et al., 1987). Die zugrunde liegenden Transkripte nennt man subgenomische RNAs. Bei HBV wurde immunologisch das S als Haupt-Oberflächenantigen (HBsAg) identifiziert und wird im Screening von Patientenserum zum Nachweis einer HBV-Infektion genutzt. Der <u>X-Leserahmen</u> bei den *Orthohepadnaviren* kodiert das X Protein (Miller et al., 1986). Man geht bisher davon aus, dass es als Transkriptionsaktivator eine stimulierende Wirkung auf fremde und hepadnavirale Promotoren nimmt (Spandau et al., 1988; Zahm et al., 1988; Schaller et al., 1991).

#### 1.4 Infektionszyklus

Der Infektionszyklus der Hepadnaviren (schematisch in Abb. 3 für DHBV dargestellt; Übersichtsartikel siehe (Ganem and Schneider, 2001)) beginnt mit der spezifischen Bindung der Viren mit ihrer DHBVpreS Domäne auf der Hepatozytenoberfläche (1 in Abb. 3, (Klingmüller, 1992; Klingmüller et al., 1993)). Dem folgt wahrscheinlich die Aufnahme in die Hepatozyte und Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma (2 in Abb. 3). Das Nukleokapsid wird aufgrund eines oder mehrerer Kernlokalisierungssignale an den Zellkern transportiert. Dort wird entweder das Nukleokapsid als Ganzes oder nach Zerfall des Nukleokapsids im Zytoplasma nur die virale DNA über die Kernpore in den Zellkern geschleust (3 in Abb. 3) (Kann et al., 1999)). Wie dieser Transport im Einzelnen abläuft, ist bisher nicht vollständig geklärt. Im Zellkern wird der Einzelstrangbereich des viralen Genoms durch zelluläre Reperaturenzyme zum Doppelstrang komplementiert (Kock et al., 1993) und die Primerstrukturen an den 5'-Enden und der überlappende terminale Bereich des Minusstrangs entfernt. Die Verknüpfung der freien Enden der Stränge durch eine zelluläre Ligase führt zur episomalen kovalent geschlossenen zirkulären Form (cccDNA; 4 in Abb. 3). Die cccDNA kann als erster Marker einer erfolgreichen Infektion nachgewiesen werden (Kock and Schlicht, 1993) und dient der Transkription viraler RNAs durch die zelluläre RNA Polymerase II als episomale Matrize. Dabei entstehen RNAs mit Plusstrangpolarität und einer identischen Polyadenylierungsstelle am Ende (5 in Abb. 3). Die orthohepadnaviralen Transkripte besitzen im Gegensatz zu den avihepadnaviralen so genannte posttranskriptionale regulative Elemente (engl. *posttranscriptional regulatory element*, PRE  $\alpha$  und  $\beta$ ). Diese Elemente sind in der Funktion dem Rev-responsiblen Element von HIV funktionell homolog (Huang et al., 1993). Sie erleichtern als cis-agierende Elemente den Export der RNAs aus dem Zellkern und fördern deren Akkumulation im Zytoplasma, ohne dass es zum Spleißen kommt (Zang et al., 1999). Bei Hepadnaviren unterscheidet man zwei Typen von RNAs: die prägenomische RNA und subgenomische RNAs. Die **p**rägenomische RNA (pgRNA in Abb. 3; HBV: 3,5 kb; DHBV: 3,3 kb) dient sowohl als Matrize der reversen Transkription (Ganem et al., 1987) als auch der Translation des Core-Gens und des P-Gens (7 in Abb. 3) (Cattaneo et al., 1984; Will et al., 1987; Yaginuma et al., 1987). Von den subgenomischen RNAs (HBV

M und S: 2,1 kb, HBV L: 2,4 kb; HBV X: 0,7 kb; DHBV S: 2,13 kb; DHBV L: 2,35 kb) werden die Hüllproteine translatiert (7 in Abb. 3). Dem Export der prägenomischen und subgenomischen RNAs in das Zytoplasma (6 in Abb. 3) folgt die Translation. Die Verpackung der pgRNA (8 in Abb. 3) beruht auf einer spezifischen Chaperon-vermittelten Interaktion zwischen der Polymerase und der 5'-gelegenen RNA-Haarnadelstruktur (engl. stem loop structure)  $\varepsilon$  der pgRNA ( $\varepsilon$  = Verpackungssignal) (Bartenschlager et al., 1990; Hirsch et al., 1990; Junker-Niepmann et al., 1990; Chiang et al., 1992; Pollack et al., 1993). Für diesen Schritt der Bildung des Polymerase-ε-Ribonukleoproteins (RNP) sind im Falle des DHBV Hsp90 (Hitze-Schock Protein 90), dessen Kofaktor p23 und ATP notwendig (Hu et al., 1996; Hu et al., 1997). Man vermutet, dass der N-terminale Bereich der Polymerase die pgRNA bindet, und der freie C-terminale Bereich direkt oder indirekt mit sich zusammenlagernden Core Proteinen interagiert. Im P-E-Komplex liegt die Polymerase in einer geänderten und wahrscheinlich durch die Chaperone stabilisierten Konformation vor, welche für die weitere Interaktion mit Core Proteinen erforderlich ist (Tavis et al., 1996). Bei DHBV ist das Verpackungssignal  $\varepsilon$  zwar notwendig, aber noch nicht für die Verpackung ausreichend. Das am 3'-Ende vorliegende redundante Dɛ ist ebenso wichtig (Hirsch et al., 1991; Calvert et al., 1994). Interessanterweise ist nur  $\varepsilon$  bei der Verpackung der RNA funktionell, da Deletionen des Dɛ keinen Einfluss auf die virale Replikation nehmen (Hirsch et al., 1991). Daraus folgt die selektive Verpackung der RNA mit einem ε am 5'-Ende (pgRNA) (Enders et al., 1985). Nun beginnt mit der Synthese des Minusstrangs die reverse Transkription (9 in Abb. 3). Neuere Ergebnisse zeigen die Teilnahme der Hyroxylgruppe des Tyrosins 96 des TP der Polymerase und folglich der Polymerase selbst als Primer bei der reversen Transkription (Weber et al., 1994; Zoulim et al., 1994), deren Template  $\varepsilon$  ist (Pollack et al., 1994). Nach Polymerase-ɛ Bindung läuft der Initiierungsschritt in der ɛ-Haarnadel ab, mit der Bildung eines an der Polymerase-gebundenen Oligonukleotids von ca. 4 Nukleotiden. Da die Sequenzen des entsprechenden Bereich der E-Haarnadel und des DR1 vier identische Nukleotide aufweisen, kann das generierte DNA-Produkt dorthin zum 3'-Ende wechseln und annealen. Die DNA mit den DR1 Sequenzen wird dann durch übliche Elongationsmechanismen verlängert und es entsteht der komplette Minusstrang (Wang et al., 1993; Tavis et al., 1994; Tavis et al., 1995). Nach Ende der Synthese des Minusstranges mit dem am 5'-Ende kovalent gebunden TP (Molnar-Kimber et al., 1983; Bosch et al., 1988), folgt durch die RNAseH Aktivität der Polymerase der Abbau der prägenomischen RNA bis auf ein kleines 15 - 18 Nukleotid-großes RNA-Oligomer mit CAP-Struktur (10 in Abb. 3).

Dieses Oligomer wechselt seine Position und annealt mit dem DR2, wo es als Primer der Plusstrangsynthese (**11** in Abb. 3) dient. Die Plusstrangsynthese beginnt am DR2 (Lien et al., 1986; Seeger et al., 1986; Will et al., 1987) und verläuft unvollständig (bei DHBV immerhin zu 80 %, (Molnar-Kimber et al., 1983; Lien et al., 1987)), wodurch die für Hepadnaviren typische Lücke und folglich die nicht geschlossene DNA-Form entsteht. Abschließend umhüllen die am Endoplasmatischen **R**etikulum (ER) translatierten viralen Hüllproteine (**12** in Abb. 3) die Nukleokapside und die Virionen werden über das ER und den Golgi-Apparat aus der Hepatozyte sezerniert (**13** in Abb. 3, (Patzer et al., 1984; Roingeard et al., 1998)). Alternativ kommt es zum Rücktransport der Nukleokapside in den Zellkern, um den cccDNA-Pool zu steigern (Tuttleman et al., 1986b). Im Falle des DHBV vermutet man eine Regulation der Sekretion gegenüber dem Reimport in den Nukleus durch die Verfügbarkeit des L-Proteins (Summers et al., 1990).



Abbildung 3: Schema des hepadnaviralen Infektionszyklus am Beispiel des DHBV. 1: Bindung der Partikel an der Hepatozytenoberfläche, 2: Aufnahme in die Zelle, 3: Transport des Nukleokapsids an den Zellkern und Einschleusen des viralen Genoms in den Zellkern; 4: Umbau zur cccDNA; 5: Transkription; 6: Export der pgRNA und der subgenomischen RNAs ins Zytoplasma; 7: Translation der RNAs; 8: Verpackung der pgRNA und der Polymerase in unreife Nukleokapside; 9: Synthese des Minusstrangs (reverse Transkription); 10: Abbau der pgRNA durch RNAseH Aktivität der Polymerase; 11: Plusstrangsynthese; 12: Knospung ins ER und

Ausschleusen über das Golgi Kompartment, **13:** Sekretion der Viren und SVPs. cccDNA: kovalent geschlossene zirkuläre DNA; ER: Endpolasmatisches Retikulum; pgRNA: prägenomische RNA.

# 1.5 Hüllproteine

Die hepadnaviralen Hüllproteine zeichnen sich durch den identischen C-terminal-gelegenen, hydrophoben S-Teil (HBV: 226 **A**mino**s**äuren (AS); DHBV: 167 AS) und den N-terminalen preS-Teil (HBV (Heermann et al., 1984); DHBV: 161 AS; (Pugh et al., 1987; Schlicht et al., 1987) aus. Bei HBV ist der HBVpreS-Teil weiter in HBVpreS1 (108 bzw. 119 AS je nach Subtyp) und HBVpreS2 (55 AS) unterteilt. Obwohl die DHBV Hüllproteine potentielle Glykosylierungsstellen aufweisen, existieren nur bei HBV die Hüllproteine in glykosylierter und unglykosylierter Form (siehe Abb. 1, (Pugh et al., 1987)). Als weiteres Merkmal findet sich bei allen Hepadnaviren am Aminoterminus des großen Hüllproteins ein Myristylierungs-Signal (M-G) mit Modifikation mit Myristinsäure (Persing et al., 1987; Macrae et al., 1991). Diese Modifikation unterstützt wahrscheinlich die Verankerung des L in der Membran (Persing et al., 1987; Ostapchuk et al., 1994) und ist für eine Infektion essentiell (Macrae et al., 1991; Gripon et al., 1995; Bruss et al., 1996a).

Das multiple Alignment der Aminosäuresequenzen DHBV L, Graureiher (Heron) HHBV L und HBV L (siehe Abb. 4) zeigt ein im Fall von HBV der antigenen (a-) Determinante des HBV S entsprechenden (Feitelson et al., 1981), deletierten Bereich von 54 Aminosäuren bei den beiden Vertretern der *Avihepadnaviren*. Der preS-Teil des HBV L hat keine (nur 7 %) Homologie zu DHBVpreS, welche im Gegensatz dazu zwischen HHBVpreS und DHBVpreS bei 53 % liegt. Der Vergleich der S-Teile der drei Virusvertreter zeigt bei HBV S 32 % und bei HHBV S 86 % Homologie zu DHBV S. Die entsprechend identischen Aminosäuren des HBV S liegen dabei überwiegend in den transmembranen Regionen TM1 und TM2 des DHBV L.

Siehe auf der Folgeseite Abb. 4: Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen des HHBV L, DHBV L und HBV L. Das Alignment wurde auf der Website <u>http://www.ebi.ac.uk/clustalw</u> durchgeführt. Links stehen in Klammern die entsprechenden Accession- bzw. EMBL-Nummern der Aminosäuresequenzen hinter den Namen der Virusisolate HHBV4, (Heron HBV, Graureiher Hepatitis-B-Virus, (Sprengel et al., 1988), DHBV16 (Mandart et al., 1984) und HBV ayw (Galibert et al., 1979). Der Beginn (Methionin) der entsprechenden Proteinabschnitte ist in dicker (bzw. bei HBVpreS2 in kursiver) Schrift hervorgehoben. In der HBV-Aminosäuresequenz wurde die antigene Determinante im HBV S mit einem Rahmen um die Buchstaben gekennzeichnet (Feitelson et al., 1981). Die unterbrochenen Boxen verdeutlichen die transmembranen Regionen (TM 1-3), die für DHBV16 vorhergesagt werden (siehe Abb. 5 und (Chojnacki et al., 2005)). Mit grauer Hinterlegung wurden in den DHBV- und HHBV-Aminosäuresequenzen identische Aminosäuren markiert. \* entspricht einer in allen Sequenzen identischen Aminosäure, was durch rote Unterlegung optisch hervorgehoben wurde. : entspricht einem konservierten Aminosäure-Austausch. . Entspricht einem semi-konservierten Aminosäure-Austausch.



CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

Die Topologie der großen Hüllproteine liegt sowohl beim HBV L (Ostapchuk et al., 1994; Bruss et al., 1994a; Bruss et al., 1994b; Bruss and Vieluf, 1995) als auch beim DHBV L (Swameye, 1996; Swameye et al., 1997; Guo et al., 1997b) als Ergebnis einer posttranslationalen Translokation in mehreren Formen vor (in Abb. 5 für DHBV gezeigt). Dadurch kann der preS(1)-Teil entweder mit dem Nukleokapsid im Virusinnern als eine interne Matrix ((Bruss, 1997), vgl. interne Topologie, Abb. 5 C, (Chojnacki et al., 2005)) oder mit Rezeptoren auf der Hepatozytenoberfläche als Ligand interagieren ((Tong et al., 1995; Urban et al., 1998), vgl. externe Topologie, Abb. 5 B, (Chojnacki et al., 2005)). Man nimmt eine weitere Zwischenform der L Topologie mit einer preS/TM1 Ausrichtung zwischen interner und externer Orientierung als mögliche Vorstufe für eine Konformationsänderung des L während des Fusionsprozesses an (Abb. 5 D, (Grgacic et al., 200a; Schultz et al., 2004; Chojnacki et al., 2005)).



Abbildung 5: Vorhergesagte Topologien der DHBV Hüllproteine. TM1, TM2 und TM3 sind als nummerierte Zylinder 1, 2 und 3 dargestellt. Die carboxyterminalen Bereiche der DHBV Hüllproteine sind - wie mit unterbrochenen Linie angedeutet - noch nicht vollständig charakterisiert und könnten mehr als einmal die Membran durchspannen. (A) Modell der Topologie des DHBV S. (B) Externe Topologie des DHBV L mit exponiert liegender, translozierter DHBVpreS-Domäne. (C) Interne Topologie des DHBV L mit intern gelegener DHBVpreS -Domäne und TM1. (D) Zwischenform des DHBV L mit teilweise translozierter DHBVpreS-Domäne. Ext., extern; Int., intern. (aus (Chojnacki et al., 2005)

Auf der Grundlage früherer Untersuchungen können verschiedenen Bereichen innerhalb des DHBV L verschiedene Aufgaben zugeordnet werden. Der DHBVpreS-Teil spielt dabei eine wichtige Rolle. Pugh und Kollegen wiesen 1987 mit einem gegen den DHBVpreS-Teil gerichteten polyklonalen Antikörper in in vitro Infektionsinhibitonsversuchen die Notwendigkeit des DHBVpreS-Teil für die DHBV-Infektion primärer Entenhepatozyten nach (Pugh et al., 1987; Summers et al., 1990; Summers et al., 1991). Klingmüller und Kollegen 1993 bekräftigten diese Beobachtung in mit rekombinanten in Hefen hergestellten S- oder L-Partikeln durchgeführten Kompetitionsexperimenten. In diesen Versuchen kompetitierten nur Hefe L-Partikel mit der DHBV-Infektion von PDHs und mit der "Bindung"<sup>125</sup>I-DHBV Partikel an PDHs (Klingmüller and Schaller, 1993). In diesen "Bindungs"-Versuchen wurden <sup>125</sup>I- DHBV Partikel zusammen mit steigenden Mengen Hefe S- oder L-Partikeln für 12 Stunden bei 20°C auf PDHs inkubiert und nach Waschen die Zell-Assoziierte Radioaktivität gemessen und ausgewertet (Klingmüller, 1992; Klingmüller and Schaller, 1993). Die erhaltenen Ergebnisse zeigten erneut die Wichtigkeit des DHBVpreS-Teils des L für die Bindung des DHBV an Hepatozyten und die erfolgreiche Infektion. In einem in vitro Kompetitions-Experiment mit PDHs zeigte Klingmüller mit dem synthetischen Peptid DPS 12 (entspricht DHBVpreS 82 - 121) eine >40 %-ige Inhibition bei einer Konzentration von 100 µM. Im Falle der tetrameren Form DPS 13 ([82 - 121]<sub>4</sub>VP1) reichte zur Inhibition bereits eine Konzentration von 4 µM aus. Diese Ergebnisse weisen auf die besondere Bedeutung des Bereiches AS 82 - 121 des DHBVpreS für die Infektion (Klingmüller, 1992). Antikörper mit Epitopen im immunogenen Bereich AS 82-109 im DHBVpreS verhindern oder reduzieren eine DHBV-Infektion (Pugh et al., 1987; Cheung et al., 1989; Yuasa et al., 1991; Lambert et al., 1991a; Chassot et al., 1994; Pugh et al., 1995; Sunyach et al., 1999) und deuten damit auf die wichtige Rolle dieses Bereiches. Die Modifikation mit Myristinsäure des Aminoterminus

des DHBVpreS ist neben den zuvor genannten Bereichen für die Infektion wichtig, da ein Fehlen der Myristinsäure zur Reduktion der Infektion führt (Macrae et al., 1991; Summers et al., 1991). Als weitere Funktion legt das DHBVpreS die Wirtsspezifität fest (Ishikawa et al., 1995). DHBVpreS reguliert die Umhüllung des Nukleokapsids (Lenhoff et al., 1994a) und kontrolliert den cccDNA Pool, wie mit Mutationen im C-terminalen Bereich des DHBVpreS ermittelt wurde (Summers et al., 1990; Summers et al., 1991; Lenhoff et al., 1994b).

## 1.6 Carboxypeptidase D der Ente

Als Ergebnis der 1993 durchgeführten Bindungsstudien mit radioaktiv-markierten DHBV und SVPs aus Entenserum wurden  $10^4$  hochaffine spezifische Bindungsstellen und  $>10^5$  für die Infektion unspezifische Bindungsstellen auf der Hepatozytenoberfläche ermittelt. Der entsprechende DHBVpreS-Interaktionspartner konnte jedoch mit diesen Versuchen nicht identifiziert werden (Klingmüller and Schaller, 1993). Auf der Suche nach einem möglichen DHBVpreS-Bindepartner in Entenhepatozyten gelang es Kuroki und Kollegen ein Jahr später durch eine Kopräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper (1F6, (Cheung et al., 1989; Yuasa et al., 1991)) gegen das DHBVpreS, einen Komplex aus Viren bzw. SVPs und einem 180 kDa-großen Glykoprotein (gp180) zu isolieren (Kuroki et al., 1994). Eine weitere Kopräzipitation mit einer DHBV-HBV-Chimäre führte zu einer nur an DHBVpreS spezifischgebunden Kopräzipitation des 180 kDa-großen Proteins. Die Spezifität der Interaktion wurde nach vorheriger Kompetition mit nicht-neutralisierenden und neutralisierenden Antikörpern in einer Kopräzipitation überprüft. Neben der Leber fand sich dieses Protein auch in anderen Geweben (Herz, Lunge, Niere, Magen, Darm, (Kuroki et al., 1994)). Ishikawa und Kollegen grenzten mittels GST-DHBVpreS Fusionsproteinen den gp180-Bindebereich im DHBVpreS auf den Bereich AS 43 - 108 ein (Ishikawa et al., 1994). Anfang 1995 isolierten Kuroki und Kollegen ausreichende Mengen gp180 aus Entenlebern und charakterisierten es weiter. Die Analyse der DNA-Sequenz der dazugehörigen cDNA führte zur Zuordnung einer neuen Klasse membranständiger, basischer Carboxypeptidasen (Kuroki et al., 1995). Tong und Kollegen isolierten 1995 mit an Sepharose-gekoppeltem rekombinantem GST-DHBVpreS Protein aus PDH-Lysaten ein dem zuvor isolierten gp180 entsprechendes 170 kDa-großes Protein mit einem Bindebereich im DHBVpreS von AS 87 - 102 (Tong et al., 1995). Zeitgleich isolierten und charakterisierten Song und Fricker eine der Carboxypeptidase Eähnliche Carboxypeptidase aus Rinderhypophyse mit einer 70 % Homologie zur gp180, die sie als Carboxypeptidase D klassifizierten (Song et al., 1995).

Im Folgenden wird gp180 mit dCPD (engl. *duck carboxypeptidase* D, Carboxypeptidase D der Ente) abgekürzt. Die dCPD zählt zu den Typ I Transmembranproteinen und setzt sich aus drei extrazellulären / luminalen Carboxypeptidase-E homologen Domänen (A, B und C) zusammen. An diese drei Domänen schließen sich ein hydrophober Transmembranbereich (20 AS) und ein für die Lokalisation im **t**rans-Golgi-Netzwerk (TGN) und das Retrieval von der Zelloberfläche verantwortlicher, hoch-konservierter zytoplasmatischer Teil (60 AS) an (siehe Abb. 6) (Eng et al., 1999). Wie mit Hilfe von Deletionsmutanten ermittelt, besitzen nur die Domänen A und B eine enzymatische Aktivität (Eng et al., 1998) und die C-Domäne (im Folgenden mit dCPD-C abgekürzt) in Folge des Fehlens der Schlüsselaminosäuren im aktiven Zentrum nicht (Tan et al., 1997). Die C-Domäne reicht unabhängig von einer enzymatischen Aktivität bereits für die DHBVpreS-Bindung aus (Eng et al., 1998). Ausgehend von der Lage der C-Domäne (siehe Abb. 6 A) erfolgt vermutlich nach DHBVpreS-Bindung eines Fusionsprozess (Eng et al., 1998).



Abbildung 6: Schematische Darstellung der Carboxypeptidase D der Ente D mit ihren drei Domänen. (A) Topologie der dCPD. (B) Domänenstruktur der dCPD. TM, Transmembranbereich, CT, zytosolischer (engl. *cytosolic*) Teil.

Folgende Beobachtungen deuten auf eine Rolle der dCPD als ein Rezeptormolekül bei der DHBV-Infektion hin:

 Rekombinante DHBVpreS Proteine, die nicht in der Lage waren, eine DHBV-Infektion zu kompetitieren, waren auch nicht in der Lage, dCPD in biochemischen Bindungsversuchen zu binden. Es wurde ein f
ür eine dCPD-Bindung ausreichender Bereich im DHBVpreS von AS 30 - 115 ausgemacht. Dieser Bereich f
ührte bereits zur Kompetition einer DHBV-Infektion prim
ärer Entenhepatozyten (Breiner et al., 1998; Urban et al., 1998).

- Nach transienter Transfektion von mit DHBV nicht-infizierbarer Zelllinien (z.B. Huh7 Zellen) mit einem dCPD-Expressionsplasmid erfolgte die Aufnahme von DHBV oder rekombinantem DHBVpreS (Breiner et al., 1998).
- Eine lösliche Form der dCPD (engl. *soluble* dCPD, sdCPD) inhibierte *in vitro* die DHBV-Infektion von PDHs (Breiner et al., 1998).
- 4. Biochemische Experimente deuten auf einen 2-Stufen-Mechanismus mit einer 1:1 Stöchiometrie hin: Die sdCPD bindet mit geringer Affinität in einem primären Schritt das DHBVpreS im Bereich AS 86 - 115 und führt zu einem primären Komplex, der durch die fortschreitende Bindung N-terminal gelegener Aminosäuren im DHBVpreS stabilisiert wird und in einem hoch-affinen Komplex resultiert (Urban et al., 1999). Weitere Untersuchungen mit einer löslichen Form der C-Domäne (sdCPD-C) (Urban et al., 2000) ergaben eine Konformationsänderung nach Bindung der sdCPD-C an das rekombinante DHBVpreS Protein AS 30 - 115. In einem auf SPR-basierendem Kompetitionsexperiment (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) reichte bereits das rekombinante DHBVpreS Protein AS 86 - 115 zur Kompetition der Bindung der sdCPD-C an immobiliertes DHBVpreS AS 30 - 115 aus. Für diese Region sagen sekundäre Strukturvorhersageprogramme im DHBVpreS für den Bereich AS 89 - 104 eine alpha-Helix vorher (siehe Abb. 7), wie sie mit Circulardichroismus-(CD)-Spektroskopie (engl. *circular dichroism spectroscopy*) und Kernspinresonanz-(NMR)-Spektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance spectroscopy) nachgewiesen wurde (Urban et al., 2000).
- 5. Ein gegen sdCPD-generierter polyklonaler Antikörper inhibierte die DHBV-Infektion primärer Entenhepatozyten (Urban et al., 2000).
- Eine weitere wichtige Beobachtung war das Herabregulieren der dCPD in DHBVinfizierten Entenlebern und PDHs (Breiner et al., 2001) als Mechanismus zur Verhinderung einer Superinfektion ähnlich wie bei Masern Viren (Krantic et al., 1995; Bartz et al., 1996) oder HIV (Garcia et al., 1991; Lenburg et al., 1993; Mangasarian et al., 1999).



Abbildung 7: Schema des DHBV L. Zu sehen ist der DHBVpreS-Teil mit der N-terminalen Myristinsäure und den Bereichen für die Bindung der dCPD. Die Fortsetzung in den S-Teil ist angedeutet. Die Zahlen unter dem Balken repräsentieren die entsprechenden AS-Positionen. Die zwei  $\alpha$ -Helices sind in roter Farbe hervorgehoben.

Alle diese Beobachtungen weisen auf eine wahrscheinliche Rezeptorfunktion der dCPD hin. Andere Beobachtungen stellen ihre Funktion als alleiniger primärer Rezeptor in Frage:

- 1. Sie wird ubiquitär exprimiert (Kuroki et al., 1994);
- 3. In Vorarbeiten unserer Gruppe (Urban et al., 2002) reduzierte das synthetische myristoylierte DHBVpreS Peptid 2 41<sup>myr</sup> in konzentrationsabhängiger Weise bereits mit einer Konzentration von 70 nM die Infektion von PDHs um 50 %. Eine konzentrationsabhängige Inhibition der Infektion mit dem nicht myristoylierten DHBVpreS Peptid 1 41 führte erst mit einer 100fach höheren Konzentration zur vollständigen Inhibition. Das Unvermögen des synthetischen myristoylierten DHBVpreS Peptides 2 21<sup>myr</sup> selbst bei einer Konzentration von 100 μM eine Infektion zu inhibieren, deutet die Wichtigkeit des Bereichs AS 22 41 im DHBVpreS für die Infektion an. Der Abschnitt überlappt zwar mit dem stabilisierenden Teil der dCPD-Binderegion (siehe Abb. 7), liegt aber außerhalb des essentiellen dCPD-Bindebereiches und spricht wahrscheinlich einen bereits vermuteten Kofaktor an (Urban and Gripon, 2002).

Als ein weiterer entscheidender Schritt nach Aufnahme für die DHBV-Infektion scheint ein proteolytischer Schnitt im DHBV L zu sein. Bei der Analyse von Serumproben oder Leberlysaten DHBV-infizierter Enten im Vergleich zu DHBV-nicht-infizierter Enten ist im anti-DHBVpreS Immunoblot eine Hauptbande bei 36 kDa zu detektieren, die dem DHBV L-Protein entspricht. Oft ist in Leberlysaten und in Serumproben nur sehr schwach ein weiteres DHBVpreS-spezifisches Signal bei 28 kDa zu sehen (Yokosuka et al., 1985; Yokosuka et al., 1988; Fernholz et al., 1993; Bruns et al., 1998; Tong et al., 1999; Funk et al., 2004a). Fernholz und Kollegen wiesen nach, dass das 28 kDa-große Protein nicht durch Translation

von einem internen DHBVpreS AUG entsteht und vermuteten einen proteolytischen Abbau nach Infektion bzw. Aufnahme des Virus (Fernholz et al., 1993).

#### 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der Arbeit war es, dCPD-abhängige und dCPD-unabhängige Schritte bei der DHBV-Infektion näher zu untersuchen.

Unumstritten ist die wichtige Rolle der dCPD bei der DHBV-Infektion. Man hat ihr dabei eine Rolle als primäres Rezeptormolekül bei der Infektion zugewiesen. Um die dabei notwendige dCPD-DHBVpreS-Interaktion näher zu untersuchen, wurden Punktmutationen in der amphipathischen  $\alpha$ -Helix des essentiellen dCPD-Bindebereichs im DHBVpreS eingeführt mit der Folge einer Änderung der Ladungsverteilung oder der Integrität der Helix und in der biochemische Bindungsstudie mit entsprechenden rekombinanten DHBVpreS Proteinen und der sdCPD-C die Auswirkungen evaluiert. Es stellte sich die Frage, inwieweit die so erhaltenen Ergebnisse mit der Infektion von PDHs mit entsprechenden Mutationen-tragenden Viren korrelieren. Abschließend sollte das Bindeverhalten an die Hepatozyten der Viren mit einer in dieser Arbeit etablierten, quantitativen DHBV-spezifische Polymerasekettenreaktion (TaqMan) getestet werden, um ihre Rolle als Bindeprotein zu überprüfen.

Um den Einfluss des N-terminalen Bereichs AS 2 - 41 im DHBVpreS-Teil auf die Infektion näher zu untersuchen, wurden gegen diesen Bereich gerichtete Antikörper bei der Analyse eingesetzt. Zuerst musste der Antikörperbindebereich ermittelt und anschließend ihre Zugänglichkeit für eine Interaktion mit möglichen Bindepartnern auf der Virusoberfläche getestet werden. Daraus folgend sollte die Auswirkung der Antikörper auf die DHBV-Infektion von PDHs und die Interaktion mit der dCPD untersucht werden, um die Bedeutung dieser Region für die Infektion festzustellen.

Um die Frage beantworten zu können, welchen Ursprungs das in DHBV-infizierten Leberproben auftretende 28 kDa-Protein ist, mußte dieses Protein mit Hilfe einer Immunpräzipitation aus einer infizierten Entenleber angereichert und in einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse genauer charakterisiert werden. Basierend auf den dadurch erhaltenen Daten sollten entsprechende Mutanten generiert werden, in denen die vermutete Protease-Schnittstelle geändert wurde, um die Auswirkung auf die Infektiosität aufzuzeigen.

Die aus all den durchgeführten Versuchen erhaltenen Ergebnisse sollten Aufschluss über die frühen Schritte nach Virusaufnahme und die Rolle der dCPD geben.

# Ergebnisse

# 2.1 Einfluss des N-terminalen Bereichs Aminosäure 2 - 22 im DHBV L auf die DHBV-Infektion

Der DHBVpreS-Teil des großen viralen Hüllproteins (L-Protein) spielt bei der Infektion primärer Entenhepatozyten (PDHs) mit DHBV eine bedeutende Rolle (Klingmüller and Schaller, 1993; Urban et al., 1998; Urban et al., 1999; Urban et al., 2000).

Unsere Gruppe wies eine Inhibition der DHBV-Infektion von PDHs nach Zugabe synthetischer DHBVpreS Peptide des N-terminalen Bereich AS 1 - 41 nach. Diese Peptide entsprechen einem außerhalb der essentiellen dCPD-Binderegion liegenden Bereich des DHBVpreS und ihr inhibitorischer Einfluss deutet auf eine dCPD-unabhängige Teilnahme eines Kofaktors (Urban and Gripon, 2002).

Aufbauend auf der oben aufgeführten Beobachtung sollte dieser Prozess näher untersucht werden und der Einfluss von Antikörpern auf die DHBV-Infektion getestet werden. Die Antikörper wurden nach Immunisierung zweier Kaninchen mit den synthetischen DHBVpreS Peptiden 1 - 41 (MT92) und 2 - 41<sup>myr</sup> (MT93) erhalten.

# 2.1.1 Epitop-Bestimmung der Antikörper MT93 und MT92

Nach der Immunisierung von Kaninchen wird ein Gemisch an Antikörpern im Serum erhalten. Zur Feststellung der für die Antikörper-Erkennung relevanten Aminosäuren der DHBVpreS Peptide 2 - 41<sup>myr</sup> bzw. 1 - 41 wurden rekombinant in *Escherichia coli* (M15 [pREP4]) hergestellte und gereinigte DHBVpreS Proteine (Urban et al., 1998; Urban et al., 1999) eingesetzt. Diese Proteine unterschieden sich in ihren N-terminalen und / oder C-terminalen Bereichen oder waren Chimäre mit DHBVpreS- und Graureiher HBVpreS-Anteilen. Ergänzend wurde das Graureiher HBVpreS getestet (Abb. 8). Die Reaktion der Antikörper wurde im Immunoblot (Abb. 9) überprüft.



Abbildung 8: Schema der rekombinanten DHBVpreS Proteine und der Chimären-HHBV-DHBVpreS Proteine. Gezeigt sind im oberen Bereich die DHBVpreS Proteine als graue Balken. Im unteren Bereich sind das Graureiher HHBVpreS Protein als roter Balken und die Chimären als zweifarbige Balken gezeigt. HDC steht für Heron-Duck-Chimera (Graureiher-Ente-Chimäre). Rote Teile entsprechen HHBVpreS-Anteilen und graue DHBVpreS-Anteilen.

Zur Analyse wurden je 4 µg DHBVpreS Protein und 0,8 µg HHBVpreS oder chimäre-preS Proteine in der Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Coomassie-Blau-gefärbten Gele (Abb. 9 A) bestätigten den Auftrag gleicher Proteinmengen. Für den Immunoblot wurden je 75 ng der preS Proteine eingesetzt und die Antikörper MT93 bzw. MT92 in einer Verdünnung von 1:10.000.



Abbildung 9: Analyse der Epitope der Antikörper MT92 und MT93. (A) Je 4 µg rekombinantes DHBVpreS Protein wurde in einem 12,5 %-igem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Der Auftrag war: DHBVpreS 1 - 130, 23 - 130, 23 - 165, 23 - 115,  $\Delta$ 22 - 30, 38 - 115 und 43 - 115; M entspricht dem Größenmarker (Rainbow Low). Zusätzlich wurde in einer weiteren Gelelektrophorese 0,8 µg Graureiher HHBVpreS bzw. Chimäre aus HHBVpreS und DHBVpreS aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. (B) Immunoblot von je 79 ng rekombinantem preS Protein mit MT92 oder MT93 in einer Verdünnung von 1:10.000. Als Zweitantikörper wurde ein PO-Konjugat in der Verdünnung 1:10.000 genutzt.

Wie in Abbildung 9 B zu sehen ist, reagierten beide Antikörper mit hoher Intensität DHBVpreS Proteine mit den Bereich AS 1 bis 22 (Spuren 1 und 5) und abgeschwächt mit DHBVpreS Proteinen ohne die ersten 22 Aminosäuren (Spuren 2, 3 und 4). DHBVpreS Proteine mit Start bei AS 38 erkannten sie nicht (Spuren 6 und 7). Die fehlende Reaktion des MT92 mit DHBVpreS 23 - 115 (Spur 4) liegt an einem Pipettierfehler, wie die Reaktion mit den DHBVpreS Proteinen 23 - 130 und 23 - 165 zeigt.

Aus diesem Ergebnis wurde auf die Lage der Haupt-Epitope vor AS 23 und schwächer reagierende Epitope bis AS 37 geschlossen.

Beide Antikörper detektierten das HHBVpreS Protein (Spur 8) und abgeschwächt die Chimären mit Start AS 22 des DHBVpreS (Spuren 9 und 10) im Vergleich zu den Chimären mit der ersten Aminosäuren des DHBVpreS (Spuren 11 bis 12).

Der Vergleich der preS Aminosäuresequenzen von HHBV mit DHBV zeigt N-terminal bis AS 11 große Unterschiede (Abb. 10) und im übrigen Bereich überwiegend konservierte Aminosäureaustausche. Die zur Reaktion mit HHBVpreS führenden Epitope liegen folglich wahrscheinlich im Bereich AS 12 bis 22.



Abbildung 10: Aminosäuresequenzvergleich der ersten 41 Aminosäuren des DHBVpreS mit den ersten 44 Aminosäuren des HHBVpreS. Für das Graureiher preS (HHBV4) sind nur die sich unterscheidenden Aminosäuren gezeigt, sowie konservierte Aminosäureaustausche orange und semikonservative türkis hinterlegt. In fetter Schrift ist die im DHBVpreS fehlende PEF-Sequenz des HHBV hervorgehoben.

Der Bereich AS 23 bis 37 überlappt mit sieben Aminosäuren mit dem stabilisierenden Teil der dCPD-Binderegion des DHBVpreS. Die Haupt-Epitope der getesteten Antikörper liegen, wie in Abbildung 11 schematisch dargestellt, außerhalb dieser und könnten bei der Infektion einen dCPD-unabhängigen Schritt und Bindeprotein (Kofaktor) ansprechen.



Abbildung 11: Schema der Haupt-Epitope der Antikörper MT92 und MT93 hinsichtlich ihrer Lage im L-Protein. In diesem Schema sind der DHBVpreS-Teil des L-Proteins dargestellt, sowie der weitere Verlauf des S-Proteins angedeutet. Die Haupt-Epitope der beiden Seren liegen N-terminal außerhalb der dCPD-Binderegion (AS 30 – 115). Sie sind unter dem Schema als blauer Balken dargestellt; in Orange ist der HeronpreSerkennende Bereich eingezeichnet. Als rote Rechtecke im grauen Balken sind die alpha-helikalen Bereiche eingezeichnet.

Nach der "Kartierung" der Epitope wurde die Zugänglichkeit dieses Bereichs im viralen Kontext überprüft.

Schlicht und Kollegen konnten 1987 mittels Immunpräzipitation mit dem Antikörper anti-MS2/pre-S virale Partikel aus DHBV-infiziertem Entenserum nachweisen und damit zeigen, dass Proteine, die die DHBVpreS Sequenz enthalten, ein Teil der Virushülle sind (Schlicht et al., 1987). Eine weitere Beobachtung war das Unvermögen des DHBVpreS-spezifischen Antikörpers gegen den Bereich AS 10 bis 29 SVPs zu präzipitieren (Grgacic et al., 2000b). Falls Antikörper die Infektion primärer Entenhepatozyten beeinflussen, wäre es nur über eine Interaktion mit exponierten DHBVpreS-Bereichen im L-Protein möglich, was mit einer Immunpräzipitation mit dem Antikörper MT93 und einem DHBV-positiven Entenserum unter nativen Bedingungen (1 x PBS) überprüft wurde.



Abbildung 12: Immunpräzipitation viraler und subviraler Partikel aus DHBV-positivem Entenserum mit MT93. Im Immunoblot mit den monoklonalen Antikörpern (mAK) 1H1 und 4F8 (in einer Verdünnung von 1:5) wurde das präzipitierte L-Protein der SVPs detektiert. Spur 1: Immunkomplex mit ungereinigtem anti-DHBVpreS MT93; Spur 2: Immunkomplex mit gereinigten IgGs des MT93; Spur 3: Kontrollansatz mit einem polyklonalen Antikörper gegen die humane Carboxypeptidase D (AK 207); Spur 4: Kontrollansatz mit einem polyklonalen Antikörper gegen das humane preS1 (AK #63); Spur 5: Kontrollansatz Präzipitation ohne

Antikörperzugabe; Spur 6 zeigt den Auftrag einer den Immunkomplexen äquivalenten Menge an Pansorbin<sup>®</sup>, um unspezifische Reaktionen von 1H1 und 4F8 mit Pansorbin<sup>®</sup> auszuschliessen.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, konnte MT93 Partikel aus DHBV-positivem Entenserum präzipitieren (Spuren 1 und 2). Die Region AS 12 bis 22 ist an der Oberfläche exponiert. Die schwachsichtbaren Signale in den Kontrollansätzen (Spuren 3 bis 5) entsprechen unspezifisch an Pansorbin-gebundenen Partikeln. Ähnliches wurde bereits für die Präzipitation von Cores mit einem polyklonalen Antikörper und Protein A-Sepharose berichtet (Schlicht et al., 1987).

#### 2.1.2 Infektionsinhibitionsstudie im PDH-DHBV-Infektionsmodell

Nach Überprüfung der exponierten Lage der für die Interaktion der Antikörper MT93 notwendigen Bereiche des DHBVpreS im großen viralen Hüllprotein, wurde der Einfluss beider Antikörper MT92 und MT93 auf die Infektion von PDHs mit DHBV näher untersucht. Dazu wurden zu PDH-Kulturen ansteigende Mengen MT93 bzw. MT92 zupipettiert, anschließend pro Ansatz gleiche Mengen DHBV-positives Entenserum zugegeben und die Zellen über Nacht (ca. 12 Stunden) infiziert.



Abbildung 13: DHBV-Infektion primärer Entenhepatozyten in Anwesenheit steigender Mengen der Antikörper MT93 oder MT92. Die Zugabe von 0,4 µl, 2 µl oder 10 µl MT93 bzw. MT92 erfolgte vor Zugabe des Virusinokulums (Multiplizität der Genomequivalente / MGE von 35). Als Kontrolle diente die Zugabe des Entenserums ohne Zugabe von MT93 bzw. MT92. Am Tag 7 nach Infektion wurden die SVPs und Viren aus dem PDH-Kulturmedium mit Trichloressigsäure (engl. Trichloroacetic acid, TCA) gefällt und im Immunoblot mit dem DHBVpreS-spezifischen Antikörper DO84 (1:10.000) das L-Protein der sezernierten Partikel detektiert.

Die Analyse der sezernierten Viren und SVPs im Immunoblot zeigte, dass die Zugabe der Antikörper konzentrationsabhängig zur Inhibition der Infektion führte (Abb. 13). Bereits die Zugabe von 0,4 µl der Kaninchenseren erzielte eine drastische Reduktion der Infektion im Vergleich zur Kontrollinfektion (vergleiche je die Spuren 1 und 4 mit der Kontrolle Spur 7). Grundlage dieses Effektes könnte die erfolgreiche Interaktion der Antikörper MT92 und MT93 mit dem exponierten N-terminalen preS-Bereich sein mit Folge der vollständigen Inhibition der Infektion. Eine korrespondierende Analyse der intrazellulären viralen DNA in einem DNA-Dotblot führte zu dem identischen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Um diese Beobachtung ausschließlich auf die im Serum enthaltenen Immunglobulin **G** (IgG)-Moleküle beziehen zu können, wurden sie mit Hilfe einer HiTrap-Affinitäts Säule (*amersham pharmacia biotech*) aus dem Serum MT93 isoliert. Damit war die Konzentration der zur Inhibition notwendigen IgGs ermittelbar. Die isolierten IgGs wurden, um sie direkt ins Kulturmedium der PDHs geben zu können, in 1 x PBS dialysiert und die Ausbeute der so erhaltenen IgG-Moleküle unter der Annahme, dass 1,35 A<sub>280nm</sub> 1 mg / ml IgG entsprechen, 1,5 mg / ml IgG ermittelt (amershampharmaciabiotech, 2002). Die Zugabe der IgGs führte zur konzentrationsabhängigen Inhibition. Im Immunoblot mit DHBVpreS- und DHBV S-spezifischen Antikörpern wurden die ins Medium sezernierten Partikel durch den Nachweis der Hüllproteine detektiert (Abb. 14 A). Mit steigender Menge an IgG (jeweils die Spuren 2 bis 6) nahm die Anzahl der nachweisbaren Partikel aufgrund einer spezifischen Inhibition ab, wohingegen im Kontrollansatz ohne Antikörperzusatz (jeweils die Spur 1) eine Infektion erfolgte.

Das Balkendiagramm (Abb. 14 B) zeigt quantitativ die intrazelluläre virale DNA der kompetitierten Ansätze bezogen auf den unkompetitierten Ansatz, der gleich 100 % gesetzt wurde. Darunter ist der zur Auswertung zu Grunde gelegte DNA-Dotblot zu sehen.

Die konzentrationsabhängige Inhibition ist in der Abnahme der Menge intrazellulärer DNA zu sehen (Abb. 14 B). Die Spezifität wurde in einem Kontrollansatz mit der Zugabe eines Präimmunserums getestet ohne ein Zeichen einer Inhibition. Zu jedem Ansatz wurden  $4,5x10^7$  Viren + 1000fachen Überschuss SVPs (MGE von 22,5) zugegeben. Unter der Annahme des Vorliegens von 20 L-Proteinen pro Partikel (Schlicht et al., 1987; Klingmüller and Schaller, 1993), von denen nur die Hälfte nach außen exponiert vorliegen (Swameye, 1996; Swameye and Schaller, 1997), wurden bei einer Konzentration von 435 ng IgG (entsprechen 1,75 x  $10^{12}$  IgG-Molekülen)  $4,5 \times 10^{11}$  L-Moleküle kompetitiert bzw. pro L-Molekül kompetitierten 4 IgG-Moleküle.



Abbildung 14: Analyse der Inhibition der DHBV-Infektion primärer Entenhepatozyten in Anwesenheit steigender Mengen gereinigter IgGs des MT93. Zu 2x10<sup>6</sup> PDHs wurden vor Zugabe des DHBV-positiven Entenserums (MGE von 22,5) ansteigende Mengen an gereinigtem IgG (aus MT93) zugegeben und über Nacht (ca. 12 Stunden) inkubiert. Die Infektionskulturen wurden am Tag 6 nach Infektion beendet. (A) Immunoblot der ins Medium abgegebenen SVPs und Viren mit Nachweis des DHBV L bzw. DHBV S mit dem DHBVpreS-spezifischen Antikörper DO84 (links) bzw. dem DHBV S-spezifischen Antikörper 7C12. (B) Graphische Darstellung der Auswertung des gescannten DNA-Dotblots, der dem Nachweis der intrazellulären viralen DNA diente. (C) DNA-Dotblot einer Kontrollinfektion nach Zugabe des Präimmunserums des dCPD-spezifischen Antikörper 341606.
#### 2.1.3 In vitro Bindungsstudie mit fluoreszenz-markierten DHBVpreS 1 - 130

Um die Inhibition aufgrund einer sterischen Behinderung der Bindung, Aufnahme und Infektion durch Überdecken einer Rezeptorbinderegion gebundener IgG-Moleküle mit ihrem Fc-Teil abzuklären, wurde die humane Hepatoma Zelllinie HepG2 mit Adenoviren (Ad-gp180tl) infiziert, die zur Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP; engl. *green fluorescent protein*) und einer C-terminal deletierten dCPD (engl. *tailless* Mutante, dCPD tl) führte (Breiner et al., 2000). Diese C-terminal deletierte dCPD Mutante akkumuliert aufgrund des Fehlens des zytosolischen Teils an der Zellmembran, da kein intrazellulärer Transport mehr erfolgen kann (Breiner et al., 1998). Die Expression der dCPD tl hat keinen Einfluss auf die virale Replikation in DHBV-infizierten PDHs und blockiert wahrscheinlich durch die Arretierung des Rezeptor-Virus-Komplexes an der Zelloberfläche den Transport der infektiösen Nukleokapside zum Nukleus. Dieser Effekt führt zur drastischen Reduktion der Infektion primärer Entenhepatozyten (Breiner et al., 1998).

Am Tag nach der adenoviralen Transduktion von HepG2-Zellen wurde die Transduktionseffizienz im Mikroskop mit Hilfe des GFP-Signals kontrolliert (Breiner and Schaller, 2000). Rekombinant hergestelltes, Rhodamin-markiertes DHBVpreS Protein 1 - 130 wurde entweder mit dem DHBVpreS-spezifischen MT92 oder 4F8 für 15 Minuten im Dunkeln vorinkubiert und anschließend 2 Stunden bei 37°C zu den HepG2-Zellen gegeben. Im Immunfluoreszenzmikroskop wurden die Zellen ohne vorheriges Fixieren bei einer 200fachen Vergrößerung fotografiert.



Abbildung 15: Adenovirale Transduktion von HepG2-Zellen, die zur Expression von GFP und einer Cterminal deletierten dCPD Mutante führte. Am Folgetag: Inkubation mit einem mit Rhodamin-markierten DHBVpreS Proteins in Ab- oder Anwesenheit von DHBVpreS-spezifischen Antikörpern. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden mit Adenoviren, die zur Expression einer C-terminal deletierten dCPD Mutante und GFP führten, infiziert. Am Tag nach der Infektion wurde die Transduktionseffizienz durch Kontrolle der GFP-Expression mikroskopisch kontrolliert. 5  $\mu$ l Rhodamin-markiertes DHBVpreS Protein 1 - 130 wurde entweder mit 100  $\mu$ l 4F8 (Hybridomüberstand)oder 2  $\mu$ l MT92 für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend für zwei Stunden auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop ohne vorheriges Fixieren (lebend) bei einer 200fachen Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die mit Rhodamin-markierten DHBVpreS Proteine sind deutlich granulär auf den grünleuchtenden HepG2-Zellen zu erkennen (Abbildung 15). Die Anwesenheit des DHBVpreSspezifischen **m**onoklonalen Antikörpers (mAK) 4F8, dessen Epitop im Bereich der dCPD-Binderegion liegt (Urban et al., 2000; Rothmann, 1998), behindert die Bindung Rhodaminmarkierten DHBVpreS und ermöglicht durch Waschen mit PBS das Entfernen von den Zellen. Im Vergleich dazu stört der Antikörper MT92 nicht die Bindung des Rhodaminmarkierten DHBVpreS Proteins an die Ad GFP dCPD tl infizierten HepG2-Zellen.

Die Antikörper MT92 und MT93 adressieren bei der DHBV-Infektion einen dCPDunabhängigen Schritt.

### 2.2 Untersuchung der Rolle der Carboxypeptidase D der Ente bei Bindung, Aufnahme und Infektion

Im Bereich AS 89 - 104 der preS Sequenzen verschiedener DHBV-Isolate und eines Graureiher-Isolates stimmen in allen DHBV Sequenzen in der essentiellen dCPD-Binderegion (Aminosäure 86-115) zu 100 % und zu 63 % mit dem Graureiher preS (Abb. 16) überein. Diese Konserviertheit des Bereichs spricht für eine wichtige Rolle bei der Interaktion des DHBVpreS mit primären Entenhepatozyten.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung des DHBVpreS-Teils des L-Proteins.** Unter dem Schema des L-Proteins (vgl. Abb. 7) ist die Aminosäuresequenz von AS 89 - 104 gezeigt. Da dieser Bereich bei den DHBV-Isolaten 16, 3, 1, 22 und 26 identisch ist, wurde er nur mit DHBV bezeichnet. Darunter ist die HHBV4 Sequenz mit den abweichenden Aminosäuren zu sehen, sowie die konservierten Aminosäureaustausche orange hinterlegt.

Lambert und Kollegen hatten auf verschiedenen Algorithmen-basierend 1990 einen alphahelikalen Bereich im DHBVpreS von Aminosäure 92 bis 100 vermutet (Lambert et al., 1990). Unsere Arbeitsgruppe ermittelte im Jahr 2000 mit Circulardichroismus (CD)- und Kernspinresonanz (NMR)-spektroskopischen Analysen des Peptides DHBVpreS 30 - 115 eine alpha-helikale Struktur für den Bereich AS 89 bis 104 (vergleiche Abb. 16). Die Darstellung in einem alpha-helikalen Rad (engl. *helical wheel*) verdeutlicht das Vorliegen einer Amphipathizität dieser Helix mit sich abwechselnden Ladungen entlang der Achse (Abbildung 17 B; entnommen und modifiziert aus (Urban et al., 2000)). Dessen bewusst, sollte unter Berücksichtigung der essentiellen Binderegion der Carboxypeptidase D der Ente geklärt werden, welche Folgen die Änderung der Amphipathizität oder Integrität der Helix auf die Bindung, Aufnahme und Infektion primärer Entenhepatozyten hat.

#### 2.2.1 Aminosäureaustausche in der alpha-Helix Aminosäure 89 bis 104

In Abbildung 17 A sind die durchgeführten Aminosäureaustausche aufgelistet. Dabei wurden zur Änderung der Amphipathizität saure Aminosäuren wie Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D) zu unpolaren wie Valin (V) oder polaren wie Glutamin (Q) ausgetauscht. Zur Änderung der Integrität wurden Aminosäuren, z.B. das basische Arginin (R) oder das polare Glutamin (Q), mit dem Helix-Brecher Prolin (P) getauscht.

Der Austausch einer Aminosäure im DHBVpreS-Leserahmen wurde bewusst ohne Änderung des überlappenden Polymerase-Leserahmens in dem DHBV16 Genom enthaltenden Plasmid pCD0 gewählt. Eine Ausnahme war der Austausch D93Q mit der Änderung im Polymerase-Leserahmen und Aminosäureaustausch RP310,311TA.



Abbildung 17: Aminosäureaustausche in der Helix AS 89 bis 104 des DHBVpreS-Teils. (A) Übersicht über die Aminosäuren, die mit Hilfe der gene SOEing Polymerasekettenreaktion (Horton et al., 1990) ausgetauscht wurden. (B) Alpha-helicales Rad dieses Bereichs. Zu erkennen ist die Amphipathizität der alpha-Helix. Hydrophobe Aminosäuren sind gerahmt, basische sind in blauer Schriftfarbe hervorgehoben und unterstrichen, und saure sind kursiv und mit roter Schriftfarbe hervorgehoben (Modifiziert nach (Urban et al., 2000)).

Die Klonierungsstrategie für die Herstellung von DHBVpreS Proteinen und Punktmutanten war die folgende: wie in Abbildung 18 zu sehen ist, wurde das Plasmid pQE8 DHBV16preS 1 - 165 (Urban et al., 1998) mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *Kpn I* geschnitten und dadurch der Vektor pQE8 ohne die DHBVpreS-Sequenz erhalten. Der vorbereitete "Vektor" wurde mit dem nach einer gene SOEing PCR (siehe Material und Methoden) erhaltenen und verdauten Fragment ligiert. Die nach Transformation und Selektion erhaltenen Klone wurden

durch Restriktionsanalyse und Sequenzierungsanalyse bestätigt und in der Expression der DHBVpreS Proteine in Zweiliter-Kulturen eingesetzt.



Abbildung 18: Schema des Plasmides pQE8 DHBV16preS 1 - 165, das der Klonierungsstrategie zu Grunde lag. Die Darstellung ist aus (Urban et al., 1998) entnommen und wurde modifiziert. Das Plasmid pQE8 DHBV16preS 1 - 165 enthält die DHBV16preS Sequenz, sowie die ersten vier Aminosäuren des S Proteins. Die Aminosäuren stehen im Ein-Buchstaben-Code über der entsprechenden Nukleotidsequenz. Durch einen Rahmen hervorgehoben ist der *KpnI/Hind III* Linker, mit welchem eine *KpnI*-Schnittstelle in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE8 (QIAGEN) eingefügt wurde. Rot gekennzeichnet sind die für die in dieser Arbeit genutzten Subklonierung gewählten Restriktionsenzyme, mit denen das Ausgangsplasmid für die anschließende Subklonierung geschnitten wurde.

Die Expression wurde in Anlehnung an Urban et al. (Urban et al., 1998) durchgeführt, und der erste Reinigungsschritt erfolgte mit einer immobilisierten Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Für die Reinigung der Wildtyp (DHBVpreS 1 - 165), DHBVpreS D93Q, DHBVpreS E91V und DHBVpreS E98V Proteine wurde Nickel NTA-Agarose der Firma QIAGEN und für die Reinigung der DHBVpreS R101P, DHBVpreS R102P, DHBVpreS EE91,98VV und DHBVpreS Q104P Proteine Talon-Beads der Firma BD Biosciences Clontech eingesetzt. Im Folgenden werden alle DHBVpreS Proteine mit der Nennung des Aminosäureaustausches abgekürzt. Die Abbildung 19. zeigt als Beispiel die nach Reinigung mittels IMAC erzielte

abgekürzt. Die Abbildung 19 zeigt als Beispiel die nach Reinigung mittels IMAC erzielte effiziente Anreicherung des 21 kDa-großen DHBVpreS Proteins EE91,98VV von anderen löslichen Proteinen (vgl. Spuren 5 und 6 mit Spuren 1 und 2).



Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse zur Aufreinigung der DHBVpreS Proteine durch immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie am Beispiel des EE91,98VV. In der als Beispiel gezeigten Aufreinigung wurden je 5 µl Gelprobe aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Blau R250 angefärbt. Der Pfeil zeigt auf die DHBVpreS Proteinbande. M entspricht dem Größenstandard (Rainbow Low Marker).

Um möglichst reine Proteine zu erhalten, folgte als weiterer Reinigungsschritt eine Gelfiltration mit den nach der IMAC gepoolten Eluaten auf einer Superdex 200 Säule. Abbildung 20 zeigt beispielhaft einen Gelfiltrationslauf für R102P. Das nach Gelfiltration erhaltene Protein lief in den Fraktionen 21 bis 23 und zeigte die gewünschte Abtrennung der DHBVpreS Proteine von Verunreinigungen mit kleineren Fragmenten (vgl. Spur A für den Auftrag mit den Fraktionen 21 bis 23).

Für die folgend gezeigten Versuche wurde jeweils die Fraktion 22 der Gelfiltration mit dem größten Proteingehalt gewählt. Die typische Ausbeute solch gereinigter DHBVpreS Proteine liegt bei 10 - 20 mg / 1 - Medium.



Abbildung 20: Gelfiltrationslauf mit den nach IMAC erhaltenen Eluaten des R102P. Die Hauptausbeute an Protein während der Gelfiltration liegt in den Fraktionen 21 bis 23, wie die Coomassie-Färbung der Proteine nach Trennung mit einer SDS-PAGE bestätigt. (A) Als Beispiel gezeigt ist das Elutionsprofil des Sephacryl S200-Gelfiltrationlaufes mit dem nach IMAC erhaltenen Eluat 2 von R102P. Die Nummern der gesammelten Fraktionen, sowie Start (=Auftrag auf die Säule) und Stopp (=Ende der Fraktionensammlung) der Gelfiltration sind in das Elutionsprofil eingezeichnet. Das Auftragsvolumen waren 3 ml; (B) je 1/1200 (5  $\mu$ l) der nach Gelfiltration erhaltenen Fraktionen wurden in einem 13 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli) getrennt und mit Coomassie-Blau R250 angefärbt. A entspricht 1/600 des auf die Säule gegebenen Eluates. M entspricht dem Größenmarker (Rainbow Low Marker). Der Laufpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 4 M Harnstoff, 150 mM NaCl und 25 mM NaPi (pH 7,4). Die Flussrate lag bei 3 ml / min.

Zur Kontrolle der Reinheit aller mittels Gelfiltration gereinigten DHBVpreS Proteine wurden je 0,8  $\mu$ g Protein in einem 14 %-igen SDS-Polyacrylamidgel in der Gelelektrophorese getrennt. Die Konzentration der einzelnen Proteine wurde durch Messung der **o**ptischen **D**ichte (OD<sub>280nm</sub>) basierend auf dem Extinktionskoeffizienten (der Wert OD<sub>280nm</sub> von 1 entspricht 0,78 mg / ml DHBVpreS Protein) berechnet. Da weder Tryptophane noch Phenylalanine ausgetauscht wurden, waren alle Extinktionskoeffizienten gleich. Das Anfärben des Polyacrylamidgeles mit Coomassie-Blau zeigte die Beladung mit gleichen Mengen der Proteine und die gewünschte Reinheit. In Abbildung 21 A ist nach Austausch einzelner Aminosäuren im Vergleich mit dem Wildtyp (DHBVpreS 1-165 bzw. wt) eine Änderung der Mobilität im SDS-PAGE zu erkennen und erfolgte Aminosäureaustausche teilweise bereits nach Anfärben des SDS-Geles mit Coomassie-Blau sichtbar.

Mit dem Entfernen der positiven Ladung (basische Arginine R101 und R102) gegen ein hydrophobes Prolin ändert sich das Laufverhalten aufgrund des Verlustes der präferentiellen an basische Aminosäuren bindenden SDS-Anlagerung und verlangsamte die Mobilität der Mutanten R101P und R102P. Das im Vergleich mit dem Wildtyp beschleunigte Laufverhalten der Mutante D93Q liegt an der Verwendung bei der Subklonierung eines Restriktions-Primers, der zur Einführung eines Stopp-Kodons und einer Verkürzung des DHBVpreS Proteins um 5 Aminosäuren (K161 - T165; entspricht ca. 0,6 kDa) führt. Der gewünschte Aminosäureaustausch (D93Q) wurde jedoch in die DHBVpreS Sequenz eingefügt, und die letzten vier Aminosäuren gehörten dem S-Protein an. Entsprechend konnten die Versuche mit dem gereinigten DHBVpreS Protein D93Q durchgeführt werden.



anti-DHBVpreS 4F8

Abbildung 21: Analyse der nach Gelfiltration erhaltenen DHBVpreS Proteine mit einem Coomassiegefärbten PA-Gel und Immunoblot mit monoklonalen DHBVpreS-spezifischen Antikörpern, die die Infektion von PDHs mit DHBV neutralisieren können. (A) Coomassie-Färbung der Proteine im PA-Gel. (B) Analoger immunologischer Nachweis der Proteine mit dem DHBVpreS-spezifischen mAK 1H1 (Hybridomüberstand). (C) Gleiche Vorgehensweise wie in (B) nur unter Verwendung des DHBVpreSspezifischen mAK 4F8 (Hybridomüberstand). M entspricht dem Größenmarker (Rainbow Low Marker). Parallel zu dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel wurden je 500 ng Protein für die Analyse im Immunoblot eingesetzt und die Reaktion der auf die Infektion von PDHs mit DHBV neutralisierend wirkenden Antikörper 1H1 (Pugh et al., 1995) und 4F8 (Hybridomüberstände) getestet. Der monoklonale Antikörper 1H1 reagierte nicht mit R101P, R102P und Q104P (Abb. 21 B). Sein Haupt-Epitop liegt folglich in diesem Bereich. Die bei der Deletionsmutante  $\Delta$ 101-109 beobachtete sehr schwache Reaktion liegt an einem Überlaufen der Gelprobe des Wildtyps in die Spur der Deletionsmutante DHBVpreS  $\Delta$ 101-109 beim Probenauftrag. In einem weiteren Immunoblot detektierte dieser Antikörper die Deletionsmutante  $\Delta$ 101-109 nicht.

Der Antikörper 4F8 reagierte sehr abgeschwächt mit der Deletionsmutante (Abb.21 C). Seine Epitope liegen folglich in diesem Bereich. In der Literatur ist sein Epitop mit 95-KAREAFRRYQE-105 im DHBVpreS-Teil des L-Proteins (Urban et al., 2000) bzw. den AS 100-105 (Rothmann, 1998) beschrieben. 4F8 reagiert im Vergleich zum Wildtyp reduziert mit R101P und R102P (Abbildung 21 C) und kann Q104P nicht detektieren. Dies lässt den Schluss auf die Lage seines Haupt-Epitops in diesem Bereich zu (Abbildung 21 C). Die Mutation E98V stört nicht die Antikörper-Interaktion und führt zur Beschränkung auf den Bereich AS 101-105 als Epitop für den Antikörper 4F8.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ermöglichen es beide monoklonalen Antikörper, einen erfolgten Aminosäureaustausch von Arginin bzw. Glutamat mit Prolin an den Aminosäurepositionen 101 – 104 bereits durch Analyse mit einem Immunoblot festzustellen, was für die späteren Analysen Punktmutationen-enthaltender Viren in diesem Bereich wichtig ist.

### 2.2.2 *In vitro* Bindungsstudien immobilisierter DHBVpreS Proteine mit einer löslichen Form der C-Domäne der dCPD

Um den Einfluss der Aminosäureaustausche innerhalb der amphipathischen Helix der essentiellen dCPD-Binderegion auf die Interaktion von DHBVpreS mit dCPD zu untersuchen, wurde eine biochemische Analyse durchgeführt und die Interaktion rekombinanter DHBVpreS Proteine mit einer löslichen Form der C-Domäne der dCPD (sdCPD-C) untersucht. Die rekombinanten DHBVpreS Proteine wurden dazu an eine Trägermatrix immobilisiert, anschließend mit sdCPD-C-enthaltenden Zellkulturüberstand inkubiert und nach Waschen und Ablösen von der Trägermatrix mittels Immunoblot die Bindung ausgewertet. Eine Alternative zur Immobilisierung an Sepharose-Kügelchen war die Immobilisierung an ein planares Trägermaterial wie z.B. eine ELISA-Platte.

Pro DHBVpreS Protein wurden 265 µg an 0,5 ml aktivierte CH Sepharose 4B gekoppelt. Vor und nach der für zwei Stunden bei Raumtemperatur erfolgten Kopplung wurden Proben des Überstandes genommen und in einem 15 %-igen Tricin-SDS-PAGE (Schägger, von Jagow) mit Coomassie-Blau Färbung die Kopplungseffizienz kontrolliert. Dabei entspricht das Verschwinden der Proteinbande bei den nach der Kopplung genommenen Proben einer vollständigen Kopplung (Abbildung 22). Alle gereinigten DHBVpreS Proteine konnten vollständig immobilisiert werden.



Abbildung 22: Kontrolle der Kopplungseffizienz der DHBVpreS Proteine an Sepharose. Alle Proteine wurden vollständig kovalent an aktivierte CH Sepharose 4B gekoppelt. Es wurden gleiche Mengen der Proben des Überstandes vor und nach Kopplung in einem 15 %-igem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau R250 gefärbt.

Gleiche Mengen an DHBVpreS Sepharose (535 pmol DHBVpreS) wurden mit dem von Zelldebris geklärten Insektenzellkulturmedium, das die sdCPD-C enthielt, unter leichtem Schütteln bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Diese Temperatur wurde gewählt, um auch schwache, aufgrund schneller Dissoziationsraten sonst nicht detektierbare Interaktionen sichtbar zu machen. Nach zweimaligem Waschen mit gekühltem Bindepuffer wurde die gebundene C-Domäne von der DHBVpreS Sepharose durch kurzes Aufkochen in Probenpuffer abgelöst, die erhaltenen Proben in der Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Die eluierte C-Domäne wurde mit einem dCPDspezifischen Antikörper detektiert. Alle DHBVpreS Mutanten konnten wie der Wildtyp (DHBVpreS Protein 1-165 bzw. wt) die sdCPD-C binden (Abb. 23). Die Ausnahme machte das DHBVpreS Protein R102P mit nur sehr abgeschwächter Bindung der sdCPD-C (Spur 9 im Vergleich mit Spur 2). Die Deletionsmutante  $\Delta 101 - 109$  war bindedefizient und konnte folglich die sdCPD-C nicht binden (Spur 3 im Vergleich mit Spur 2). Die weitere Kontrolle mit freier abgesättigter Sepharose bestätigte die Spezifität der beobachteten Bindung der C-Domäne an die DHBVpreS Proteine (vergleiche Spur 11 mit Spur 2). Bei 4°C erfolgte nur im Falle des R102P eine starke Reduktion der Bindung der sdCPD-C.



Abbildung 23: Bindungsstudie der C-Domäne der dCPD an immobilisierte DHBVpreS Proteine bei 4°C. Je 535 pmol DHBVpreS wurde mit 160  $\mu$ l in *High 5* Insektenzellen produzierter sdCPD-C für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die gebundene C-Domäne durch Aufkochen der Sepharose in Probenpuffer (50  $\mu$ l) abgelöst und 1/5 in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mittels des dCPD-spezifischen Antikörpers 28894 (1:10.000 verdünnt) die gebundene C-Domäne der sdCPD detektiert. Auf die erste Spur wurde die sdCPD-C als Einsatzkontrolle (input) aufgetragen. Als Kontrollen dienten weiter: 1. die Inkubation der C-Domäne mit DHBVpreS-freier, abgesättigter Sepharose (Kontrolle, Spur 11), um eine unspezifische Bindung der C-Domäne an Sepharose zu überprüfen, und 2. die Inkubation mit DHBVpreS  $\Delta$ 101-109 Sepharose (Spur 3). Für das DHBVpreS  $\Delta$ 101-109 Protein wurde bereits gezeigt, dass keine Bindung der sdCPD erfolgt (Urban et al., 1999) bzw. es nicht die Bindung zwischen der sdCPD-C und DHBVpreS 30-115 kompetitiert (Urban et al., 2000).

Mit weiteren Versuchen wurde der Einfluss der Temperatur auf die Bindung getestet. Die Durchführung war analog mit den Unterschieden in der Inkubationstemperatur und dem Waschen mit entsprechend gewärmtem Bindepuffer.



Abbildung 24: Bindungsstudie der sdCPD-C an immobilisierte DHBVpreS Proteine bei Raumtemperatur (22°C). Je 10,6  $\mu$ g DHBVpreS (535 pmol), immobilisiert an aktivierte CH Sepharose 4B, wurden mit 160  $\mu$ l in *High 5* Insektenzellen produzierter sdCPD-C für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die gebundene C-Domäne durch Aufkochen der Sepharose in Probenpuffer (50  $\mu$ l) abgelöst und 1/5 davon in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mittels des dCPD-spezifischen polyklonalen Antikörpers 28894 (1:10.000 verdünnt) die gebundene C-Domäne der sdCPD detektiert. Der Auftrag war analog zur Abbildung 23; Auftragskontrolle der C-Domäne der sdCPD in Spur 1; Spezifitäts-Kontrolle in Spur 11 und die bindedefiziente DHBVpreS  $\Delta$ 101-109 in Spur 3.

Bei Raumtemperatur war die Bindung der sdCPD-C an R102P wie in dem Ansatz der Deletionsmutante  $\Delta 101 - 109$  reduziert (Abb. 24; vergleiche Spur 9 mit Spur 3). Die verringerte Bindung in den Ansätzen D93Q und R101P (Spuren 5 und 8) ließ auf eine Abnahme der Komplexstabilität und Erhöhung der Dissoziationskonstante schließen, da bei beiden bei 4°C eine stabile Komplexbildung zu beobachten war.

Der Bindungsversuch wurde ergänzend bei 37°C, der in für *in vitro* Infektionsstudien gängigen Inkubationstemperatur, durchgeführt, um die Komplexbildung und mögliche Auswirkung für Versuche mit im DHBVpreS/S-Gen mutierten Viren zu kontrollieren.



Abbildung 25: Bindungsstudie der sdCPD-C an immobilisierte DHBVpreS Proteine bei 37°C. Je 10,6  $\mu$ g DHBVpreS (535 pmol), immobilisiert an aktivierte CH-Sepharose 4B, wurden mit 160  $\mu$ l in *High 5* Insektenzellen produzierter C-Domäne der Carboxypeptidase D der Ente D für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der DHBVpreS Sepharose wurde die gebundene C-Domäne durch Aufkochen der Sepharose in Probenpuffer (50  $\mu$ l) abgelöst und im Westernblot mit dem dCPD-spezifischen polyklonalen Antikörper 28894 (1:10.000 verdünnt) analysiert.

Die weitere Temperaturanhebung führte im Fall des D93Q zu keiner weiteren Abnahme der Komplexbildung (vergleiche Abb. 24 Spur 5 mit Abb. 25 Spur 5). Für R101P und R102P war ein Verlust der Bindung der sdCPD-C zu beobachten (Abb. 25 vergleiche Spur 8 und Spur 9 mit Spur 3).

Diese Bindungsstudien gaben folgenden Aufschluss:

Aminosäuren, deren Austausch einen Ladungsverlust zur Folge hatte (z. B. E91V bzw. E98V), wurden toleriert. Der Austausch von Aminosäuren, der zur Zerstörung der  $\alpha$ -Helix führte (R101P bzw. R102P), wurde nicht toleriert.

## 2.2.3 Herstellung und Analyse im DHBVpreS/S-Gen mutierter Hepatitis-B-Viren der Ente

Die biochemischen Bindungsstudien führten zu der Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen der Infektiosität der Viren mit der Bindung zu dCPD. Zuerst wurde der Einfluss des von dem Polymerase-Leserahmen unabhängigen Austauschs einzelner Aminosäuren auf die Virusproduktion getestet.

In den folgenden Versuchen wurde das Plasmid pCD0 zur transienten Transfektion von LMH-Zellen genutzt und führte zur Produktion infektiöser Viren (Condreay et al., 1990; Deindl, 1994), die als Kontrollviren dienten (im Folgenden als DHBV wt bezeichnet). pCD0 codiert das DHBV16-Genom unter CMV (**C**yto**m**egalie **V**irus)-Promotor Kontrolle (Abb. 26, (Obert et al., 1996)). Die für die Subklonierung gewählten Restriktionsenzyme *Bgl II* und *Xho I* sind in lila Schrift eingezeichnet. Das Vorgehen war dem der Generierung der DHBVpreS-enthaltenden pQE8 Plasmide genutzten analog. Die eingeführten Mutationen, mit Ausnahme des Konstruktes D93Q, änderten nicht den überlappenden Polymerase-Leserahmen.



**Abbildung 26: Schema des der Subklonierung zu Grunde liegenden Plasmides pCD0.** (A) Schematische Darstellung des DHBV16 Genoms mit Angabe der Nukleotidpositionen nach Mandart (Mandart et al., 1984). Der DHBVpreS-Teil ist in Orange dargestellt, um die Überlappung mit der Spacer-Region der Polymerase zu verdeutlichen. (B) Schema des Plasmides pCD0. Die Leserahmen des Core- und des L-Proteins, sowie der Polymerase sind als dicke Pfeile dargestellt. Die Vektorsequenz ist als dünne beige Linie angedeutet. Das 1. DHBV Nukleotid liegt an der Position 8 und ist mit einem dünnen Pfeil markiert. Der CMV-Promotor ist als Kästchen eingezeichnet. Ausgehend von diesem Plasmid wurde die Kassette *Bgll1* bis *Xho1* (die Restriktionsenzyme sind lila eingezeichnet) durch ein nach gene SOEing-PCR manipuliertem Fragment ausgetauscht. Die Lage der in der PCR eingesetzten Restriktionsprimer, die zur Amplifikation eines ca. 821 bp großen Fragmentes führten, ist eingezeichnet (blaue Schrift). Die Änderungen der Nukleotidsequenz im L-Protein waren so gewählt, dass das überlappende Polymerase Leseraster unverändert blieb. Eine Ausnahme stellte die Mutante DHBV D93Q dar, die basierend auf Beobachtungen in der Bindungs-Kompetition mit der C-Domäne der dCPD gewählt wurde (Urban et al., 2000) und durch Änderung des Polymerase-ORFs zum Austausch RP310,311TA führte. TP, terminales Protein; RT, reverse Transkriptase; RH, RNase H.

Nach transienter Transfektion der mutierten pCD0 Plasmide in LMH-Zellen wurde durch Zentrifugation der Zellkulturüberstand am Tag 7 nach Transfektion von Zelldebris geklärt und die Menge produzierter DHBV Partikel durch Analyse der ins Medium sezernierten DHBV Partikel mit einem DNA-Dotblot und einem Immunoblot bestimmt.



1 + 2 + 3 + 4 + 5 Genomequivalente $+ 10^{\circ} + 10^{\circ} + 10^{\circ} + 10^{\circ} + 10^{\circ}$ 

Viren pro ml
1,13 x 10 <sup>12</sup> 4,17 x 10 <sup>11</sup> 1,81 x 10 <sup>12</sup>
1,70 x 10 <sup>11</sup> 6,88 x 10 <sup>11</sup> 4,30 x 10 <sup>11</sup>

**Abbildung 27:** Analyse der Transfektionsüberstände im DNA-Dotblot. (A) Caesiumchlorid-Dichtegradienten mit je 100 µl PEG-gefällten DHBV-beinhaltenden LMH-Medium für vier Stunden bei 20°C und 55.000 rpm in der Ultrazentrifuge (Rotor: SW 60 von Beckman). Die Fraktionen wurden zu je sechs Tropfen von unten nach oben gesammelt und im DNA-Dotblot je 50µl Fraktion pro Dot auf eine Nylonmembran aufgebracht, mit einer radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde hybridisiert und nach Waschen mit dem Phosphorimager MolecularDynamics Phosphorimager gescannt. (B) Auswertung des gescannten DNA-Dotblots mit der Software Quantity One und Excel. Die Phosphorimager Werte wurden um den unspezifischen Hintergrund korrigiert und die Genomequivalente entsprechend des aufgetragenen DNA-Standards errechnet.

Alle mutierten Viren wurden in das Medium der LMH-Zellen sezerniert (Abb. 27 A). Die Cores befanden sich in den Fraktionen drei bis sechs und die größte Menge an Virionen in den Fraktionen acht und neun.

Mit der Analyse der erhaltenen Fraktionen in einem Immunoblot mit den beiden DHBVpreSspezifischen Antikörpern 1H1 und 4F8 wurde das Einfügen der gewünschten Mutationen in

B



das L-Protein überprüft. Ergänzend wurde ein DHBVpreS-spezifischer Antikörper zum Nachweis der Sekretion der Viren und SVPs eingesetzt.

Abbildung 28: Analyse der Sekretion subviraler Partikel (SVPs) und Virionen in das Medium der transfizierten LMH-Zellen. (A) Im DNA-Dotblot (je 50 µl Fraktion pro Dot) wurden DHBV Virionen mittels einer radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde in den Fraktionen 7 bis 10 nachgewiesen (siehe Abb. 27 A). (B bis D) Nach Gelelektrophorese von je 10 µl Fraktion und Westernblot wurden SVPs und Virionen mit DHBVpreS-spezifischen Antikörpern in den Fraktionen 10 bis 12 detektiert. (B) Der monoklonale Antikörper 1H1 zeigte analog zur Beobachtung bei den DHBVpreS Proteinen (Abb. 21 B) keine Reaktion mit den entsprechenden Virionen bzw. SVPs DHBV R101P, DHBV R102P und DHBV Q104P. (C) Das gleiche Ergebnis zeigte sich mit dem monoklonalen Antikörper 4F8 (vgl. Abb. 21 C). (D) Das Vorhandensein subviraler und viraler Partikel konnte mit dem polyklonalen Antikörper 1H1 und 4F8 die Einführung der Aminosäureaustausche überprüft und bestätigt werden.

Die Produktion DNA-haltiger Partikel mit der Dichte von Virionen wurde in der DNA-Dotblot Analyse der einzelnen Fraktionen gezeigt (Abb. 27) und im Immunoblot mit dem DHBVpreS-spezifischen Antikörper DO84 durch den Nachweis von SVPs und viraler Partikel (Abb. 28 D) bestätigt. DO84 erkennt mehrere Bereiche im DHBVpreS (Abb. 58 im Anhang) und erkennt alle DHBV Mutanten unabhängig von ihren Mutationen. Im Gegensatz reagierten DHBV R101P, DHBV R102P und DHBV Q104P nicht mit den zwei neutralisierenden Antikörpern 1H1 und 4F8 (Abb. 28 B + C).

Der Einfluss der Mutationen auf die Infektiosität wurde in Infektionsversuchen getestet. Gleiche Mengen DNA-enthaltender Partikel (MGE von 200) wurden in das Medium der PDH-Kultur gegeben und über Nacht im Zellkulturschrank die PDHs infiziert. Am Folgetag wurde das Virusinokulum durch zweimaliges Waschen der Zellen vollständig entfernt. Zur Analyse der Infektionsereignisse wurden zwei Zeitwerte gewählt: vier und sieben Tage Kultur der Zellen nach Infektion (post Infektion = p.i.). An Tag 4 bzw. Tag 7 p.i. wurde die intrazelluläre virale DNA aus den PDHs isoliert und je 50  $\mu$ l isolierte DNA pro Dot auf eine Nylonmembran aufgetropft und anschließend mit einer radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde die erfolgte Infektion analysiert.



Abbildung 29: DNA-Dotblot der aus PDHs am Tag 4 bzw. 7 p.i. isolierten intrazellulären viralen DNA. Primäre Entenhepatozyten  $(2x10^6 \text{ pro Loch})$  wurden mit  $4x10^8$  DNA-haltigen Partikeln über Nacht inkubiert, was einer MGE von 200 entsprach. Links ist der Scan der aufgetropften Dots mit dem Molecular Imager FX zu sehen. Rechts ist schematisch gezeigt, welche Probe an welcher Stelle aufgetropft wurde. Am unteren Ende des Dotblots ist der ein DHBV-Genom enthaltende Plasmid-Standard mit der entsprechenden Menge an Genomequivalenten gezeigt.

Die Analyse am Tag 4 p.i. zeigt die primären Infektionsereignisse ohne die Amplifikation durch einen Virus-"Spread". Die Analyse am Tag 7 p.i. zeigt eine Zunahme, sofern es zu einer Amplifikation der Viren infolge eines "Spreads" kommt.

Mutanten, die in der biochemischen Bindungsstudie zum Verlust oder Reduktion der dCPD-C Bindung (Abb. 23 bis 25) führten, zeigten keine oder reduzierte Signale nach der Hybridisierung der radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde (Abb. 29). Abbildung 30 zeigt die quantitative Auswertung des DNA-Dotblots.



Abbildung 30: Graphen der quantitativen Auswertung des DNA-Dotblots mit der Quantity One Software und Darstellung im Balkendiagramm mit dem Programm Excel. (A) Links sind die ermittelten Mengen an intrazellulärer viraler DNA Tag 4 p.i. im Vergleich mit rechts den Werten am Tag 7 p.i. zu sehen. Der unspezifische Hintergrund des DNA-Dotblots wurde vor der Berechnung von allen Werten subtrahiert. (B) Graphen der intrazellulären viralen DNA der getesteten Viren im prozentualen Verhältnis zur DHBV wt Infektion, die auf 100 % gesetzt wurde. Links sind die Werte für Tag 4 p.i. und rechts die Werte für Tag 7 p.i.

Neben der Analyse der intrazellulären viralen DNA im DNA-Dotblot wurden auch die sezernierten viralen Partikel im Immunoblot analysiert.



Abbildung 31: Westernblot der mit Trichloressigsäure-gefällten und im SDS-PAGE getrennten viralen Partikel aus PDH-Kulturmedium Tag 7 nach Infektion. Die ins Medium abgegebenen Partikel der im DNA-Dotblot gezeigten PDH-Infektionskulturen Tag 7 p.i. (Abb. 29 obere Hälfte) wurden mittels TCA-Fällung ankonzentriert. Je 1/9 des Mediums pro Ansatz wurden in einem 12,5 %-igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem DHBVpreS-spezifischen polyklonalen Antikörper MT92 (1:10.000 verdünnt) das L-Protein detektiert.

Abbildung 31: die Mengen der sezernierten SVPs und Viren in den Infektionsansätzen DHBV E91V und E98V waren wie DHBV wt infektiös. In den Ansätzen DHBV D93Q und Q104P wurden weniger SVPs und Viren sezerniert. In den Ansätzen DHBV R101P und R102P konnten, entsprechend einer nicht stattgefundenen Infektion, weder SVPs noch Viren nachgewiesen werden.

## 2.2.4 Analyse des Einflusses des Aminosäureaustauschs an den Stellen R101 und R102 mit Histidin bzw. Leucin

Um zu untersuchen, ob eine Störung der Bindung zur C-Domäne der Carboxypeptidase D auf eine für die Interaktion notwendige Struktur des L-Proteins bzw. des DHBVpreS-Teils zurückzuführen ist, wurden folgende DHBVpreS Proteine produziert und gereinigt: DHBVpreS R101L, R101H und R102H.

Die gewählten Mutationen führten zum Austausch der Aminosäure Arginin entweder konservierend mit der Aminosäure Histidin oder der Aminosäure Leucin. Beide Aminosäureaustausche änderten im viralen Kontext nicht den Polymerase-Leserahmen.

Die DHBVpreS Proteine R101L, R101H und R102H wurden im Westernblot auf ihre Reaktion mit den Antikörpern 1H1, 4F8 und MT92 getestet und anschließend mit den Reaktionen der übrigen DHBVpreS Proteine verglichen. In dieser Analyse reagierten beide monoklonalen Antikörper im Gegensatz zu den Proteinen R101P und R102P mit den Proteinen R101L, R101H und R102H (Abb. 32).



Abbildung 32: Analyse der DHBVpreS Proteine durch Coomassie-Blau-Färbung und immunologischen Nachweis. (A) Je 500 ng DHBVpreS Protein wurden pro Spur auf ein 12,5 %-iges Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetragen und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau R250 sichtbar gemacht und auf ihre Reinheit hin überprüft. (B bis D) Analog zu dem Coomassie-Blau-gefärbten Polyacrylamidgel wurden je 10 ng DHBVpreS Protein auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem DHBVpreS-spezifischen monoklonalen Antikörper 4F8 (B), dem monoklonalen Antikörper 1H1 (C) und dem polyklonalen Antikörper MT92 (D) nachgewiesen. M entspricht dem Größenmarker (Rainbow Low Marker).

Um die dCPD-Bindefähigkeit dieser Proteine zu prüfen, wurden gleiche Mengen gereinigter Proteine (pro Ansatz je 20 µg) mit "Talon-Beads" inkubiert, um sie dadurch mit DHBVpreS Protein zu beladen. Mit dieser den Sepharose-Beads vergleichbaren Möglichkeit konnten DHBVpreS Proteine an Beads-haftend mit der löslichen Form der C-Domäne der dCPD inkubiert werden. Die Art der Bindung der DHBVpreS Proteine an die Beads ist im Gegensatz zur aktivierten CH Sepharose 4B nicht kovalent, sondern basiert auf der Interaktion des Cobalt-Ions mit dem 6x Histidin-Tag der DHBVpreS Proteine. R102H zeigte im Vergleich zu den R101 Mutanten eine reduzierte Interaktion mit den Talon-Beads (Abb. 33). Da die Reinigung des R102H zuvor mit Talon-Beads durchgeführt wurde, ist diese Reduktion der "Kopplung" verwunderlich.



Abbildung 33: Kontrolle der Bindungseffizienz der DHBVpreS Proteine an Talon-Beads. Je 40  $\mu$ l mit 1 x PBS gewaschene Talon-Beads wurden nach Pelletierung mit 300  $\mu$ l DHBVpreS (bzw. 20  $\mu$ g DHBVpreS Gelfiltration-Fraktionsnummer 22) / 1 x PBS resuspendiert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. 20  $\mu$ l wurden als Gelprobe vor der Kopplung genommen. Nach Pelletierung am Folgetag wurde die Probe nach Kopplung (20  $\mu$ l) genommen. Alle Gelproben wurden in einem 12,5 %-igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau R250 angefärbt. Nach der Coomassie-Färbung konnte die zum Koppeln genutzten Mengen und die Effizienz überprüft werden. M entspricht dem Größenmarker (Rainbow Low Marker).

Mit den an "Talon-Beads"-gebundenen DHBVpreS Proteinen wurden Bindungsversuche bei 37°C mit der rekombinant in den Insektenzellen *High Five* hergestellten C-Domäne der dCPD durchgeführt. Diese Inkubationstemperatur wurde gewählt, um den größten Effekt sichtbar zu machen.

Wie aus der Abbildung 34 zu entnehmen ist, konnten R102H, R101L und R101H die C-Domäne der dCPD binden. Der Austausch des Arginins 101 zu Histidin (Spur 7) oder Leucin (Spur 6) führte im Gegensatz zu R101P (Spur 5) zu keiner Reduktion des Bindeverhaltens, war dem Wildtyp vergleichbar (vergleiche Spur 3 mit den Spuren 6 + 7) und nicht so stark reduziert wie im Fall R101P (vergleiche Spur 5 mit Spur 3). Der Austausch R102H führte zu einem dem Wildtyp-entsprechenden Bindeverhalten (vergleiche Spur 9 mit Spur 3). Die erhaltenen Beobachtungen bestätigten sich in mehreren unabhängigen Wiederholungen.



Abbildung 34: Bindungsstudie bei 37°C der sdCPD-C an Talon-Beads-gebundenen DHBVpreS Proteine. Je 10  $\mu$ g (505 pmol) DHBVpreS Talon-Beads wurden für eine Stunde unter leichtem Schütteln bei 37°C mit 500  $\mu$ l in *High Five*-Insektenzellen produzierter sdCPD-C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der DHBVpreS Talon-Beads mit Äquilibrierungspuffer (50 mM Di-Natriumphosphat, 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol pH 7,5) wurde die gebundene C-Domäne durch Aufkochen der Talon-Beads in Probenpuffer (50  $\mu$ l) abgelöst. Alle Gelproben (1/10 der Ansätze) wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mittels des dCPD-spezifischen polyklonalen Serums 28894 (1:10.000 verdünnt) die gebundene C-Domäne der dCPD detektiert. Auf die erste Spur wurde die C-Domäne der dCPD als

Einsatzkontrolle (input) aufgetragen. Als Kontrollen dienten weiter: 1. die Inkubation der C-Domäne mit DHBVpreS-freien Talon-Beads (Kontrolle, Spur 2), um eine unspezifische Bindung der C-Domäne an Talon Beads zu überprüfen, und 2. die Inkubation mit DHBVpreS  $\Delta$ 101-109 dCPD-C-bindedefizienten Talon-Beads (Spur 4).

Aufbauend auf den Ergebnissen der biochemischen Bindungsstudie wurde die Infektiosität der DHBV Mutanten mit Aminosäureaustauschen an Position 101 und 102 untersucht. Die Mutation der Arginine zu Histidin oder Leucin beeinflusste nicht den überlappenden Polymerase-Leserahmen.

Die Transfektionseffizienz war bei allen dem wt vergleichbar, wie im Nachweis des L-Proteins mit dem Antikörper MT92 in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung der fixierten transient-transfizierten LMH-Zellen zu sehen war (Abb. 35). Die Färbung war durch das Fehlen von Signalen nach Mock-Transfektion spezifisch (Abb. 35). Als weitere Kontrolle wurden LMH-Zellen, die nicht transfiziert wurden, aber unter den gleichen Bedingungen parallel zu den transfizierten Zellen kultiviert und anschließend mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung analysiert (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 35: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse fixierter, mit im DHBVpreS-mutierten pCD0 transient-tranfizierter LMH-Zellen mit dem anti-DHBVpreS-spezifischem polyklonalen Antikörper MT92. LMH-Zellen (6x10<sup>5</sup> pro Loch) wurden mit je 0,75 µg DNA transient transfiziert und am Tag 3 nach der Transfektion fixiert. Nach Permeabilisation der Zellen wurde das L-Protein mit dem anti-DHBVpreS-spezifischen polyklonalen Antikörper MT92 (1:200 verdünnt) detektiert; der Zweitantikörper war mit Alexa Fluor 488 (anti- Kaninchen) konjugiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica CR Mic und dem Programm Leica FW 4000 bei einer 100fachen Vergrößerung detektiert.

DHBV R102P, R102H und reduziert DHBV R101P im Vergleich mit dem wt wurden sezerniert, wie es exemplarisch im DNA-Dotblot von je 200µl LMH-Kulturmedium transfizierter LMH-Zellen Tag 6 nach Transfektion in Abbildung 36 zu sehen ist. Die gezeigte Beobachtung wurde wiederholt in mehreren Transfektionsansätzen bestätigt.



je 200µl LMH-Überstände

Die Sequenzierung der für die Transfektionen eingesetzten Plasmid-DNA ergab im Falle des pCD0 R101H und des pCD0 R102L das Vorliegen unerwünschter Mutationen. Diese führten zur Änderung des P-ORFs (siehe Anhang). Der S-ORF blieb unbeeinflusst und führte zur Bildung des L-Proteins, das in der indirekten Immunfluoreszenz der fixierten LMH-Zellen detektiert wurde (Abb. 35). Im Falle des DHBV R101H war die Menge der sezernierten Viren für die Detektion im DNA-Dotblot zu gering. Die Analyse ergab nur für das DHBV R102H eine ausreichende Menge an Viren nach der Transfektion von LMH-Zellen.

Ausgehend von dieser Mutante wurden PDHs mit gleichen Mengen Viren (MGE von 50) infiziert, und die Infektionsereignisse untersucht. Abbildung 37 zeigt das Ergebnis dieser Infektionsstudie.



**Abbildung 36: Analyse der Transfektionsüberstände im DNA-Dotblot.** Je 200µl DHBV-beinhaltendes LMH-Medium wurde pro Dot auf eine Nylonmembran aufgebracht, mit einer radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde hybridisiert und nach Waschen und mit dem Phosphorimager Molecular Imager FX (Biorad) gescannt.

**Abbildung 37: Analyse der Infektiosität der DHBV R102H Mutante.** (A) PDHs (1x10<sup>6</sup> pro Loch) wurden mit dem geklärten LMH-Überstand (Tag 7 nach Transfektion) über Nacht mit einer MGE von 50 (1x10<sup>7</sup> DNAenthaltende Partikel, die zuvor in einem DNA-Dotblot quantifiziert wurden) infiziert. Am Tag 6 nach Infektion wurde die virale DNA aus den PDHs isoliert, in einem DNA-Dotblot mit einer radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde hybridisiert und mit dem Phosphorimager Molecular Imager FX (Biorad) gescannt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software Quantity One. Der unspezifische Hintergrund wurde subtrahiert. (B) Partikel, die ins Medium nach Infektion abgegeben wurden, wurden aus den dabei erhaltenen Kulturüberständen ankonzentriert (TCA-Fällung). 1/9 der (gepoolten) Überstände wurden in einem 12,5 %-igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem DHBVpreS-spezifischen polyklonalen Antikörper MT92 (1:10.000 verdünnt) das L-Protein nachgewiesen.

DHBV R102H infizierte im Gegensatz zu DHBV R102P PDHs. In A ist der DNA-Dotblot der intrazellulären viralen DNA der infizierten PDHs gezeigt. In B die sezernierten viralen und subviralen Partikel, die im Immunoblot durch den Nachweis des L-Proteins mit dem Antikörper MT92 detektiert wurden. Das Ergebnis bestätigte sich in mehreren Wiederholungen (Daten nicht gezeigt). In diesem Infektionsansatz schien DHBV R102H im Vergleich zum wt schlechter zu infizieren, was an der Schwankung zwischen den der Analyse zu Grunde gelegten Werten lag. In der TCA-Fällung zu Grunde liegenden Kulturüberständen und weiteren Infektionsansätzen konnte DHBV R102H, wie in Abbildung 37 B und Abbildung 38 zu sehen, vergleichbar wie der wt PDHs infizieren und hatte keine reduzierte Infektiosität.

In ergänzenden Ansätzen wurden PDHs mit DHBV Mutanten mit einer MGE von 25 infiziert und am Tag 7 p.i. die Zellen fixiert. In der indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit dem DHBVpreS-spezifischen Antikörper MT92 wurde spezifisch das L-Protein in den infizierten Zellen angefärbt. Die Kontrollfärbung unbehandelter parallel kultivierter PDHs bestätigte das spezifische Anfärben des DHBV L infizierter Zellen. DHBV R102H infizierte PDHs wie der wt und im Vergleich dazu infizierten DHBV D93Q und Q104P reduziert (Abb. 38). Der Austausch der Arginine an Position 101 und 102 zu Prolin führte zum wiederholten Male zu einem Verlust der Infektiosität (vgl. Abb. 29 - 31).

Siehe nächste Seite: Abbildung 38: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse fixierter mit DHBVpreS Mutanten infizierter PDHs mit dem anti-DHBVpreS-spezifischem polyklonalen Antikörper MT92. 1x10<sup>6</sup> PDHs pro Loch wurden über Nacht mit PEG-gefällten Viren entsprechend 2,5x10<sup>7</sup> DNA-enthaltender Partikel (MGE von 25) inkubiert. Am Folgetag wurde das Virusinokulum abgenommen und durch zweimaliges Waschen der Zellen vollständig entfernt. Am Tag 7 nach Infektion wurde eine indirekte Immunfärbung der fixierten Zellen mit dem DHBVpreS-spezifischen polyklonalen Antikörper MT92 (1:200) durchgeführt. Grün: DHBVpositive Zellen durch den mit Alexa Fluor 488 konjugierten Zweitantikörper sichtbar gemacht; blau: mit Bisbenzimid H 33342 angefärbte DNA in den Zellkernen. Die Fluoreszenz wurde mit dem Inversfluoreszenzmikroskop Leica DM IRB bei einer 100fachen Vergrößerung detektiert.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Kontext der Proteine dCPD-Cbindedefizienten Viren eine Reduktion oder einen Verlust der Infektiosität zeigten. Von besonderem Interesse war die Bindung und Infektiosität der Mutante R102H. Das mit dieser Mutante erhaltene Ergebnis verdeutlichte die Bedeutung der Integrität der  $\alpha$ -Helix für die dCPD-C-Bindefähigkeit entsprechender DHBVpreS Proteine und Infektiosität korrespondierender Viren.

### 2.2.5 Analyse der Bindung und Aufnahme von DHBV R102P im Vergleich zu DHBV wt mit einer Real Time Polymerasekettenreaktion

Parallel zu den Infektionsversuchen mit DHBV wt und DHBV R102P wurde eine Methode etabliert, die die Detektion der Bindung und Aufnahme von DHBV und DHBV Mutanten in der PDH-Kultur ermöglichte. Es handelte sich um eine Real Time Polymerasekettenreaktion (**PCR**; engl. *polymerase chain reaction*) mit einer DHBV-spezifischen TaqMan Probe (Lee et al., 1993). In Vorversuchen wurde mit einer "Standard"-PCR ein 104 bp großes Fragment mit den bei der Real-Time PCR eingesetzten Primern und einem Plasmid-Standard (pCD0)

amplifiziert und mit einer Gelelektrophorese überprüft (Daten nicht gezeigt). In Testläufen mit einer Verdünnungsreihe des Plasmides pCD0 wurde die für die Reaktion ausreichende Primer-Konzentration mit 300 nM für die Real-Time PCR ermittelt (Daten nicht gezeigt), die bei den weiteren Experimenten eingesetzt wurde.

Im folgenden Versuch wurde der Einfluss der Inkubationsdauer bei 4°C auf die Assoziation an HepG2.18-Zellen untersucht. Die humane, mit einem dCPD-enthaltenden Plasmid unter CMV-Promotor Kontrolle stabil transfizierte Hepatoma Zellinie bildet im Vergleich zu PDHs vermehrt dCPD in den Zellen. Die dCPD-Expression wurde vor der Durchführung des Experimentes mit einer Analyse von Zellysaten im Immunoblot mit einem anti-dCPD Antikörper überprüft (Daten nicht gezeigt).

Es wurde eine gleiche Menge Viren (MGE 100) für eine bzw. zwei Stunden zu den Zellen gegeben und diese bei 4°C auf Eis inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Partikel durch mehrmaliges Waschen, wurde die virale DNA der Zellen isoliert. In einem Ansatz wurde DHBV wt für 2h auf HepG2 Zellen inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C. Da man davon ausgeht, dass das Zyklieren der Rezeptormoleküle bei dieser Temperatur inhibiert wird (Pugh and Summers, 1989), wurde mit diesen Versuchen die Assoziation der Viren untersucht.

Eine Verlängerung der Inkubation um eine Stunde führte nicht zu einer gesteigerten Assoziation (Abb. 39). Interessanterweise führte die Inkubation von Wildtyp Partikeln auf HepG2-Zellen (Abb. 39 rechts) zu einer mit der gemessenen Assoziation des DHBV R102P vergleichbaren Assoziation an die Zellen.



Abbildung 39: Analyse der Assoziation viraler Wildtyp oder R102P Partikel an HepG2.18-Zellen.  $1 \times 10^6$  HepG2.18-Zellen pro Loch wurden mit PEG-gefällten LMH-Überständen DHBV wt oder DHBV R102P mit einer MGE von 100 für eine bzw. zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 1 x PBS wurde die assoziierte DNA der Zellen isoliert und je 4 µl in die Real-Time PCR eingesetzt. Bei allen

Inkubationsansätzen handelte es sich um Einzelwerte (pro Ansatz ein Loch); die Real-Time PCR wurde pro Ansatz doppelt angesetzt. Als Kontrolle diente die Inkubation von DHBV wt auf HepG2 Zellen.

Es zeigte sich eine nur geringfügig reduzierte Bindung des DHBV R102P im Vergleich mit dem wt auf HepG2.18-Zellen.

Im folgenden Experiment mit primären Entenhepatozyten wurde die Bindung und Aufnahme des DHBV R102P im Vergleich zum DHBV wt untersucht. Beide wurden mit einer MGE von 50 auf den PDHs inkubiert. Es wurden zwei Inkubationstemperaturen zur Analyse der Bindung (4°C) oder der Bindung und Aufnahme (37°C) gewählt.



Abbildung 40: Analyse der PDH-assoziierten und aufgenommenen Viren vom Wildtyp bzw. R102P. Zu je 1 x 10<sup>6</sup> PDHs pro Loch wurden PEG-gefällte Viren vom Wildtyp oder R102P (MGE 50) gegeben und entweder zwei Stunden bei 4°C oder über Nacht (ca. 12 Stunden) bei 37°C inkubiert. Pro Ansatz kamen je zwei Vertiefungen zum Einsatz. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurde die Zell-Assoziierte und intrazelluläre virale DNA von bzw. aus den PDHs mit dem QIA Blood Kit isoliert. Je 4 µl des Eluates wurden in einer Real-Time PCR eingesetzt.

Sowohl DHBV wt als auch DHBV R102P zeigten annähernd gleiche Mengen an gebundener und aufgenommener viraler DNA (Abb. 40). Daraus lässt sich auf eine ungestörte Bindung (Abb. 40: 4°C) und Aufnahme (Abb. 40: 37°C) schließen. Folglich ist die dCPD nicht der primäre Rezeptor.

# 2.3 Mutation der wahrscheinlichen Protease-Schnittstelle im DHBV L und Einfluss auf die DHBV-Infektion

Die Analyse von Serumproben oder Leberlysaten DHBV-infizierter Enten im Vergleich mit Proben DHBV-freier Enten zeigt im Immunoblot mit DHBVpreS-spezifischen Antikörpern eine dem L-Protein entsprechende Bande bei 36 kDa. Neben dieser Bande ist ein weiteres, DHBVpreS-spezifisches Signal bei 28 kDa hauptsächlich in Leberlysaten zu sehen (Abb. 41, (Yokosuka et al., 1985; Yokosuka et al., 1988; Fernholz et al., 1993; Bruns et al., 1998; Tong et al., 1999; Funk et al., 2004a), das in Seren nur sehr schwach, falls überhaupt, zu sehen ist. Da diese 28 kDa Proteinbande mit einem DHBV S-spezifischen Antikörper nachzuweisen war (Yokosuka et al., 1988), von einem DHBVpreS-spezifischen Antikörper mit N-terminal im DHBVpreS gelegenen Epitopen aber nicht detektiert wird (Abb. 41 anti-DHBVpreS MT92), muss es sich um eine N-terminal verkürzte L-Proteinbande handeln. Fernholz und Kollegen zeigten, dass diese 28 kDa L-Bande nicht durch Translation, sondern wahrscheinlich nach Infektion bzw. Aufnahme des Virus durch einen proteolytischen Abbau des DHBVpreS entstand (Fernholz et al., 1993).



Abbildung 41: Analyse von Serum- und Leberproben DHBV-positiver oder -negativer Enten in einem Immunoblot mit DHBVpreS-spezifischen Antikörpern. Die Epitope der monoklonalen Antikörper 1H1 und 4F8 liegen im Bereich von Aminosäure 95 bis 109 im DHBVpreS. Diese Antikörper detektieren die 28 kDa Bande. Im Gegensatz dazu konnte der Antikörper MT92, dessen Haupt-Epitope N-terminal (Aminosäure 2 bis 28) im DHBVpreS liegen, diese Bande selbst bei längerer Exposition nicht detektieren. Je 2 µl Leberlysat (ca. 100 µg Leber) bzw. Serum DHBV-infizierter bzw. DHBV-freier Enten wurden in einem 12,5 %-igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. DHBVpreS-spezifische Banden (L-Protein bzw. proteolytische Fragmente) wurden mit den in der Abbildung gezeigten Antikörpern detektiert. Von links nach rechts: anti-DHBVpreS 1H1 (1:5 verdünnt), dessen Epitope sich von Aminosäure 101-109 erstrecken, anti-DHBVpreS 4F8 (1:5 verdünnt), dessen Epitope im Bereich Aminosäure 101-105 liegen, und anti-DHBVpreS MT92 (1:10.000 verdünnt), dessen Haupt-Epitope sich N-terminal im DHBVpreS von Aminosäure 2 bis 22 befinden.

Ausgehend von der Vermutung einer der Aufnahme folgenden proteolytischen Aktivierung und Freisetzung des aufgenommenen DHBV, wurde in einem ersten Ansatz das in Leberlysaten DHBV-infizierter Enten enthaltene 28 kDa große Protein analysiert. Um eine massenspektrometrische Untersuchung (MALDI-TOF Analyse; MALDI, matrixunterstützte Laser-Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie; TOF, engl. *time of flight*) der 28 kDa L-Bande durchführen zu können, wurden zuerst alle DHBVpreS-spezifischen Proteine aus dem Leberlysat einer DHBV-infizierten Ente durch Immunpräzipitation mit dem DHBVpreSspezifischen Antikörper 1H1 angereichert. Die so erhaltenen Immunkomplexe wurden in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurde eine Hälfte der Membran kolloidal mit Coomassie-Blau angefärbt, die andere Hälfte mit einem DHBVpreS-spezifischen Antikörper inkubiert und im Immunoblot die DHBVpreS-spezifische 28 kDa L-Bande sowie die 36 kDa L-Bande nachgewiesen (Abb. 42).



Abbildung 42: Die zur MALDI-TOF Analyse zu Grunde liegende PVDF-Membran. Die Pfeile kennzeichnen die zur massenspektrometrischen Untersuchung genutzten präzipitierten Banden. C: Kolloidale Coomassie-Färbung der PVDF-Membran; W: Immunoblot mit einem DHBVpreS-spezifischen Antikörper.

In dieser Analyse wurden bei der isolierten 28 kDa-Bande mehrere Fragmente erhalten, von denen die Fragmente R72-K95 und V73-K95 mit dem gemessenen Molekulargewichten von 2774,37 kDa und 2618,26 kDa annähernd den erwarteten Molekulargewichten von 2773,36 kDa bzw. 2617,25 kDa entsprachen. Alle anderen Fragmente waren C-terminal nach AS 73 gelegenen DHBV L-Bereiche. Aus diesen Resultaten wurde auf eine Schnittstelle nach R72 geschlossen.

In Abbildung 43 sind die den folgenden Experimenten zu Grunde gelegten Aminosäureaustausche aufgelistet. Durch den Austausch der Arginine zu Lysinen oder Glycin und Threonin sollte eine mögliche, putative Schnittstelle geändert; durch das N-terminale Verschieben der Arginine die Schnittstelle erhalten werden.

Wildtyp	60	-	QNQGAWPAGAG <mark>AG<b>RR</b></mark> VGLSNPTP	_	80
R71K			K		
R72K			K		
RR71,72KK			KK		
RR71,72GT			GT		
69RRVK72			RRVK		

Abbildung 43: Schema der ausgetauschten Aminosäuren im DHBVpreS-Teil des L-Proteins basierend auf den Ergebnisse der Analyse der 28 kDa L-Bande. Der Bereich der Aminosäureaustausche ist mit gelber Farbe hinterlegt. Die Namen der Mutanten stehen auf der linken Seite vor der Aminosäuresequenz.

Die Arginine RR71,72 liegen außerhalb der essentiellen dCPD-Binderegion (Abb. 44). Als Folge sollte der Austausch der Arginine oder das Verschieben der wahrscheinlichen Schnittstelle nicht die Interaktion mit der C-Domäne der dCPD beeinflussen. Der proteolytische Schnitt nach Arginin R72 ist in der Abbildung 44 mit einer Schere angedeutet.



Abbildung 44: Schematische Darstellung des DHBVpreS-Teils des L-Proteins. Eingezeichnet sind die zur dCPD-Interaktion notwendigen Bereiche, sowie in Rot hervorgehoben die  $\alpha$ -helikalen Bereiche. Die Schere deutet die Schnittstelle nach Aminosäure R72 an.

## 2.3.1 Analyse rekombinanter DHBVpreS Mutanten mit Aminosäureaustauschen an der putativen Schnittstelle im DHBVpreS

Zunächst wurden DHBVpreS RR71,72KK, DHBVpreS RR71,72GT und DHBVpreS 69RRVK72 exprimiert und über IMAC und Gelfiltration gereinigt. Anschließend wurde im Immunoblot ihre Reinheit überprüft. Alle drei gereinigten DHBVpreS Proteine wurden von den DHBVpreS-spezifischen Antikörpern 1H1 und 4F8 detektiert (Abb. 45).



Abbildung 45: Analyse der DHBVpreS Proteine durch Coomassie-Blau-Färbung und immunologischen Nachweis. Je 500 ng DHBVpreS Protein wurden pro Spur auf ein 12,5 %-iges Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetragen und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt und ihre Reinheit kontrolliert. Analog zu dem Coomassie-Blau-gefärbten Polyacrylamidgel wurden je 10 ng DHBVpreS Protein nach Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem DHBVpreS-spezifischen Antikörper 4F8 oder 1H1 nachgewiesen. M: Größenmarker (Rainbow Low Marker).

#### 2.3.2 In vitro Bindungsstudien mit einer löslichen Form der C-Domäne der dCPD

Um ähnliche Versuche wie bereits für die DHBVpreS Proteine mit Aminosäureaustauschen in der alpha-Helix AS 89 - 104 gezeigt, durchführen zu können, wurden die gereinigten DHBVpreS Proteine mit Talon-Beads inkubiert und die Effizienz der Immobilisierung in einem SDS-PAGE entsprechender Proben und anschließender Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgeles kontrolliert. Alle drei Proteine interagierten effizient mit den Talon-Beads (Abb. 46).



Abbildung 46: Kontrolle der Bindungseffizienz der DHBVpreS Proteine an Talon-Beads. Je 40  $\mu$ l mit 1 x PBS gewaschene Talon-Beads wurden nach Pelletierung mit 300  $\mu$ l DHBVpreS (bzw. 20  $\mu$ g DHBVpreS Gelfiltration-Fraktionsnummer 22) / 1 x PBS resuspendiert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. 20  $\mu$ l wurden als Gelprobe vor der Kopplung genommen. Nach Pelletierung am Folgetag wurde die Probe nach Kopplung (20  $\mu$ l) entnommen. Alle Gelproben wurden in einem 12,5 %-igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow)

aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau die Proteine angefärbt. Nach der Coomassie-Färbung konnte überprüft werden, ob gleiche Mengen zum Koppeln genutzt wurden und wie viel gebunden hatte. M entspricht dem Größenmarker (Rainbow Low Marker).

Die Bindungsexperimente wurden parallel in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt und analysiert. Abbildung 47 zeigt das in allen Wiederholungen bestätigte Ergebnis eines dieser Ansätze. Die Mutanten RR71,72KK (Spur 5) und 69RRVK72 (Spur 7) zeigten ein dem Wildtyp entsprechendes Bindeverhalten (vergleiche Spur 3 mit den Spuren 5 + 7). Der Austausch der Arginine RR71,72 zu Glycin und Threonin 71,72GT führte zu einer reduzierten Bindung im Vergleich zum Wildtyp (vergleiche Spur 3 mit der Spur 6). Die Spezifität der Interaktion der C-Domäne mit den DHBVpreS Mutanten wurde mit Talon-Beads ohne DHBVpreS Protein kontrolliert (siehe Spur 2).



Abbildung 47: Immunoblot der Bindungsstudie der C-Domäne der dCPD mit an Talon-Beads gebundener DHBVpreS Proteine bei 37°C. Je 10  $\mu$ g (505 pmol) DHBVpreS Protein, gebunden an Talon-Kügelchen, wurde mit 500  $\mu$ l in *High 5*-Insektenzellen produzierter C-Domäne der sdCPD für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die gebundene C-Domäne wurde durch Aufkochen der Talon-Kügelchen in 2x konzentriertem Probenpuffer abgelöst. Alle Gelproben wurden in einem 12,5 %-igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mittels des dCPD-spezifischen polyklonalen Antikörpers 28894 (1:10.000 verdünnt) die gebundene sdCPD-C detektiert. Auf die erste Spur wurde sdCPD-C als Einsatzkontrolle (input) geladen. Weitere Kontrollen waren: 1. die Inkubation der C-Domäne mit DHBVpreS-freien Talon-Beads (Kontrolle, Spur 2), um eine unspezifische Bindung der C-Domäne an Talon Beads zu überprüfen, und 2. die Inkubation mit DHBVpreS  $\Delta$ 101-109 dCPD-C-bindedefizienten Talon-Beads (Spur 4).

Die biochemische Bindungsstudie bestätigte die zuvor geäußerte Vermutung.

Die folgenden Versuche sollten die Auswirkung der Änderung der Aminosäuresequenz im viralen Kontext auf die Infektiosität der entsprechenden Viren untersuchen.

Deshalb wurden die auf der Proteinebene getesteten Austausche in analoger Vorgehensweise wie zuvor bei den DHBV Mutanten im Bereich Aminosäure 89 – 104 auf das Plasmid pCD0 übertragen und entsprechende Viren generiert (vgl. Seite 38).

### 2.3.3 Analyse von Hepatitis-B-Viren der Ente mit Mutationen in der putativen Schnittstelle des DHBVpreS

Die Vorgehensweise war analog zu den im Bereich AS 89 - 104 mutierten, bereits gezeigten Viren. Bei mutierten Virusgenomen DHBV R71K, DHBV R72K und DHBV RR71,72KK führten die Manipulationen zu keiner Änderung des Polymerase-Leserahmens. In den Virusgenomen RR71,72GT bzw. 69RRVK72 führten die Aminosäureaustausche zu einer Änderung des Polymerase-ORFs und dadurch zum Austausch KE88,89RD bzw. GGK86-88EES.

Die Viren wurden nach transienter Transfektion der entsprechenden DNA in LMH-Zellen produziert. Abbildung 48 zeigt exemplarisch die Analyse eines Caesiumchlorid-Stufengradienten von LMH-Überständen nach der Ultrazentrifugation im DNA-Dotblot. Alle Viren wurden sezerniert (Abb. 48 A).



Abbildung 48: Analyse der Transfektionsüberstände im DNA-Dotblot. Es wurden PEG-gefällte Viren auf einen Caesiumchlorid-Dichtegradienten geladen und vier Stunden mit 55.000 rpm bei 20°C in der Ultrazentrifuge (Rotor: SW 60 von Beckman) zentrifugiert. Anschließend wurden Fraktionen zu je 6 Tropfen von unten nach oben gesammelt und im DNA-Dotblot analysiert. 50  $\mu$ l jeder Fraktion wurden auf eine Nylonmembran getropft und mit einer radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde über Nacht bei 68°C hybridisiert. Im Phosphor-Imager Molecular Imager FX (Biorad) wurde der in (A) gezeigte Scan erhalten. (B) Die Auswertung des gescannten DNA-Dotblots erfolgte mit der Software Quantity One und Excel. Die Phosphorimager Werte wurden um den unspezifischen Hintergrund korrigiert und die Genomequivalente entsprechend eines aufgetragenen DNA-Standards errechnet.

Die einer N-terminalen Verschiebung der putativen Schnittstelle entsprechenden Mutante 69RRVK72 wurde in vergleichbarer Menge wie der wt sezerniert. Im Vergleich zum wt war

die Menge sezernierter DHBV R71K und DHBV R72K reduziert. Der beobachtete Effekt wurde durch den Austausch beider Arginine im Fall DHBV RR71,72KK und RR71,72GT verstärkt und wurde in mehreren Wiederholungen der Transfektionen und Analyse im Caesiumchlorid-Dichtegradienten beobachtet. Der Austausch der Arginine führte zu einer Reduktion der Menge der sezernierten Viren und störte das Assembly nicht.

Es folgte die Beantwortung der Frage, ob die Aminosäureaustausche das Infektionsverhalten der entsprechenden Viren beeinflussen können. Dazu wurden PDHs mit einer äquivalenten Menge Viren (MGE 100) infiziert und am Tag 6 p.i. die Infektionsereignisse analysiert.



Abbildung 49: Analyse der Infektiosität von DHBV Mutanten mit Aminosäureaustauschen an der putativen Schnittstelle R72. (A) PDHs (1x10<sup>6</sup> pro Loch) wurden mit PEG-gefällten DHBV über Nacht mit einer MGE von 100 (1x10<sup>8</sup> DNA-enthaltende Partikel, die zuvor in einem DNA-Dotblot quantifiziert wurden) infiziert. Am Tag 6 nach Infektion wurde die aus den PDHs isolierte virale DNA in einem DNA-Dotblot mit einer radioaktiv-markierten DHBV-spezifischen Sonde hybridisiert und mit dem Phosphorimager Molecular Imager FX (Biorad) analysiert. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit der Software Quantity One und Excel, wobei der unspezifische Hintergrund vor der Berechnung der entsprechenden Signale abgezogen wurde. (B) Partikel, die ins Medium nach Infektion abgegeben wurden, wurden aus den dabei erhaltenen Kulturüberständen ankonzentriert (TCA-Fällung). 1/9 der (gepoolten) Überstände wurden in einem 12,5 %-igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgel (Schägger, von Jagow) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und

mit dem DHBVpreS-spezifischen polyklonalen Antikörper MT92 (1:10.000 verdünnt) das L-Protein nachgewiesen.

In der Analyse der intrazellulären viralen DNA im DNA-Dotblot (Abb. 49 A) zeigte der Aminosäureaustausch Arginin AS 71 zu Lysin keinen Einfluss auf die Infektion. Der Austausch des Arginins AS 72 zu Lysin reduzierte die Infektion. Erst der Austausch beider Arginine führte zu einer stark reduzierten (DHBV RR71,72KK) oder einem Verlust der Infektiosität (DHBV RR71,72GT). Dieses Ergebnis wurde mit der Analyse der aus dem Kulturüberstand der Infektionskulturen präzipitierten Partikel bestätigt (Abb. 49 B). Das Verschieben der putativen Schnittstelle führte ebenfalls zum Verlust der Infektiosität, obwohl kein Unterschied zum Wildtyp hinsichtlich der Sekretion der Viren bestand (Abb. 48).

In weiteren Ansätzen wurden PDHs mit den DHBV Mutanten mit einer MGE von 25 infiziert und am Tag 7 p.i. in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit dem DHBVpreSspezifischen Antikörper MT92 das L-Protein in den infizierten Zellen angefärbt (Abb. 50).



Abbildung 50: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse fixierter, mit DHBVpreS Mutanten infizierter PDHs mit dem anti-DHBVpreS-spezifischem Antikörper MT92. 1x10<sup>6</sup> PDHs pro Loch wurden über Nacht mit PEG-gefällten Viren entsprechend 2,5x10<sup>7</sup> DNA-enthaltender Partikel (MGE von 25) inkubiert. Am Folgetag wurde das Virusinokulum abgenommen und durch zweimaliges Waschen der Zellen vollständig entfernt. Am Tag 7 nach Infektion wurde eine Immunfärbung der fixierten Zellen mit dem DHBVpreS-spezifischen Antikörper MT92 (1:200) durchgeführt. Ein Verschieben der beiden Arginine in Richtung N-Terminus konnte die Infektiosität nicht wiederherstellen. Grün: DHBV-positive Zellen durch den mit Alexa Fluor 488 konjugierten Zweitantikörper sichtbar gemacht; blau: mit Bisbenzimid H 33342 angefärbte DNA in den Zellkernen.

Alle Experimente wurden mehrmals wiederholt (Analysen der intrazellulären viralen DNA im DNA-Dotblot, des L-Proteins im Immunoblot und in der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung) und bestätigten die erhaltenen Ergebnisse. Der Austausch der Aminosäuren an der Stelle R71 und R72, sowie die Verschiebung der putativen Schnittstelle um zwei Aminosäuren führte zum Verlust der Infektiosität der entsprechenden Viren. Dies spricht für eine Beeinflussung der putativen Schnittstelle durch die gewählten Aminosäureaustausche.

## 2.3.4 Analyse der Bindung und Aufnahme der an der putativen Schnittstelle im DHBVpreS mutierten Viren

Parallel zu den Infektionsstudien wurde die Assoziation an bzw. Aufnahme in PDHs zwischen Wildtyp und DHBV RR71,72KK, RR71,72GT und 69RRVK72 untersucht. Zusätzlich zum Wildtyp wurde DHBV R102H gewählt. Diese Mutante infiziert vergleichbar wie der Wildtyp und sollte ein ähnliches Verhalten hinsichtlich Bindung bzw. Aufnahme zeigen.



Abbildung 51: Analyse der PDH-assoziierten und aufgenommenen Viren nach Inkubation bei 4°C oder 37°C. Zu je 1 x 10<sup>6</sup> PDHs pro Loch wurden LMH-Überstände, deren Gehalt an Viren zuvor in einem DNA-Dotblot bestimmt wurde, (MGE 50) gegeben und entweder zwei Stunden bei 4°C oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Pro Ansatz kamen je zwei Vertiefungen zum Einsatz. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurde die Zell-Assoziierte bzw. intrazelluläre virale DNA von bzw. aus den PDHs mit dem QIA Blood Kit isoliert. Je 4  $\mu$ l des Eluates wurden in einer Real-Time PCR eingesetzt.

Es bestanden keine großen Unterschiede hinsichtlich der Anheftung und Aufnahme zwischen den verschiedenen Viren und dem DHBV wt. Durch die Aminsäureaustausche sollte ein der Aufnahme folgender Schritt angesprochen werden und nicht Bindung und Aufnahme beeinflussen.

#### 3. Diskussion

# 3.1 Einfluss des N-terminalen Bereichs Aminosäure 2 - 22 im DHBV L auf die DHBV-Infektion

Mit Hilfe verschiedener Antikörper wurde auf der Hepatozytenoberfläche die nach außen für Rezeptoren zugängliche Lage des DHBVpreS-Teils des großen Oberflächenproteins (L-Protein) in der Virushülle nachgewiesen (Pugh et al., 1987; Schlicht et al., 1987; Grgacic et al., 2000b). Weiterhin führten DHBVpreS-spezifische Antikörper zur Inhibition bzw. Reduktion der DHBV-Infektion von PDHs (in vitro; Tuttleman et al., 1986a; Pugh et al., 1987; Lambert et al., 1990; Lambert et al., 1991a; Pugh et al., 1995; Sunyach et al., 1999) oder Enten (in vivo; Lambert et al., 1991a; Chassot et al., 1993b). Diese Daten bestätigten die wichtige Rolle des DHBVpreS-Teils des Hüllproteins für die Infektion. Ergänzende Experimente mit DHBVpreS-spezifischen Antikörpern zeigten eine Reduktion der Bindung der Partikel an die Hepatozytenoberfläche nach Zugabe von DHBVpreS-spezifischen Antikörpern (Yuasa et al., 1991; Sunyach et al., 1999). Neben diesen das Virus adressierenden DHBVpreS-spezifischen Antikörpern wurden solche getestet, die durch Immunisierung von BALB/c Mäusen mit PDHs oder / und Entenleberplasmamembranen (Borst, 1997; Guo et al., 1997a) oder nach Immunisierung von Kaninchen mit einer löslichen Form der dCPD (Urban et al., 2000) generiert wurden. Diese Antikörper reduzierten und inhibierten ebenfalls die Infektion von PDHs mit DHBV durch die Virus-unabhängige Blockade von Molekülen auf der Hepatozytenoberfläche.



Abbildung 52: Schema der möglichen Antikörper Interaktionen. In beige ist eine Hepatozyte mit Rezeptormolekülen (lila) an der Zellmembran dargestellt. Darüber befinden sich DHBV Partikel und SVPs. IgG Moleküle sind in der Interaktion mit dem L-Protein in grün, in der Interaktion mit einem Rezeptormolekül an der Zellmembran in blau dargestellt. IgM Moleküle, die mit Rezeptormolekülen an der Zellmembran interagieren, sind ebenfalls blau in monomerer und pentamerer Form dargestellt.

Das Schema in Abbildung 52 stellt bildlich dar, an welcher Stelle Antikörper bei der DHBV-Infektion wirken können.

Immunogenitätstudien zeigten, dass der DHBVpreS-Teil im Vergleich zum S-Teil im L-Protein bzw. S-Protein immunogener ist (Schlicht et al., 1987; Cheung et al., 1989) und folglich mehr DHBVpreS-spezifische als DHBV S-spezifische Antikörper erhalten werden. Dies liegt an der teilweise nach außen exponierten Lage des DHBVpreS-Teils und, dass er sehr hydrophil ist und im Gegensatz zu HBV keine "a"-Determinante besitzt. Bei einem Blick auf die Lage der Epitope der verschiedenen DHBVpreS-spezifischen Antikörper fällt ein immunogener Bereich auf, der sich über den Bereich Aminosäure 83 – 107 erstreckt (Sunyach et al., 1999) und einen alpha-helikalen Bereich beinhaltet. Abbildung 53 fasst alle DHBVpreS-spezifischen, neutralisierenden Antikörper hinsichtlich ihrer soweit bekannten (bzw. vermuteten) Epitope im DHBVpreS zusammen, sowie immunogene Bereiche im L-Protein (Chassot et al., 1994).



Abbildung 53: Schema der Lage der Epitope verschiedener, in der Literatur beschriebener neutralisierender Antikörper im DHBVpreS, sowie der immunogenen Bereiche. Angegeben sind die Aminosäuren, die die Epitope umfassen, sowie die entsprechende Literaturstelle der entsprechenden ersten Erwähnung. Mit gelber Farbe sind die Haupt-Epitope der Antikörper MT92 und MT93 hervorgehoben, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden, und in Orange ist der das HeronpreS erkennende Bereich eingezeichnet.

#### 3.1.1 Epitop-Bestimmung der Antikörper MT92 und MT93

Vergleicht man die Epitope der in der Literatur beschriebenen DHBVpreS-spezifischen Antikörper mit den Haupt-Epitopen der Antikörper MT92 und MT93 (Abb. 53), so fällt ihre Lage außerhalb der dCPD-Binderegion vor Aminosäure 23 im DHBVpreS (Abb. 9) und außerhalb der hoch immunogenen, hydrophilen Region auf. In Abbildung 53 sind die Haupt-Epitope des MT92 und MT93 zur Verdeutlichung als gelber Balken eingezeichnet. Beide Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den synthetischen DHBVpreS Peptiden 1 - 41 (MT92) und 2 - 41<sup>myr</sup> (MT93) erhalten. Wen und Kollegen hatten 1990 nach
Immunisierung von Kaninchen mit dem synthetischen Peptid P37 – 49 (DHBVpreS Start-Kodon nt 693 laut der Nomenklatur nach Mandart (Mandart et al., 1984); entspricht DHBVpreS 1 – 13 bei einem Start-Kodon nt 801) die polyklonalen Antikörper anti-P37 – 49 erhalten, die im Immunoblot eine 35 kDa Bande (L-Protein) aus gereinigtem DHBs/preS detektierten (Wen et al., 1990). Auch der nach der Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem rekombinant hergestelltem DHBVpreS 1 – 131 erhaltene polyklonale Antikörper DPS (zuvor anti-DHBVpreS 1 – 131; (Lambert et al., 1991a) erkannte diese Bande und enthielt Antikörper mit Epitopen im Bereich Aminosäure 12 – 23 und weiteren Bereichen (siehe Abb. 53 blauer Balken; (Chassot et al., 1994). Beide Antikörper (anti-P37 – 49 und DPS) wurden bisher nicht zur Immunpräzipitation zur Klärung der Exposition der entsprechenden Bereiche im DHBV genutzt.

## **3.1.2 Immunpräzipitation viraler und subviraler Partikel aus DHBV-positivem Entenserum**

Um die für Antikörper an der Virus-/SVP-Oberfläche Zugänglichkeit des Bereichs der Haupt-Epitope der Antikörper MT92 und MT93 zu überprüfen, wurde eine Immunpräzipitation von SVPs und viralen Partikeln aus DHBV-positivem Entenserum durchgeführt. Sie sollte Aufschluss über eine mögliche Interaktion der Antikörper an der Virusoberfläche mit dem DHBVpreS-Teil des L-Proteins und eine mögliche Kompetition der Bindung des Virus an Rezeptormoleküle geben.

Interessanterweise konnte der Antikörper MT 93 DHBVpreS-enthaltende Partikel aus DHBVpositivem Serum präzipitieren (Abb. 12). Da die Analyse der Immunpräzipitation durch einen Immunoblot erfolgte und nicht zusätzlich einem die DNA-enthaltenden Viren nachweisenden DNA-Dotblot, handelte es sich um DHBVpreS-enthaltende Partikel. SVPs und Viren enthalten die gleichen Hüllproteine und zeigen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Oberflächenstruktur (Nassal et al., 1996; Bruns et al., 1998). Folglich reicht allein eine Präzipitation gereinigter SVPs mit Antikörpern aus, um eine Aussage über die Exposition des Bereiches Aminosäure 2 – 22 an der Oberfläche machen zu können (Grgacic et al., 2000b). Das Ergebnis zeigte eine Interaktion des Antikörpers MT93 mit DHBVpreS-enthaltenden Partikeln und damit die Zugänglichkeit der Aminosäuren 2 – 22 auf der Virusoberfläche. Dies steht im Widerspruch mit der Beobachtung von Grgacic, die mit einem DHBVpreSspezifischen Antikörper mit dem Epitop von Aminosäure 10 – 29 keine gereinigten SVPs präzipitieren konnte (Grgacic et al., 2000b). Ein Grund könnte ein für diesen Antikörper teilweise verdecktes Vorliegen der entsprechenden Bereiche im DHBVpreS sein. Das erhaltene Ergebnis widerspricht auch dem von Chojnacki vorgeschlagenen Topologie Modell (Chojnacki et al., 2005). Der Antikörper MT 93 reagierte mit HHBVpreS und erkennt somit sehr wahrscheinlich die konservierte Region zwischen HHBVpreS und DHBVpres vor Aminosäure 22. Dies spricht für die Interaktion mit einem Kofaktor wichtigen Bereich AS 12 - 22, da ebenfalls das synthetische myristoylierte HHBVpreS Peptid 2 - 44<sup>myr</sup> die DHBV-Infektion primärer Entenhepatozyten inhibierte (Urban and Gripon, 2002).

In diesem Zusammenhang wäre ein Test des von Wen beschriebenen Antikörpers anti-P37 – 49 in der Immunpräzipitation interessant. Wenn dieser Antikörper ebenfalls SVPs präzipitieren könnte, wäre die nach außen gerichtete Exposition oder zumindest die Zugänglichkeit des N-terminalen Bereichs des L-Proteins AS 2 – 22 in der Virushülle bestätigt. Zusätzlich wäre dadurch das Ausreichen dieses Bereichs für eine Immunkomplexbildung gezeigt. Die in mehreren Studien und Veröffentlichungen beschriebene Topologie des L-Proteins bleibt bei diesen Aussagen unberücksichtigt (Swameye and Schaller, 1997; Guo and Pugh, 1997b; Grgacic and Schaller, 2000a; Grgacic et al., 2000b; Chojnacki et al., 2005). Mit umfangreicheren Untersuchungen könnte die Anzahl der L-Proteine mit einem nach außen exponierten Bereich AS 2 – 22 und die Konsequenzen auf die Infektion ermittelt werden.

#### 3.1.3 Infektionsinhibitionsstudie im PDH-DHBV-Infektionsmodell

Es stellte sich die Frage des Einflusses der Antikörper MT92 und MT93 auf die DHBV-Infektion. In den dazu durchgeführten Versuchen wurden die Antikörper MT92 und MT93 vor Zugabe des Virusinokulums zur PDH-Kultur gegeben und die Komplexe über Nacht auf den Zellen belassen. In den Infektionsversuchen mit MT92 und MT93 konnten beide Antikörper konzentrationsabhängig die Infektion reduzieren bzw. verhindern (Abb. 13). Diese Abhängigkeit der Inhibition von der zugegebenen Antikörpermenge zeigte die Spezifität dieser Interaktion. Um sicher zu sein, dass ausschließlich die IgGs der Antikörper für die Infektionsinhibition verantwortlich waren, wurden die gereinigten IgGs des Antikörpers MT93 nach Konzentrationsbestimmung in zunehmender Menge in den Infektionsversuch eingesetzt. Als Kontrollexperiment wurden steigende Mengen an Präimmun-Kaninchenserum zum Infektionsversuch gegeben. Die Spezifität der Inhibition durch die IgGs des anti-DHBVpreS MT93 führte in der Inhibition in den Ansätzen mit IgGs zu einem typischen Abfall des Infektionsereignisses im Vergleich zu Ansätzen nach Prä-Immunserumzugabe. Folglich waren für die Inhibition ausschließlich die IgGs und nicht Serumproteine der immunisierten Kaninchen verantwortlich (Abb. 14). Unter der Annahme, dass pro DHBV 20 L-Proteine vorliegen (Schlicht et al., 1987; Klingmüller and Schaller, 1993), kompetitierten 435 ng IgG (entsprechen 1,75 x 10<sup>12</sup> IgG-Molekülen) 4,5 x 10<sup>11</sup> L-Moleküle. Ein ähnliches

Ergebnis ist auch für gereinigte IgGs des Antikörpers MT92 zu erwarten, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wurde. Da aber beide Antikörper die gleichen Epitope aufweisen und die ungereinigten Antikörper zur vergleichbaren Inhibition führen (Abb. 13), liegt ein ähnlicher Verlauf der Inhibition mit IgGs nahe.

#### 3.1.4 In vitro Bindungsstudie mit fluoreszenz-markierten DHBVpreS 1 - 130

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte aufgrund der Lage der Epitope (Abb. 53) der Einfluss der Antikörper auf die DHBVpreS-dCPD-C Interaktion geklärt werden. Dazu wurde rekombinantes, Rhodamin-markiertes DHBVpreS Protein 1 - 130 entweder mit dem Antikörper MT92 oder dem Hybridomüberstand, der den monoklonalen DHBVpreS-spezifischen Antikörper 4F8 enthielt, vorinkubiert und dann auf mit nach adenoviraler Transduktion dCPD tl-produzierende HepG2-Zellen inkubiert. Die Zugabe des MT92 beeinflusste im Gegensatz zur Zugabe des 4F8 nicht die Bindung an die dCPD Variante (Abb. 15). In einem weiteren Experiment wurde ebenfalls die Bindung der sdCPD-C an ein planares Trägermaterial immobilisiertes DHBVpreS 1 - 165 trotz Zugabe der IgGs des MT93 nicht inhibiert (Daten nicht gezeigt).

Die darauf folgende Dichtezentrifugation erbrachte keinen Aufschluss über die Folgen der IgGs des Antikörpers MT93 auf die Komplexbildung von DHBV mit sdCPD-C (Daten nicht gezeigt).

Da das myristoylierte DHBVpreS Peptid  $2 - 21^{myr}$  die Infektion von PDHs nicht beeinflusste, das myristoylierte DHBVpreS Peptid  $2 - 41^{myr}$  aber eine Infektion inhibieren und an Hepatozyten binden konnte, wurde gefolgert, dass das Peptid  $2 - 41^{myr}$  mit Hepatozyten direkt interagieren und dadurch die Interaktion des DHBV verhindern könnte (Urban and Gripon, 2002). In diesem Peptid liegt der Bereich von Aminosäure 22 bis 41. Deshalb wäre die Untersuchung des Einflusses eines Peptides DHBVpreS 22 - 41 auf eine Infektion interessant, da dieser Bereich im DHBVpreS mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf der Virusaußenseite exponiert ist (Grgacic et al., 2000b; Chojnacki et al., 2005). Eine Interaktion dieses Bereichs mit Faktoren auf oder in Hepatozyten kann erst nach räumlicher Umorientierung des L-Proteins erfolgen (wie z. B. nach erfolgter Aufnahme durch pH-Änderung oder durch Spaltung des L-Proteins mittels eines Enzyms), wodurch entsprechende Epitope freigelegt würden. Ergänzend wäre die Auswirkung des DHBVpreS Peptid 2 - 44<sup>myr</sup> auf die Bindung des DHBV an die Hepatozytenoberfläche mit der quantitativen Real-Time PCR zu überprüfen.

Um eine Inhibition durch sterische Behinderung ausschließen zu können, wären Infektionsstudien mit Fab-Fragmenten der gereinigten Antikörper sinnvoll. Sie könnten

Aufschluss über die Bedeutung des Bereichs AS 2 - 22 oder nachfolgende Aminosäuren für die Inhibition geben.

Soweit wurde die Exposition des Bereichs AS 2 – 22 im DHBVpreS des L-Proteins auf der Virusoberfläche und die inhibitorische Wirkung der Antikörper MT92 und MT93 auf die Infektion von Hepatozyten mit DHBV gezeigt. Diese Inhibition könnte intrazellulär mit einem für die nach Aufnahme weiteren Schritte während der Infektion notwendigen Korezeptor interferieren. Die Annahme eines Korezeptors wurde bereits von Lenhoff (Lenhoff and Summers, 1994a) und Ishikawa (Ishikawa et al., 1994) auf Grund der folgend genannten Ergebnisse geäußert: durch Linker Scanning erhaltene DHBV Mutanten 5-L-15, 18-L-27, 25-L-37 und 32-L-44 von Lenhoff waren nicht mehr infektiös. Die entsprechenden von Ishikawa generierten DHBVpreS-GST Fusionsproteine BED4 (korreliert zu 18-L-27) und BED8 (korreliert zu 32-L-44) waren aber nicht dCPD-bindedefizient. Die Transfektion DHBV-freier Pekingenten mit den Deletionen D813 (entspricht  $\Delta$ 5-14) und D864 (entspricht  $\Delta$ 22-30) tragenden DHBV26-Genomen führten ebenfalls nicht zur Infektion dieser Tiere (Fernholz, 1992). Das wichtigste Argument für einen Korezeptor bleibt die Inhibition mit dem DHBVpreS Peptid 2 - 41<sup>myr</sup>. Ein gänzlich anderer Mechanismus kann aber durch die bisher durchgeführten Versuche nicht ausgeschlossen werden.

## 3.1.5 Perspektive

Es gilt, die Rolle dieser Bereich bei der Infektion zu klären. Entsprechend könnte die Wirkung des myristoyliertes DHBVpreS Peptid 22 - 41<sup>myr</sup> auf die Infektion getestet werden. Falls dieser Bereich zu einer Inhibition führt, könnte dies an der Kompetition eines Interaktionspartners oder eines weiteren für die Infektion essentiellen Schritts innerhalb des Hepatozyten liegen.

## **3.2 Untersuchung der Rolle der Carboxypeptidase D der Ente bei Bindung,** Aufnahme und Infektion

Tabelle 2 listet Ergebnisse von Experimenten mit Deletionsmutanten im Bereich AS 85 - 125 auf. Dabei fällt der Einfluss dieses Bereichs auf Bindung, Infektion, Kompetition etc. auf, der bei Fehlen dieses Bereiches nicht zu beobachten war.

	Fernholz 1993	<b>Bruns</b> 1998	<b>Ishikawa</b> 1994	<b>Urban</b> 1998	<b>Ishikawa</b> 1994	Breiner 1998	<b>Urban</b> 2000	Autor
DHBVpreS	Infektion in vivo	Enhancement in vitro	Infektion in vitro	Infektions- kompetition in vitro	Bindung	Bindungs- kompetition	SPR-basierte Kompetition	Experiment
∆ <b>85-96</b>	-	-	n.d.	-	n.d.	-	-	
∆ <b>101-109</b>	n.d.	n.d.	-	-	-	-	-	
∆ <b>107-125</b>	-	-	n.d.	-	n.d.	-	-	
	keine Virämie	kein Enhancement	keine Infektion	keine Kompetition	keine Bindung	keine Kompetition	keine Kompetition	Ergebnis

**Tabelle 2: Übersicht verschiedener Versuchsansätze zur Klärung der Bedeutung des Bereiches AS 85-125 im DHBVpreS des L-Proteins.** Das Minus-Zeichen - steht für das negative Ergebnis des entsprechenden Experimentes. n.d. entspricht "nicht durchgeführt". Mit blauer Farbe sind Ergebnisse von Experimenten hinterlegt, bei denen die Auswirkung auf die dCPD-Bindung untersucht wurde (Fernholz et al., 1993; Ishikawa et al., 1994; Breiner, 1998; Bruns et al., 1998; Urban et al., 1998; Urban et al., 2000).

In diesem Bereich liegt eine alpha-Helix (AS 89 - 104). Die in Abbildung 17 aufgelisteten Aminosäureaustausche führen aufgrund von Ladungsänderungen zur Änderung der Amphipathizität oder zur Störung der Integrität der  $\alpha$ -Helix. Die durchgeführten Experimente mit den entsprechenden Mutanten sollten die Auswirkung auf die dCPD-Bindung und die daraus resultierende Auswirkung auf die Infektion untersuchen.



Abbildung 54: Schema zur Amphipathizität der alpha-Helix AS 89 - 104. (A) vereinfachte Darstellung des in Abb. 11 B gezeigten Helix Wheel; (B) Darstellung der alpha-Helix als Zylinder mit dem amphipathischen Moment. o entspricht hydrophoben Aminosäuren; + steht für die basischen und – für die sauren Aminosäuren.

Abbildung 54 veranschaulicht einen Austausch der Glutaminsäure (- für saure Aminosäure, negative Ladung) an den Stellen E91 und E98 zu Valin (hydrophob) mit entsprechendem Einfluss auf die Amphipathizität. Bei einer Ladungs-abhängigen Interaktion zwischen dCPD und dem DHBVpreS-Teil des L-Proteins sollte dadurch Bindung und Interaktion beeinflusst werden. Durch den Austausch der Arginine an den Stellen 101 oder 102 mit dem Helix-

Brecher Prolin am Ende der Helix wird die Integrität der Helix gestört. Bei einer strukturabhängigen Interaktion zwischen dCPD und dem DHBVpreS-Teil des L-Proteins sollte dadurch Bindung und Interaktion beeinflusst werden.

Im Falle der C-terminalen amphipathischen Helix (alpha-Helix 3) des Apolipoproteins C-II (Apo C-II) ist diese Helix für die Interaktion des Apo C-II mit der Lipoprotein Lipase (LPL) und deren Aktivierung notwendig (Zdunek et al., 2003). Lam berichtete von einem Fall von Geschwistern mit dem Chylomikronämie Syndrom mit einer Mutation bei AS 72 im *APOC2* Gen. Aufgrund Sekundärstrukturvorhersagen vermutete Lam eine Änderung der Sekundärstruktur der C-terminalen Helix (alpha-Helix 3) durch den mit der Mutation verursachten Aminosäureaustausch des hydrophoben Helix-Bildners Leucin (CTT) mit dem Helix-Brecher Prolin (CCT), in Folge derer sich die Interaktion zwischen dem Apo C-II und der LPL ändert und zu einem Apo C-II Mangel führt (Lam et al., 2005). Es zeigte die Bedeutung einer amphipathischen Helix für die Aktivierung eines Enzyms du entsprechende Auswirkungen nach Verlust der Struktur.

## 3.2.1 DHBVpreS Proteine mit Punktmutationen in der amphipathischen Helix

Die Änderung der Aminosäuresequenz durch einzelnen Aminosäureaustausch beeinflusste nicht die Ausbeute an Protein nach der Expression in den Bakterien-Großkulturen. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, wiesen die gereinigten DHBVpreS Proteine unterschiedliche Mobilität in der Gelelektrophorese auf, und erfolgte Aminosäureaustausche waren teilweise bereits nach Anfärbung des SDS-Geles mit Coomassie-Blau sichtbar.

Mit Hilfe der gereinigten DHBVpreS Mutanten konnten die Epitope der monoklonalen DHBVpreS-spezifischen Antikörper 1H1 (Pugh et al., 1995) und 4F8 auf den Bereich AS 101 - 109 bzw. 101 - 105 eingegrenzt werden. Beide Antikörper wirken neutralisierend auf die DHBV-Infektion von PDHs (Pugh et al., 1995 und eigene Untersuchungen). Die ermittelten Epitope liegen innerhalb der dCPD-Binderegion im DHBVpreS und inhibieren durch Störung der dCPD-Bindung.

## 3.2.2 Unterschiedliche dCPD-C-Bindefähigkeit der einzelnen DHBVpreS Proteine

Der Einfluss der Änderungen der Aminosäuren auf die Interaktion der gereinigten DHBVpreS Proteine mit der löslichen Form der C-Domäne der dCPD (sdCPD-C) wurde näher untersucht. Es wurde in Betracht gezogen, dass auch schwache, instabile Bindungen bzw. Interaktionen sichtbar gemacht werden sollten, dem durch Inkubation der Ansätze bei unterschiedlichen Temperaturen Rechnung getragen wurde. Die Inkubation bei 4°C führt zur Stabilisierung eines Komplexes, der aufgrund seiner Lage des Gleichgewichts auf der Seite der Einzelkomponenten und somit aufgrund einer größeren Dissoziationskonstante instabil ist. Durch die Inkubation bei 4°C wird das Gleichgewicht auf die Seite des Komplexes gedrängt. Für E91V, E98V, EE91,98VV und Q104P zeigte sich eine Stabilität der Komplexe, die dem des Wildtyps entsprach und unabhängig von der Temperatur war (in den Abb. 23 - 25, die Spuren 4, 6, 7 und 10). Die sukzessive Erhöhung der Temperatur von 4°C über 22°C (Raumtemperatur) bis zu 37°C (Inkubationstemperatur der PDH-Kulturen) führte bei R101P und D93Q zur unterschiedlichen Komplexstabilität (in den Abb. 23 - 25, die Spuren 5 und 8). Für R101P führte die Inkubation bei 37°C zu einem der dCPD-bindedefizienten Mutante Δ101 - 109-ähnlichen Verlust der Bindefähigkeit (Abb. 25, vgl. Spur 3 mit Spur 8). Im Gegensatz zu den Beobachtungen für D93Q und R101P war die Bindefähigkeit des R102P bereits von Anfang an drastisch reduziert. Der Austausch des Arginins mit Prolin an dieser Position führte zur Störung der Struktur des DHBVpreS und daraus resultierend zum Verlust der sdCPD-Bindung und Komplexbildung. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten eine Abhängigkeit der Bindung der getesteten DHBVpreS Mutanten an die sdCPD-C von der Struktur und nicht von der Ladung. Dies bestätigte die von unserer Gruppe gezeigte Notwendigkeit der Integrität der kurzen alpha-Helix des DHBVpreS im L-Protein für die Infektion (Urban et al., 1998).

#### 3.2.3 Einfluss der Aminosäureaustausche auf die Virenproduktion

Es stellte sich die Frage nach dem Einfluss der getesteten Mutationen im viralen Kontext auf die Infektion. Unter der Annahme einer Korrelation zwischen biochemisch erhaltenen Daten (Verlust der dCPD-Bindefähigkeit) und *in vitro* Infektionsstudien (Verlust der Infektiosität) sollten entsprechende Viren getestet werden. Dies würde deutlicher den Einfluss der Änderungen im L-Protein auf die Infektion und Anheftung an Hepatozyten zeigen.

Da alle Mutanten in vergleichbaren Mengen als Viren sezerniert wurden, lagen keine Störung des Assembly und der Replikation vor. Dies wurde mit einer DNA-Dotblot Analyse mit dem Nachweis der viralen DNA (Abb. 27), sowie im Immunoblot mit dem Nachweis des L-Proteins (Abb. 28) überprüft. Auch der Austausch D93Q mit dem Austausch der Aminosäuren RP310,311TA in der Polymerase führte zur Produktion der gewünschten Viren. Der Bereich des DHBVpreS liegt in der "Spacer-Region" der Polymerase (siehe Abb. 26 A), und Mutationen in diesem Bereich sollten keinen Einfluss trotz eventueller Aminosäureänderungen in der Polymerase auf die Virusproduktion nehmen. Dies bestätigte sich im Fall des D93Q in der Analyse mit einem DNA-Dotblot und Immunoblot.

Im Immunoblot konnten die Mutationen R101P, R102P und Q104P nach Inkubation mit den Antikörpern 1H1 und 4F8 bereits detektiert werden, da beide diese DHBV Mutanten reduziert bzw. nicht detektierten (Abb. 28 B + C).

Im Falle des DHBV R101P zeigte sich wiederholt eine etwas verringerte Produktion von Viren und Cores. Die Reduktion der Sekretion wurde nicht weiter untersucht, da die Menge sezernierter Viren für die entsprechenden Versuche in ausreichender Menge produziert werden konnten. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Sekretion sind die von Hild in seiner Dissertation erhaltenen Ergebnisse. Die Arginine R101 und R102 stellen neben zwei weiteren Positionen im L-Protein wahrscheinliche Hsc70-Bindestellen dar (Hitzeschockprotein 70, (Hild, 1997)). Hsc70 scheint eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Nukleokapsids an die Virushülle zu spielen (Hild, 1997). Unterschiede im Gehalt an Hsc70 in Viren und SVPs könnten zur Änderungen der Topologie des L-Proteins führen und dadurch zur Störung der Verankerung des Nukleokapsids. Ergebnisse von Hild in dieser Richtung ergaben keinen Einfluss der Mutation RR101,102LH auf die Membrantopologie des L-Proteins nach in vitro Translation / Transkription (Hild, 1997). Dies schließt aber nicht den Einfluss des einzelnen Austausches des Arginins 101 auf die Membrantopologie und Virusproduktion aus.

## 3.2.4 Einfluss der Punktmutationen auf die Infektiosität der entsprechenden Viren

Die *in vitro* Infektionsstudien ergaben eine Korrelation zwischen den in den biochemischen *in vitro* Bindungsstudien mit DHBVpreS R101P und R102P erhaltenen Ergebnissen und der Infektiosität der entsprechenden Viren. Der Austausch des Arginins R101 oder R102 mit Prolin hatte den größten Einfluss auf die Interaktion zwischen der sdCPD-C und DHBVpreS (Abb. 23 - 25). Beide DHBV Mutanten waren nicht in der Lage, PDHs zu infizieren (Abb. 29 – 31). In Abbildung 32 A erkennt man die Reduktion der Infektion im Falle DHBV R101P und R102P am Tag 4 p.i. und Tag 7 p.i.

Für die Mutante DHBV myr<sup>-</sup> wurde ein Verlust bzw. sehr starke Reduktion der Infektiosität beschrieben durch den Austausch des Glycins durch ein Alanin mit Zerstörung der Myristylierungsstelle (Macrae et al., 1991; Summers et al., 1991; Borst, 1997). Diese Mutante wurde als eine Kontrolle in der Infektionsstudie eingesetzt (vgl. dazu die DHBVpreS  $\Delta 101$  -109 als bindedefiziente Kontrollmutante im biochemischen Bindungsexperiment). Für diese Mutante ist nach einer längeren Dauer des Infektionsversuches, sowie einer sehr sensitiven Nachweismethode eine Infektion *in vitro* und *in vivo* nachweisbar, die nicht auf Revertanten zurückzuführen war (Borst, 1997). Dies spricht für die Bedeutung der korrekten räumlichen Ausrichtung des L-Proteins für die Infektion.

Die Analyse am Tag 4 p.i. zeigte präferentiell die primäre Infektionsrunde, wohingegen man am Tag 7 p.i. einen erfolgten Virusspread innerhalb der PDH-Kultur annehmen kann.

#### 3.2.5 Einfluss anderer Aminosäureaustausche an den Stellen R101 und R102P

Um den beobachteten Verlust der Bindung des mutierten DHBVpreS an sdCPD-C und der Verlust der Infektiosität der Viren DHBV R101P und DHBV R102P näher zu untersuchen, wurden die Aminosäuren entweder konservierend durch Histidin oder durch hydrophobes Leucin ausgetauscht. Bleibt der Verlust der Infektiosität weiter bestehen, liegt dies an dem Austausch des Arginins und ist folglich Aminosäure-spezifisch. Ist der Verlust nicht mehr vorhanden, ist die Struktur der  $\alpha$ -Helix essentiell.

Die biochemische *in vitro* Bindungsstudie der gereinigten rekombinanten Proteine DHBVpreS R101L, R101H und R102H zeigten ein Wildtyp-entsprechendes Bindungsverhalten (Abb. 34). Der beobachtete Verlust bzw. die Reduktion der Bindung hängt nicht von der Ladung, sondern von der Integrität der  $\alpha$ -Helix im essentiellen Bereich der dCPD-Binderegion ab.

Es stellte sich die Frage nach der Auswirkung auf die Infektiosität der entsprechenden Viren. Im Falle des DHBV R101H gelang keine ausreichende Virusproduktion. Dies lag möglicherweise an der größeren Bedeutung des R101 für die Sekretion und die Interaktion mit Hsc70 als R102. Im Falle DHBV R102H war die Menge für die Durchführung der Infektionsversuche ausreichend. Im biochemischen Bindungsansatz zeigte die entsprechende Prolin-Mutante den größten Verlust der Bindefähigkeit. Der Austausch des Arginins AS 102 zu Histidin beeinflusste im Gegensatz zum Austausch zu Prolin nicht die Infektiosität des Virus (Abb. 37). Die Wiederholung des Infektionsversuchs mit Analyse der erfolgten Infektion in der indirekten Immunfluoreszenz (Abb. 38) zeigte erneut den Einfluss der Änderung der Integrität der  $\alpha$ -Helix durch den Austausch mit dem Helix-Brecher Prolin an der Stelle R101 und R102 (DHBV R101P und DHBV R102P) mit einem vollständigen Verlust der Infektiosität.

## **3.2.6** Bindungsstudie mit einer quantitativen Polymerasekettenreaktion auf humanen Hepatomzellinien

Bereits hinsichtlich der DHBV myr<sup>-</sup> Mutante wurde darüber spekuliert, ob diese große Reduktion der Infektiosität aufgrund eines Verlustes einer effizienten Bindefähigkeit an die Hepatozyten erfolgte (Borst, 1997). Dies wurde für diese Mutante nicht näher überprüft. In den ersten Untersuchungen mit der sehr sensitiven Nachweismethode der quantitativen Real-Time PCR konnte das DHBV R102P etwas reduziert im Vergleich mit DHBV wt an HepG2.18-Zellen (Abb. 39) binden. Diese Zelllinie ist stabil mit einem dCPD-Expressionsplasmid transfiziert. Sie ermöglicht eine Untersuchung der dCPD-Bindung im zellulären Umfeld. Dabei bleibt aber die Überexpression der dCPD in dieser Zelllinie und folglich die nicht der in PDHs entsprechende Menge der dCPD zu bedenken.

Die Beobachtung der Bindung des DHBV wt an HepG2-Zellen (Abb. 39) deutete auf einen unspezifischen Bindeprozess hin. Bindungs-Versuche mit <sup>125</sup>-I-DHBV Partikeln und HepG2-Zellen im Vergleich zu PDHs ergaben im Falle der HepG2-Zellen einen linearen Anstieg der Anzahl der an Zellen gebundenen DHBV Partikel mit der Menge der eingesetzten Partikel, woraus Klingmüller auf eine unspezifische Bindung schloss (Klingmüller, 1992). Köck wies 1993 die Bindung von DHBV an HepG2-Zellen und auch nach dreimaligem Waschen bis zu 3 Tage nach Inkubation virale DNA nach (Kock and Schlicht, 1993). In weiteren Versuchen konnte er keine cccDNA-Bildung finden, woraus er keine erfolgreiche Aufnahme schlussfolgerte. Da aber die Aufnahme nicht mit der Bildung der cccDNA gleichzusetzen ist, hätte er die Aufnahme von Viren bereits mit dem Nachweis der Amplifikation eines Fragmentes mit der PCR über den kontinuierlichen Bereich der RC-DNA (engl. relaxed circular-DNA) nachweisen können (Qiao et al., 1999). Zusätzlich konnte Köck das effiziente (90 %) Entfernen von DHBV Partikeln durch eine Trypsin-Inkubation der PDHs etablieren, wodurch ausschließlich aufgenommene Partikel durch Nachweis der DNA in einer PCR detektiert werden konnten (Kock et al., 1996). Dies ist bei der Quantifizierung der Anzahl aufgenommener Viren zu beachten. Die Arbeit von Köck war die Grundlage für von Funk und Kollegen 2004 durchgeführte Bindungs- und Aufnahme-Versuche (Funk et al., 2004b)

Alle genannten Versuche nutzten sensitive Methoden zum Nachweis der cccDNA und der viralen DNA. Die Real-Time PCR ist noch sensitiver und vermag bereits ein einzelnes virales DNA-Molekül nachzuweisen.

Aus den soweit mit HepG2-/ HepG2.18-Zellen durchgeführten Experimenten kann man folgendes schließen:

- die durchgeführte Real-Time PCR war spezifisch, da in Kontrollansätzen sowie Ansätzen ohne Template (Abb. 39 ddH<sub>2</sub>0) keine Signale erhalten wurden;
- das Vorhandensein der dCPD in den HepG2.18-Zellen ergab keinen großen Unterschied zu den nicht dCPD-exprimierenden HepG2-Zellen, da die Bindung des

DHBVwt bei beiden vergleichbar war und dem des DHBV R102P entsprach (Abb. 39).

## **3.2.7** Bindungsstudie mit einer quantitativen Polymerasekettenreaktion auf primären Entenhepatozyten

Es stellte sich die Frage nach einer Korrelation zwischen der Infektiosität der in der  $\alpha$ -Helix mutierten Viren und der Bindung und Aufnahme der Viren an bzw. in PDHs.

Bei der Inkubation bei 4°C konnten Zell-Assoziierte Viren detektiert werden, weil bei dieser Temperatur nur die Bindung von DHBV an Zellen und nicht die Aufnahme möglich ist (Rigg and Schaller, 1992). Bei der Inkubation bei 37°C kann man bereits nach 30 Minuten die erfolgte Aufnahme in die Zellen im Zytoplasma detektieren (Qiao et al., 1999).

Im gezeigten Experiment mit PDHs konnte auf Grund der fehlenden Trypsin-Behandlung der PDHs nicht die Menge der aufgenommenen Viren exakt quantifiziert werden, da Zell-Assoziierte Viren mitdetektiert wurden. Die Zell-Assoziation führte bei der Inkubation bei 37°C im Vergleich zu 4°C zu einer größeren Menge gebundener Viren (höherer Wert der viralen DNA). Damit bestätigte sich die Aussage von Klingmüller, dass bei 4°C die Bindung der DHBV-Partikel an Hepatozyten äußerst gering war (Klingmüller, 1992). In dem hier durchgeführten Versuch kam es bei 4°C zu einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Assoziation des DHBV R102P an PDHs. Die Aufnahme bei 37°C erfolgte bei beiden Viren (DHBV wt und DHBV R102P) (Abb. 40).

Dieses Ergebnis widerspricht der bisher gültigen Annahme der dCPD als primäreren, eine Aufnahme in PDHs vermitteltenden Rezeptor. DHBV R102P ist dCPD-bindedefizient und sollte bei dCPD-vermittelter Aufnahme nicht in PDHs aufgenommen werden. Die Bindung an und Aufnahme in PDHs ist bei DHBV R102P nicht gestört und die Rolle der dCPD als primärer Aufnahmerezeptor damit in Frage gestellt. Es spricht weiter dafür, dass wahrscheinlich ein anderer Bereich im DHBVpreS für die Bindung und Aufnahme wichtig ist. Folglich ist die Frage nach einem DHBV-relevanten primären Rezeptormolekül erneut aufgeworfen.

Aus den soweit vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Integrität der  $\alpha$ -Helix neben der Myristoylierung des L-Proteins wichtiger für die Infektion ist als die Amphipathizität der  $\alpha$ -Helix. Die besondere Bedeutung dieser  $\alpha$ -Helix spiegelt sich in der Konserviertheit dieses Bereichs innerhalb der verschiedenen DHBV-Isolate, sowie der geringen Anzahl an Austauschen bei anderen Avihepadnaviren wie HHBV, CHBV, STHBV, SGHBV und RGHBV wider (siehe Abb. 57 im Anhang).

Die erhaltenen Ergebnisse werfen die Frage nach einem primären Rezeptormolekül und den Zeitpunkt der Teilnahme der dCPD im Infektionsprozess auf.

#### 3.2.8 Perspektive

Die wichtige Rolle der dCPD bei der Infektion steht außer Frage. Unklar bleibt aber, wann und wo in der Zelle sie ihre Funktion ausübt. Zur weiteren Klärung dieser Frage wären Fraktionierungen von Entenhepatozyten nach Aufnahme von DHBV wt im Vergleich mit DHBV R102P in Abhängigkeit der Zeit hilfreich. Breiner beobachtete nach Infektion eine Abnahme der dCPD-Menge in Abhängigkeit der Zeit (Breiner et al., 2001). Er untersuchte aber nicht die Lokalisation der dCPD und des DHBV innerhalb der ersten Stunden nach Aufnahme. Ergänzende Versuche unter Berücksichtigung der von Qiao bei 37°C gemachten Beobachtung der Aufnahme von DHBV in das Zytoplasma nach 30 Minuten und der Nukleokapside in den Kern innerhalb von 4 h unter der Voraussetzung einer synchronisierten Infektion könnten zur Aufklärung beitragen (Qiao et al., 1999).

Des Weiteren ist es wichtig zu überprüfen, ob eine dCPD-unabhängige Aufnahme ausreichend für die Infektion ist, indem zuvor die dCPD in PDHs mit RNAi Gene Silencing ausgeschaltet wird.

Als ein weiteres Ziel fortführender Arbeiten bleibt die Untersuchung der für die Bindung und Aufnahme verantwortlichen Proteine (Rezeptormoleküle). Warum es nicht möglich war bzw. ist, andere Proteine mittels der von Kuroki genannten Immunpräzipitation zu isolieren (Kuroki et al., 1994), liegt wahrscheinlich an der geringen Anzahl der entsprechenden Proteine an der Oberfläche und in den Hepatozyten. Klingmüller konnte 1992 in einem Crosslinking-Versuch mit dem synthetischen Peptid DPS13 drei mögliche Bindeproteine von 69 kDa, 55 kDa und 42 kDa Größe auf der Hepatozytenoberfläche ermitteln (Klingmüller, 1992). In wieweit diese Bindeproteine die DHBV-Infektion beeinflussen und um welche Proteine es sich handelte, wurde nicht weiter untersucht. Zudem wurde nur der Bereich AS 82 - 121 im DHBVpreS zum Crosslinken gewählt. Da dCPD nicht häufig an der Oberfläche anzutreffen ist, könnte dies die Ursache sein, warum in diesem Ansatz kein 180 kDa-großes Bindeprotein gefunden wurde. Borst isolierte 1997 (Borst, 1997) mittels einer Affinitätschromatographie ein 85 kDa-großes Protein aus Entenhepatozyten. Sie hatte zuvor monoklonale Antikörper gegen komplette Hepatozyten generiert, die eine DHBV-Infektion spezifisch neutralisierten, sowie die Aufnahme von DHBV blockieren konnten. Mit diesen Antikörpern isolierte sie ein spezifisch an der Zelloberfläche und ausschließlich in Entenhepatozyten vorkommendes 85 kDa-großes Protein. In wieweit es sich bei diesem

Protein um einen für die Bindung essentiellen Partner handelte, bedarf weiteren Untersuchungen.

Ein weiterer Ansatz zur Überprüfung der Notwendigkeit der kurzen  $\alpha$ -Helix für die Bindung der dCPD-C und die Infektion wäre ein Umkehren der  $\alpha$ -Helix im DHBVpreS. Wie in Abbildung 55 zu sehen ist, bleibt dabei eine  $\alpha$ -Helix bestehen. Im Falle der alpha-invers Mutante, bei welcher die drei Aminosäuren 88-WTP-90 am Start der  $\alpha$ -Helix unverändert blieben, würden die Länge und der Start der  $\alpha$ -Helix beibehalten. Würde man aber diese drei Aminosäuren ebenfalls invertieren, käme es zu einem Verschieben des Beginns der  $\alpha$ -Helix zur Position P87, sowie einem Verkürzen auf eine Länge von 12 AS. Bindungsversuche mit diesen Mutanten als rekombinante Proteine können die Rolle einer  $\alpha$ -Helix AS 89 - 104 mit einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix wie der amphipathischen  $\alpha$ -Helix 3 des humanen Apo C-II austauschen. Im Falle einer Bindung der sdCPD-C an die entsprechenden Proteine wäre es interessant, die Infektiosität der entsprechenden DHBV Mutanten zu testen.

	80	90	100	110	120	130
Wildtyp	SNPTPQEIPQE	PQWTPEEDQ	KAREAFRRY	2EERPPETTT:	IPPSSP <u>P</u> QWK	LQPGDDP
DPM	ctcccchcccc	cccchhhh	hhhhhhhh	hhctccccc	cccctcccch	htttctc
DSC	cccccccccc	ccchhhhh	hhhhhhhh	acccccccc	ccccccccc	ccccccc
GOR4	cccccceeccc	cccchhhh	hhhhhhhh	acccccccee	ecccccccc	ccccccc
HNNC	cccccccccc	ccccccch	hhhhhhhh	nhcccccccc	cccccccc	ccccccc
Predator	cccccccccc	cccchhhh	hhhhhhhh	nhcccccccc	cccccccee	ecccccc
SIMPA96	cccccccccc	cccchhhh	hhhhhhhh	acccccccc		ccccccc
SOPM	cccccccccc	ccccthhh	hhhhhhhh	hcccccccc	ccccccccc	cc <b>tt</b> ccc
Consensus	cccccccccc	cccchhhh	hhhhhhhh	hccccccc		cccccc
	80	90	100	110	120	130
alpha-inv	SNPTPQEIPQE	QWTPQYRR	FAERAKQDE	EERPPETTT:	IPPSSP <u>P</u> QWK	LQPGDDP
DPM	ctcccchcccc	cccccchh	hhhhhhhh	hhhtccccc	cccctcccch	htttctc
DSC	000000000000000000000000000000000000000	ccchhhhh	hhhhhhhh	acccccccc		cccccc
GOR4	cccccceeccc	cccchhhh	hhhhhhhh	acccccccee	ecccccccc	ccccccc
HNNC	cccccccccc	ccchhhhh	hhhhhccccc	cccccccc	ccccccccc	cccccc
Predator	cccccccccc	ccchhhhh	hhhhhhhh	hccccccc	cccccccee	ecccccc
SIMPA96	000000000000000000000000000000000000000	ccchhhhh	hhhhhhhcco	cccccccee		cccccc
SOPM	000000000000000000000000000000000000000	ccccthhh	hhhhhhhh	ntccccccee		cc <b>tt</b> ccc
Consensus	000000000000000000000000000000000000000	ccchhhhh	hhhhhhhh	acccccccc		cccccc
	80	90	100	110	120	130
alphavoll	SNPTPQEIPQE	QQYRRFAE	RAKQDEEPT	VEERPPETTT:	IPPSSP <u>P</u> QWK	LQPGDDP
DPM	ctcccchcccc	chchhhhh	hhhhhhchl	hhhtccccc	cccctcccch	htttctc
DSC	cccccccccc	ccchhhhh	hhhhhhhh	acccccccc	ccccccccc	cccccc
GOR4	000000000000000000000000000000000000000	hhhhhhh	hhhhccccc	ccccccce	ecccccccc	cccccc
HNNC	cccccccccc	hhhhhhh	hhchccccc	cccccccc		ccccccc
Predator	cccccccccc	cchhhhhh	hhhhhcccco	cccccccc	cccccccee	ecccccc
SIMPA96	ccccccccch	hhhhhhh	hhccccccc	cccccccc		cccccc
SOPM	cccccccccc	hhhhhhh	hhtttccccc	cccccccc		cc <b>tt</b> ccc
Consensus	cccccccccc	hhhhhhh	hhhh?cccc	cccccccc	ccccccccc	cccccc

Abbildung 55: Ergebnis der Analyse der Vorhersage der Sekundärstruktur des DHBVpreS von AS 86-130. Zu sehen sind in dicker Schrift die entsprechenden DHBVpreS Aminosäuresequenzen des DHBVpreS Wildtyp im Vergleich zu den Mutanten mit invertiertem Bereich AS 91-104 (alph-inv) bzw. AS 88-104), die mit den links aufgelisteten Methoden DPM (Deleage et al., 1987), DSC (King et al., 1996), GOR4 (Garnier et al., 1996), HNNC (Guermeur et al., 1999), Predator (Frishman et al., 1996), SIMPA96 (Levin et al., 1986) und SOPM (Geourjon et al., 1994) analysiert wurden. Unter den Sequenzen steht die erhaltene Consensus-Sequenz, die die voraussichtliche Sekundärstruktur zusammenfasst. h,  $\alpha$ -helix; e ,extended; c ,random coil; t ,turn.

# 3.3.1 Mutation der wahrscheinlichen Protease-Schnittstelle im DHBV L und Einfluss auf die DHBV-Infektion

In der Analyse von Leberlysaten und Serumproben DHBV-positiver Enten reagierten Antikörpern, deren Epitope N-terminal vor AS 23 im DHBVpreS liegen, nicht mit dem 28 kDa großen Protein (Abb. 41 rechts). Die monoklonalen Antikörper 1H1 und 4F8, deren Epitope in der  $\alpha$ -Helix AS 89-104 liegen, detektierten die 28 kDa Proteinbande (Abb. 41 mitte und links).



Abbildung 56: Schema des L-Proteins mit den eingezeichneten Epitopen der entsprechenden Antikörper.

Dies war ein Hinweis, dass die 28 kDa Proteinbande ein N-terminal vermindertes Fragment des L-Proteins ist. Die Intensität der L-Proteinbande (36 kDa Bande) ist in der Leberprobe in den meisten beobachteten Fällen geringer als die der 28 kDa L-Bande (vgl. dazu (Yokosuka et al., 1988), (Yokosuka et al., 1985), (Bruns et al., 1998), (Tong et al., 1999).

Frühere Studien wiesen ein Auftreten dieser 28 kDa L-Bande frühestens Tag 3 nach Infektion *in vivo* nach (Yokosuka et al., 1988). Die Intensität der Bande nimmt mit der Dauer der Infektion bis Tag 6 zu. Im Gegensatz dazu blieb das Signal des L-Proteins über diesen Zeitraum annähernd gleich (Yokosuka et al., 1988). Aus diesen von Yokosuka an Hand der Analyse von Leberlysaten DHBV-infizierter Enten gemachten Beobachtungen kann man auf einen erfolgten Virusspread und fortschreitende Infektion der Leber mit Zunahme der Intensität der 28k Da L-Bande schließen, da keine Suramin-Zugabe den Virusspread verhinderte (Funk et al., 2004b).

In einem weiteren Experiment mit der Absicht der Klärung der strukturellen Anordnung der Hüllproteine in der DHBV-Partikelhülle mit Protease-Verdau wies Klingmüller eine große Anzahl möglicher Angriffspunkte für Proteasen in der DHBV-Partikelhülle nach, die aber überwiegend für Proteasen unzugänglich sind. Sie identifizierte besonders exponierte Abschnitte der DHBV-Hüllproteine im DHBVpreS-Teil des L-Proteins um AS G70 und AS T140. Nach tryptischem Verdau erhielt sie ein 28 kDa-großes Fragment, das sie nicht weiter im Vergleich zu der in Leber- und Serumproben vorkommenden Bande analysierte. Versuche zur Klärung einer Virusaktivierung durch Proteasen, wie es bereits für andere Virensysteme (HIV, (Hu et al., 1986), oder Influenzavirus, (Lazarowitz et al., 1973)) gezeigt wurde, verliefen negativ (Klingmüller, 1992). Dies deutete im Falle eines proteolytischen Aktivierungsschnittes zur Entstehung der 28 kDa-Bande nach Virusaufnahme. Versuche von Fernholz wiesen eine Bildung dieser Bande aufgrund einer Proteolyse nach (Fernholz, 1992), (Fernholz et al., 1993), und nicht durch Translation von einem internen DHBVpreS AUG. Sie konnte aber nicht die genaue Schnittstelle identifizieren.

Die biochemische Analyse der angereicherten 28 kDa Bande deutet auf eine Schnittelle nach Arginin 72.

Für die Mutante 67-L-77 (Austausch A67-GALQRAAGP-N77) wurde die Virusbildung nachgewiesen; diese Viren waren aber nicht infektiös (*in vitro*; (Lenhoff and Summers, 1994a)). Die Deletionsmutante D984 ( $\Delta$ 62 - 73) führte nach DNA Injektion in Pekingenten zu keiner Infektion der Enten (*in vivo*; (Fernholz, 1992)). In diesen Ansätzen wurde ein mehr oder weniger großer Bereich des DHBVpreS abgeändert. Die hier in dieser Arbeit betrachteten DHBV Mutanten unterschieden sich im Gegensatz dazu von dem Wildtyp nur durch den Austausch von bis zu vier Aminosäuren.

Die rekombinanten DHBVpreS Proteine RR71,72KK, RR71,72GT und 69RRVK72 waren sdCPD-C bindungskompetent (Abb. 47) und sollten keine gestörte, für die Infektion essentielle Interaktion mit der dCPD besitzen. Die Sekretion der Viren DHBV R71K, R72K, RR71,72KK, RR71,72GT und 69RRVK72 erfolgte (Abb. 48).

Die Infektiosität der untersuchten Viren änderte sich stärker durch Austausch des Arginins 72 in ein Lysin als die Änderung R71L (Abb. 49 A), unabhängig vom konservierten, ladungserhaltenden Austausch. Der konservierende Austausch beider Arginine zu Lysinen (RR71,72KK) führte ebenso wie der Austausch RR71,72GT zur drastischen Reduktion und Verlust der Infektiosität (Abb. 49 + 50). Das Verschieben der putativen Schnittstelle 69RRVK72 konnte sie nicht wiederherstellen (Abb. 49 + 50). Dies bestärkte die vermutete, dCPD-unabhängige Bedeutung der Aminosäuren im Infektionsprozess.

Im Experiment zur Bindung und Aufnahme an und in PDHs zeigte sich kein Unterschied in der Zell-Assoziation und Aufnahme der entsprechenden Viren (Abb. 51).

Die soweit erhaltenen Ergebnisse sprechen für die bedeutende Rolle einer proteolytischen Prozessierung des großen Hüllproteins nach der Aufnahme der Viren in die Zelle.

## 3.3.2 Perspektive

Ein weiterführendes Experiment wäre die adenovirale Transduktion von PDHs mit AdDHBV RR71,72KK und der Nachweis einer 28 kDa L-Bande.

Weiterhin stellt sich die Frage der Route der viralen DNA der aufgenommenen mutierten Viren in den Hepatozyten. Zur Klärung (in Anlehnung an (Rigg and Schaller, 1992)) lässt man Viren für 6 h bei 37°C in die Zellen aufnehmen, entfernt des Virusinokulums und trypsiniert die Zellen. Der Nachweis der aufgenommenen viralen DNA erfolgt mittels Real-Time PCR. Ergänzend wird eine Auftrennung in Kern- und Zytoplasmaextrakte durchgeführt zur genauen Lokalisation der viralen DNA mit der Real-Time PCR (Qiao et al., 1999). Im Falle der Lokalisation im Zytoplasma schließt sich die Fraktionierung der PDH-Komponenten und anschließende Analyse im Westernblot und Real-Time PCR an, um eventuelle Unterschiede des Weges der mutierten Viren nach Einführung der Mutationen im Vergleich mit dem Wildtyp aufzuspüren.

Die soweit erbrachten Ergebnisse zeigen die besondere Bedeutung der Arginine 71, 72 für die Infektion und die notwendige Prozessierung des großen Hüllproteins. Es bleibt aber weiter zu klären, wann dieser proteolytische Schnitt im Infektionszyklus nach Aufnahme erfolgt und ob dadurch möglicherweise eine Fusion begünstigt wird. Alle im Rahmen dieser Arbeit genutzten Standardmethoden, wie z.B. die Transformation und Kultivierung von Bakterien, die verschiedenen Gelelektrophorese-Techniken, sowie Standard-Pufferlösungen, wie z.B. 6 x SSC, 5 x Denhardts oder 1 x PBS, wurden aus "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" 2nd Edition (Sambrook, 1989) entnommen und können dort nach Bedarf nachgelesen werden. Es sind daher nur abweichende bzw. abgeänderte Techniken im Detail aufgeführt. Des Weiteren wurden Verdaus mit Restriktionsenzymen und Ligationen nach Vorschrift des Herstellers New England Biolabs (Beverly, USA) durchgeführt, die man in dem NEB-Katalog nachlesen kann.

Die Vorgehensweisen zur Reinigung von DNA aus Midi - / Maxi - Bakterienkulturen, Agarosegelen, PCR-Ansätzen oder PDH-Kulturen (bzw. anderen Zellen) wurden gemäß des Herstellers der entsprechend genutzten Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt und werden daher nicht weiter aufgeführt.

## 4 Material

## 4.1 Biologische Materialien:

## 4.1.1 Zellen

Primäre Entenhepatozyten (PDHs) HepG2 (Aden et al., 1979, Knowles et al., 1980) HepG2.18 (Breiner et al., 2001) LMH (Kawaguchi et al., 1987)

## 4.1.2 Bakterienstämme

*Escherichia coli* DH5α (Hanahan, 1983)

*Escherichia coli* M15[pREP4] (Zamenhof et al., 1972)

## 4.1.3 Antiseren

Primäre Antikörper:

α4F8	gegen DHBVpreS gerichteter monoklonaler Antikörper, der nach						
	Immunisierung von Mäusen mit dem Peptid DHBVpreS Aminosäure						
	93 – 107 erhalten wurde (beschrieben in (Urban et al., 2000)); das						
	Epitop reicht von DHBVpreS Aminosäure 101 - 105 (vgl. Abb. 21)						
α1H1	gegen DHBVpreS gerichteter monoklonaler Antikörper, der nach						
	Immunisierung von BALB/c Mäusen mit aus Entenserum gereinigten						
	DHBV und DHBVs Partikeln erhalten wurde (Pugh et al., 1995); das						
	Epitop reicht von DHBVpreS Aminosäure 101 - 109 (vgl. Abb. 21)						
αDO84	gegen DHBVpreS gerichtetes polyklonaler Antikörper aus						
	Kaninchenserum						
αMT92	gegen das DHBVpreS gerichteter polyklonaler Antikörper aus						
	Kaninchenserum, der nach Immunisierung mit dem synthetischen						
	Peptid DHBVpreS 1 - 41 (Urban et al., 2002) erhalten wurde; die						
	Haupt-Epitope liegen vor der Aminosäure 23 im DHBVpreS (s. Abb.						
	9)						
αMT93	gegen das DHBVpreS gerichteter polyklonaler Antikörper aus						
	Kaninchenserum, der nach Immunisierung mit dem synthetischen						
	Peptid DHBVpreS 2 - 41 <sup>myr</sup> (Urban and Gripon, 2002) erhalten wurde;						

Humane Hepatoma Zellinie Humane Hepatoma Zellinie Hühner Hepatoma Zellinie

F', endA1, hsdR17( $r_k m_k^+$ ), supE44, thi<sup>-1</sup>, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (laclZYA-argF)U169, deoR, ( $\Phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15) nal<sup>S</sup>, str<sup>S</sup>, rif<sup>S</sup>, thi<sup>T</sup>, lac<sup>T</sup>, ara<sup>+</sup>, gal<sup>+</sup>, mtl<sup>T</sup>, f, recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup>, lon<sup>+</sup>

	die Haupt-Epitope liegen vor der Aminosäure 23 im DHBVpreS (s. Abb. 9)
a7C12	gegen das DHBV S gerichteter monoklonaler Antikörper, der nach
	Immunisierung von BALB/c Mäusen mit aus Entenserum gereinigten
	DHBV und DHBVs Partikeln erhalten wurde (Pugh et al., 1995); das
	Epitop reicht von DHBV S Aminosäure 266 - 275 (Sunyach et al.,
	1999) bzw. K26/-L2/6 (Guo et al., 199/b)
aDO87	gegen das DHBV Core-Protein gerichteter polyklonaler Antikörper
	aus Kaninchenserum, der nach Immunisierung mit Kapsiden entstand,
	die aus DHBV-positiver Entenleber aufgereinigt worden waren
	(Bartenschlager, 1990)
α28894	gegen die C-Domäne der dCPD gerichteter polyklonaler Antikörper
	aus Kaninchenserum, der nach Immunisierung mit gereinigtem,
	rekombinantem dCPD-C-His <sub>6</sub> -Fusionsprotein erhalten wurde (siehe in
	(Breiner, 1998), dort als anti-gp180C bezeichnet)
α207	gegen die humane Carboxypeptidase D gerichteter polyklonaler
	Antikörper aus Kaninchenserum
α67	gegen das HBVpreS1 gerichteter polyklonaler Antikörper aus
	Kaninchenserum

Sekundäre Antikörper:

αKaninchen IgG aus Ziege	ein mit Peroxidase-konjugierter Antikörper der Firma
	Dianova (Hamburg, Deutschland)
αMaus IgG aus Ziege	ein mit Peroxidase-konjugierter Antikörper der Firma
	Dianova (Hamburg, Deutschland)
αKaninchen IgG aus Ziege	ein mit Alexa Fluor 488-konjugierter Antikörper der
	Firma Molecular Probes

## 4.1.4 Zellkulturmedien

## HepG2-Zellmedium:

Williams E Medium, 10 % Fetales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 120 IU / ml Penicilin-Streptomycin-Mix (P/S-Mix)

HepG2.18-Zellmedium:

DMEM high, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 120 IU / ml P/S-Mix, 400  $\mu g$  / ml G418

## LMH-Zellmedium:

DMEM high, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 240 IU / ml P/S-Mix, 1 Vol. % 100x nichtessentieller Aminosäuren, 2 mM Natrium-Pyruvat Die genannten Medien und Zusatzstoffe wurden von der Eirma GIBCO bezogen

Die genannten Medien und Zusatzstoffe wurden von der Firma GIBCO bezogen.

## PDH Kulturmedium (Maintenance Medium):

Williams E Medium, 1,5 % **D**imethylsulfoxid (DMSO), 20 mM HEPES, 1 g / l Glucose, 37  $\mu$ M Inosin, 5  $\mu$ M Glutamin, 10  $\mu$ M Hydrocortison, 66 nM Insulin, jeweils 100  $\mu$ g / ml Penicillin und Streptomycin und 10  $\mu$ g / ml Gentamycin

Das Insulin, die  $\alpha$ D-Glucose und das Inosin wurden von der Firma Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Das Hydrocortison und das Heparin wurden von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

## 4.1.5 Plasmide

**pQE8 DHBV16preS 1 – 165:** bakterielles Expressionsplasmid, das zur Expression des DHBVpreS Proteins 1-165 (Wildtyp) mit einem N-terminalen sechsfachen Histidin Tag eingesetzt wurde. Dieses Plasmid enthält die vollständige DHBVpreS Sequenz sowie die ersten vier Aminosäuren des S Proteins des DHBV16 Genoms (Urban et al., 1998). Dieses Plasmid diente sowohl als Matrize für die durch SOEing PCR generierten Mutationenbeinhaltenden Fragmente, als auch als "Vektor" für die Ligation der mutierten pQE8 DHBV16preS Expressionsplasmide.

*pCD0:* dieses Plasmid basiert auf dem Plasmid pCD10 (Bartenschlager, 1990) und wurde durch eine PCR modifiziert (Deindl, 1994). Es enthält ein Überlängen DHBV16 Genom von nt 2520 bis 2816 (nach der Nomenklatur von Mandart, (Mandart et al., 1984)) unter der Cytomegalie Virus (CMV) Promotor Kontrolle (Obert et al., 1996). Mit pCD0-DNA transient transfizierte LMH-Zellen sezernieren SVPs und DHBV in das Kulturmedium. Dieses Plasmid diente sowohl als Matrize für die durch SOEing PCR generierten Mutationen-beinhaltenden Fragmente, als auch als "Vektor" für die Konstruktion der im DHBV L-Protein mutierten pCD0 Plasmide.

SOEing Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	Nukleotidposition	Nummer
E91V top	CAG TGG ACT CCC <b>G<u>T</u>G</b> GAA GAC CAA AAA GCA C	1059 - 1089	80
E91V bottom	CTT TTT GGT CTT CC <u>A</u> CGG GAG TCC ACT GGG GCT G	1053 - 1085	83
D93Q top	CCC GAG GAA <u>C</u> A <u>G</u> CAA AAA GCA CGC GAA GCT TTT C	1068 - 1101	67
D93Q bottom	GCG TGC TTT TTG <u>CTG</u> TTC CTC GGG AGT CCA CTG	1059 - 1090	68
E98V top	CAA AAA GCA CGC <b>G<u>T</u>A</b> GCT TTT CGC CGT TAT CAA G	1080 - 1113	811
E98V bottom	ACG GCG AAA AGC T <u>A</u> C GCG TGC TTT TTG GTC TTC	1074 - 1106	82
R101P top	CGC GAA GCT TTT C <u>C</u> C CGT TAT CAA GAA GAA AGA CCA CCG	1089 - 1127	97
R101P bottom	TTC TTC ATA ACG $\mathbf{G} \underline{\mathbf{G}} \mathbf{G}$ AAA AGC TTC GCG TGC TTT TTG	1080 - 1115	98
R101L top	CGC GAA GCT TTT C <u>T</u> C CGT TAT CAA GAA GAA AGA CCA CCG	1089 - 1127	173
R101L bottom	TTC TTG ATA ACG <b>G<u>A</u>G</b> AAA AGC TTC GCG TGC TTT TTG	1080 - 1115	174
R101H top	CGC GAA GCT TTT C <u>A</u> C CGT TAT CAA GAA GAA AGA CCA CCG	1089 - 1127	194
R101H bottom	TTC TTG ATA ACG ${f G}{f T}{f G}$ AAA AGC TTC GCG TGC TTT TTG	1080 - 1115	195
R102P top	GAA GCT TTT CGC C <u>C</u> T TAT CAA GAA GAA AGA CCA CCG	1092 - 1127	99
R102P bottom	TTC TTC TTG ATA A $\underline{G}G$ GCG AAA AGC TTC GCG TGC TTT TTG	1080 - 1118	100
R102L top	GAA GCT TTT CGC C <u>T</u> T TAT CAA GAA GAA AGA CCA CCG	1092 - 1127	175
R102L bottom	TTC TTC TTG ATA <b>G<u>A</u>A</b> GCG AAA AGC TTC GCG TGC TTT TTG	1080 - 1118	176
R102H top	GAA GCT TTT CGC C <u>A</u> T TAT CAA GAA GAA AGA CCA CCG	1092 - 1127	196
R102H bottom	TTC TTC TTG ATA ATG GCG AAA AGC TTC GCG TGC TTT TTG	1080 - 1118	197
Q104P top	TTT CGC CGT TAT C <u>C</u> A GAA GAA AGA CCA CCG GAA ACC	1098 - 1133	101
Q104P bottom	TGG TCT TTC TTC T <u>G</u> G ATA ACG GCG AAA AGC TTC GCG	1089 - 1124	102
DHBVminmyr_top	C ACA TTT ATG ATG <b>G<u>C</u>G</b> CAA CAT CCA GCA AAA TC	691 - 723	135
DHBVminmyr_bottom	GC TGG ATG TTG C <u>G</u> C CAT CAT AAA TGT GAT GTT G	685 - 717	136
RR71,72KK top	GCT GGG GCG GGA <b>A<u>A</u>G A<u>A</u>A</b> GTA GGA TTA TCA AAT CCG	999 - 1034	148
RR71,72KK bottom	CGG ATT TGA TAA TCC TAC <b>T<u>T</u>T C<u>T</u>T</b> TCC CGC CCC	1002 - 1034	149
R71K top	GCT GGG GCG GGA <b>A<u>A</u>G</b> AGA GTA GGA TTA TCA AAT CCG	999 - 1034	167

## 4.1.6 Oligonukleotide

SOEing Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	Nukleotidposition	Nummer
R71K bottom	CGG ATT TGA TAA TCC TAC TCT $\mathbf{CTT}$ TCC CGC CCC	1002 - 1034	168
R72K top	GCT GGG GCG GGA AGG <b>A<u>A</u>A</b> GTA GGA TTA TCA AAT CCG	999 - 1034	169
R72K bottom	CGG ATT TGA TAA TCC TAC $\mathbf{TT}$ CCT TCC CGC CCC	1002 - 1034	170
RR71,72GT top	GCT GGG GCG GGA <u>G</u> GG A <u>C</u> A GTA GGA TTA TCA AAT CCG	999 - 1034	159
RR71,72GT bottom	CGG ATT TGA TAA TCC TAC <b>T<u>G</u>T CC<u>C</u> TCC CGC CCC</b>	1002 - 1034	160
69RRVK72 top	GCT TGG GCT GGG <u>AG</u> G <u>A</u> GA <u>GT</u> G A <u>A</u> A GTA GGA TTA TC	990 - 1027	171
69RRVK72 bottom	ATT TGA TAA TCC TAC <b>T<u>T</u>T CTT CAC C<u>CT</u> CCC AGC AGG</b>	996 - 1031	172

<b>Restriktions-Primer</b>	Nukleotidsequenz (5'-3')	Nummer
D165 <u>EcoRI</u> fwd	CAC ACA <u>GAA TTC</u> ATT AAA GAG GAG	65
XhoI rev pCD0	CGG ATG AGT <u>CTC GAG</u> GAG AGA CTG ATT TCC	85
D165 KpnI rev	GCT TTA <u>GGT ACC</u> AGA CAT TTT C	86
<u>BglII</u> fwd pCD0	CCA CCA T <u>AG ATC T</u> CC CTC GCC TAG G	84

Die Nukleotidpositionsangaben beziehen sich auf die 1984 von Mandart und Kollegen eingeführte Nomenklatur. Durch **fette Schrift** ist das geänderte Kodon und durch die <u>Unterstreichung</u> das geänderte Nukleotid in der Nukleotidsequenz der SOEing Primer hervorgehoben. Die Unterstreichung in der Nukleotidsequenz der Restriktions-Primer zeigt die Erkennungssquenz der Restriktionsenzyme. Die Nummer beschreibt die Position in der "Primer-Bank" der Arbeitsgruppe Dr. S. Urban.

Bei der Klonierung des Konstruktes pQE8 DHBV16preS D93Q wurde fälschlicherweise ein Restriktions-Primer eingesetzt, der ein Stopp-Kodon einführte, wodurch das exprimierte Protein um 5 Aminosäuren (K161-T165) verkürzt wurde.

D165 KpnI back GCT TTA GGT ACC AGA CAT TTA C

Die Unterstreichung in der Nukleotidsequenz des Primers zeigt die Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms. Das Nukleotid, das zur Einführung eines Stopp-Kodons führte, ist in fetter Schrift (A) hervorgehoben.

## 4.1.7 Adenoviren

Die zur Infektion genutzten Adenoviren GFP dCPD tl wurden freundlicherweise von S. Held bereitgestellt. Es handelte sich dabei um Adenoviren, die zuvor von K. M. Breiner kloniert und mit Ad-gp180tl bezeichnet wurden (Breiner et al., 2000).

## 4.1.8 sdCPD-C

Das eine lösliche Form der C-Domäne der dCPD (sdCPD-C) enthaltende *High Five*-Insektenzellenmedium wurde durch kurzes Abzentrifugieren (3.500 rpm für 5 Minuten bei 4°C) geklärt und bei 4°C gelagert. Dieses Material wurde freundlicherweise von S. Held zur Verfügung gestellt. Das der Infektion zu Grunde liegende rekombinante Baculovirus wurde von S. Urban kloniert und generiert (Urban et al., 2000).

## 4.1.9 Hexahistin-DHBVpreS bzw. HHBVpreS Proteine zur Epitopanalyse

Die zur Epitopanalyse eingesetzten Hexahistidin-DHBVpreS Proteine (DHBVpreS 1 - 130, DHBVpreS 23 - 130, DHBVpreS 23 - 165, DHBVpreS 23 - 115, DHBVpreS D22 - 30, DHBVpreS 38 - 115 und DHBVpreS 43 - 115), sowie das HHBVpreS Protein wurden freundlicherweise von Dr. S. Urban zur Verfügung gestellt.

## 4.1.10 Proteinmolekulargewichtsmarker

Rainbow™ gefärbte Molekulargewichts-Größenmarker von amersham pharmacia biotech:RPN 755; Low Molecular Weight Marker2.500 bis 45.000 DaltonRPN 756; High Molecular Weight Marker14.300 bis 220.000 Dalton

## 4.2 Kits:

ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) Megaprime<sup>™</sup> DNA labelling systems (*amersham pharmacia biotech*)

## 5 Methoden

## 5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

## 5.1.1. Gen SOEing-PCR (engl. gene Splicing by Overlap Extension):

Zur Einführung der gewünschten Aminosäureaustausche im DHBVpreS wurde die von Horton und Kollegen genutzte Gen SOEing-PCR basierte Technik (Horton et al., 1990) modifiziert:

Als Template dienten entweder das Plasmid pQE8 DHBV16preS 1 - 165 oder das Plasmid pCD0. In der ersten PCR wurden in zwei unabhängigen Ansätzen, die in dem einen Ansatz den Restriktions-Primer vorwärts und den SOEing-Primer rückwärts enthielten und in dem anderen den SOEing-Primer vorwärts und den Restriktions-Primer rückwärts, von dem gleichen Template je ein Fragment amplifiziert. Die so gleichzeitig erhaltenen Fragmente der unabhängig verlaufenden PCRs wurden nach einer Aufreinigung mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (QIAGEN, Minden, Deutschland) in einem 1:1 Verhältnis gemischt und als Template für die zweite PCR verwendet, die mit den Restriktions-Primern vorwärts und rückwärts angesetzt wurde. Ein einzelner PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50 µl) enthielt 2 ng Plasmid-DNA oder 2 ul Gemisch der Fragmente aus der ersten PCR (1  $\mu$ l + 1  $\mu$ l), 2 pmol der entsprechenden Primer, 0,02 U Deep Vent<sup>®</sup> Polymerase (NEB, Beverley, USA), und 250 µM dNTPs. Die Amplifikation wurde nach zweiminütiger Denaturierung bei 94°C in 25 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 30 Sekunden Annealing bei 45°C und zwei Minuten und 15 Sekunden Elongation bei 72°C sowie anschließendem Halten auf 10°C in einem Mastercycler Personal der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

## 5.1.2 Quantitative Real-Time PCR (TaqMan):

Zur Quantifizierung aufgenommener oder Zell-Assoziierter viraler DNA (unter der Annahme, dass die Messung der viralen DNA den Viren gleichgesetzt werden kann; vgl. dazu DNA-Dotblot) wurde eine DHBV-spezifische Real-Time PCR etabliert. Die virale DNA wurde mit dem QIAamp<sup>®</sup> Blood Kit (QIAGEN, Minden, Deutschland) gereinigt. Die Real-Time PCR wurde in Doppelansätzen (sofern nicht anders aufgelistet) in einem ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) durchgeführt. Ein PCR-Ansatz (Gesamtvolumen: 25 µl) setzte sich aus 4 µl gereinigter DNA (virale DNA: Template), 0.3 pmol Primer GCTTGCTGTATCTGACGGACAA (DHBV-1 for; Nukleotidposition 1557 - 1579, MWG-Biotech AG) und 0.3 pmol Primer GATCCGAGGGCAGTAGTGAAGA (DHBV-2 rev ; Nukleotidposition 1662 - 1641, MWG-Biotech AG), sowie 0,3 pmol DHBV-spezifische Sonde FAM-TGAGACCGACGCCCATTGGAGC-TAMRA (TIB-1; Nukleotidposition 1622 - 1601, TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) und 12,5 µl ABsolute<sup>™</sup> QPCR Mix (ABgene, Surrey, England) zusammen. Als Oligonukleotidprimer wurden Bereiche außerhalb des mutierten Bereichs gewählt (s. Anhang Abb. 59). Dem Aktivierungsschritt der Thermo-Start® DNA Polymerase (15 Minuten bei 95°C) folgten 40 Zyklen von Denaturierung (15 Sekunden bei 95°C) und Elongation (1 Minute bei 60°C). Als Negativ-Kontrollen dienten Wasser (= kein Template) oder gereinigte DNA von Ansätzen ohne Virusinokulum-Zusatz. Die Analyse der Messung erfolgte mit der ABI 7000 Cycler Software und die Auswertung mit Excel (Microsoft).

## 5.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde gemäß Herstellerangaben ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt:

Pro Sequenzierungsansatz kamen 4 µl Plasmid-DNA aus einer Minipräparation bzw. 200 ng DNA, 2 µl der BigDye<sup>®</sup> Terminator v.1.1 Sequenzierlösung, 2 pmol des Sequenzierprimers und 1 µl 5 x Puffer ad 10 µl Gesamtvolumen zum Einsatz. Die drei Schritte aus Denaturierung für 10 Sekunden bei 95°C, Primer–Hybridisierung für 15 Sekunden bei 55°C und DNA-Synthese für 4 Minuten bei 60°C wurden für 30 Zyklen in einem Mastercycler Personal der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wiederholt. Anschließend wurde der Ansatz nach Auffüllen auf 100 µl Volumen und Denaturierung der Probe mit 0,2 % SDS für 5 Minuten bei 98°C und Abkühlen für 5 Minuten auf RT mittels Ethanol-Fällung präzipitiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 20 µl HiDi-Formamid gelöst und an Dr. Nicole Appel der Gruppe Bartenschlager gegeben, die freundlicherweise die Probe in den ABI Prism<sup>TM</sup> 310 (Genetic Analyzer, Applied Biosystems) stellte. Die Analyse der Sequenzen wurde im Gerät automatisch durchgeführt, wobei die von einem Laser angeregten Fluoreszenzsignale von einem Detektorsystem gelesen und in Chromatogrammform dargestellt wurden. Die Auswertung des so erhaltenen ABI Chromatogramm File erfolgte entweder mit Vector NTI oder Chromas Version 1.45.

## 5.3 Antikörperreinigung

Die Reinigung der IgGs aus den Kaninchenseren MT92 und MT93 bzw. dem Hybridomüberstand 1H1 erfolgte mit einer HiTrap<sup>™</sup> Protein G HP Säule (*amersham pharmacia biotech*) laut Herstellerprotkoll (amershampharmaciabiotech, 2002).

2 ml Kaninchenserum bzw. 40ml Hybridomüberstand wurden auf eine mit 10 × Säulenvolumen mit 20 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7,0) equilibrierte HiTrap Affinitätssäule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit dem 10 × Säulenvolumen mit 20 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7,0) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,7) tropfenweise in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße, in die je 60  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 9,0) vorgelegt waren. Die so erhaltenen gereinigten Antikörper wurden mittels einer PD-10 Säule (*amersham pharmacia biotech*) in 1 × PBS dialysiert und die Konzentration der IgGs durch Messung der Absorption unter der Annahme, dass 1,35 A<sub>280nm</sub> 1 mg / ml IgG entsprechen, bei 280 nm bestimmt.

## 5.4 Hexahistidin-Fusionsproteine

Die Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an (Urban, 2004):

## 5.4.1 Expression:

*Escherichia coli* M15[pREP4] Zellen (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurden nach Transformation mit den gewünschten pQE8 DHBV16preS Expressionsplasmiden in 2 Liter Terrific Broth Medium (TB-Medium), das 100  $\mu$ g / ml Ampicillin und 25  $\mu$ g / ml Kanamycin enthielt, bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von 0,8 - 1,0 bei 37°C kultiviert. Die Genexpression wurde mit 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) induziert. Nach vier Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation (20 Minuten, 3.500 rpm, 4°C) geerntet, das erhaltene Pellet zweimal mit eisgekühltem 1 × PBS gewaschen und über Nacht bei -20°C gelagert.

## 5.4.2 Reinigung:

Das Bakterienpellet wurde in 75 ml kaltem Lysepuffer (6 M Guanidinhydrochlorid, 100 mM NaP<sub>i</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) für 15 Minuten auf Eis und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst. Das so erhaltene Lysat wurde durch Zentrifugation

(12.000 rpm, 30 min, 4°C) in einem JA14 Rotor (Beckman) geklärt. Alle folgenden Schritte wurden in der Kältekammer bei 4°C durchgeführt. Der klare Überstand wurde auf eine zuvor mit 40 ml Puffer 1 (7 M Harnstoff, 100 mM NaP<sub>i</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) equilibrierten Säule aufgetragen, die entweder mit 2 ml Nickel<sup>2+</sup>-NTA Agarose (QIAGEN) oder 2 ml TALON<sup>®</sup> Superflow (BD Biosciences) gepackt war. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Puffer 1 gespült. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit 30 ml Puffer 2 (P1, pH 6,3) gespült. Die Elution des Hexahisitidin-Fusionproteines erfolgte mit dem Auftrag von Puffer 3 (P2 + 250 mM Imidazol) in Fraktionen von 3 ml Volumen. Diese wurden anschließend nach Bestimmung des Proteingehaltes durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm in einem SDS-PAGE analysiert (Abb. 20). Die Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden vereint und durch Zentrifugation (15.000 rpm, 20 min, 4°C) in einem JA20 Rotor (Beckman) geklärt. Der so erhaltene Überstand wurde auf eine Superdex 200 Säule geladen, die an ein FPLC System (Pharmacia) angeschlossen war. Der Gelfiltrationspuffer setzte sich wie folgt zusammen: 4 M Harnstoff, 25 mM NaPi und 150 mM NaCl, pH 7,4. Die Flussrate lag bei 3 ml pro Minute. Es wurden Fraktionen von 6 ml gesammelt, die mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert wurden. Die Proteinkonzentration wurde anhand der UV-Absorption bei 280 nm über den theoretischen Extinktionskoeffizienten errechnet.

## 5.5 Biochemischer Bindungsassay

Die Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an (Breiner et al., 1998):

## 5.5.1 DHBVpreS Sepharose:

Das Koppeln der DHBVpreS Polypeptide an CH-aktivierte Sepharose<sup>®</sup> 4B (*amersham pharmacia biotech*) wurde gemäß Hersteller Angaben durchgeführt (amershampharmaciabiotech, 2002).

Die nach Gelfiltration erhaltenen DHBVpreS Hexahistidin-Fusionsproteine wurden in 12,5 mM NaP<sub>i</sub> (pH 6,3) umdialysiert und direkt vor der kovalenten Immobilisierung auf 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7,4) gebracht. 265 µg jedes DHBVpreS Polypeptids wurden kovalent an 0,5 ml geschwollene CH-aktivierte Sepharose<sup>®</sup> 4B für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Drehrad (Dynal Sampler Mixer) immobilisiert. Nach Ablauf der Kopplung wurde die dadurch erhaltene Affinitätsmatrix mit 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert, wodurch freie aktive Gruppen abgesättigt wurden. Anschließend wurde die Matrix mehrmals wechselnd mit 0,2 M NaCl, 0,1 M Na-Acetat, pH 3,8 und 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3 gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Abschließend wurde die DHBVpreS Sepharose einmal mit 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7,4) gewaschen und in 500 µl NaP<sub>i</sub> (pH 7,4) aufgenommen.

## 5.5.2 Bindungsreaktion:

535 pmol der DHBVpreS Sepharose wurden pro Ansatz für eine Stunde entweder bei 4°C, Raumtemperatur oder 37°C leicht schüttelnd mit im Baculosystem rekombinant exprimierter C-Domäne der dCPD (dCPD-C) inkubiert. Die bei 4°C gelagerten geklärten *High Five*-Kulturüberstände (vom 25.03.2003) wurden zuvor auf 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 gebracht. Nach der Inkubation wurde die Sepharose zweimal mit Bindepuffer (250 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, pH 7,4) bei der entsprechenden Inkubationstemperatur gewaschen. Spezifisch-Gebundene dCPD-C wurde durch Aufkochen der Sepharose für 10 Minuten in 50 µl Probenpuffer eluiert und im Westernblot (s. Proteinanalyse) mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ 28894 die eluierte dCPD-C detektiert.

## 5.5.2.1 DHBVpreS Talon-Beads:

40  $\mu$ l einmal mit 1 × PBS gewaschene Talon-Beads wurden nach Pelletierung mit 300  $\mu$ l DHBVpreS (bzw. 20  $\mu$ g nach Gelfiltration erhaltenen DHBVpreS Hexahistidin-Fusionsproteinen Fraktion 22) / 1 × PBS resuspendiert und über Nacht bei +4°C geschüttelt. Nach Pelletierung der Talon-Beads wurden diese mit 1 × PBS gewaschen und abschließend in 40  $\mu$ l 50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 7,4) resuspendiert.

## 5.5.2.2 Bindungsreaktion:

505 pmol der DHBVpreS Talon-Beads wurden pro Ansatz für eine Stunde bei 37°C leicht schüttelnd mit im Baculosystem rekombinant exprimierter C-Domäne der dCPD (dCPD-C) inkubiert. Die bei 4°C gelagerten geklärten *High Five*-Kulturüberstände (vom 09.02.2004) wurden zuvor auf 250 mM Tris-HCl, 750 mM NaP<sub>i</sub>, 50 mM Imidazol, pH 7,4 gebracht. Nach der Inkubation wurden die Talon-Beads zweimal mit Äquilibrierungspuffer (50 mM Di-Natriumphosphat, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, pH 7,5) bei der entsprechenden Inkubationstemperatur gewaschen. Spezifisch-gebundene dCPD-C wurde durch Aufkochen der Sepharose für 10 Minuten in 50 µl Probenpuffer eluiert und im Westernblot (s. Proteinanalyse) mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ 28894 die eluierte dCPD-C detektiert.

## 5.6 Proteinanalyse

Die Analyse proteinhaltiger Proben erfolgte nach SDS-PAGE entweder:

- durch Anfärbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie-Blau R250 (2,42 mM Coomassie Brilliant Blue R250, 47,5 % Methanol, 10 % Essigsäure) und anschließender Entfärbung mit Entfärbelösung (25 % Methanol, 10 % Essigsäure) oder

- durch einen elektrophoretischen Transfer halbtrocken in 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol und 0,0375 % SDS (Bjerrum, 1986) auf eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN<sup>®</sup>, Schleicher&Schuell) (Towbin et al., 1979, 1992) mit einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) für 30 Minuten mit 15V. Die Membran wurde anschließend in Blocklösung (3 % (w / v) Magermilchpulver (Roth AG) in TBS mit 0,05 % Tween20 (TBS-T)) für eine Stunde die Membran gesättigt. Danach wurde der Blot entweder für 2 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) mit dem Erstantikörper (Kaninchenseren 1:10.000 in Blocklösung; Hybridomüberstände 1:5 in Blocklösung) bewegt, dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) mit einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (1:10.000 in Blocklösung) inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, und die Antigen-Antikörper-Komplexe in einer chemiluminiszenten Reaktion mit selbst hergestellten ECL - Reagenzien (frisch angesetzt aus Lösung D: 8,5 µM p-Cumarinsäure, 44,74 µM Luminol, 100 mM Tris-HCl pH 9,35 und Lösung<sup>©</sup>: 0,0036 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 9,35 im Verhältnis 1 : 1 gemischt) nachgewiesen.

## 5.7 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Für die Fällung mit Trichloressigsäure wurde ein geeignetes Volumen der PDH-Kulturüberstände mit 1/10 Volumen einer eiskalten (-20°C gelagerten) TCA-Lösung kräftig gevortext und anschließend 10 bis 30 Minuten auf Eis gelagert. Nach einem Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 20 min, 4°C in einer Tischzentrifuge) und Verwerfen des Überstandes wurde das erhaltene Proteinpellet in 1/10 Volumen des Eingangsvolumens mit 2 x Proteinprobenpuffer resuspendiert und für 10 min gekocht. Bei einem Farbumschlag nach gelb wurde 1 - 2 µl einer 50 % Ammoniak-Lösung zugegeben.

## 5.8 Proteinfällung mit Antikörpern und Pansorbin (Immunkomplexpräzipitation)

Ein DHBV-positives Entenserum (5  $\mu$ l pro Ansatz entsprach in diesem Serum 5 x 10<sup>7</sup> Genomequivalenten) wurde für 3 Stunden mit jeweils 10  $\mu$ l Antikörper ( $\alpha$ MT93, IgGs Eluat 4 des  $\alpha$ MT93 in 1 x PBS,  $\alpha$ 207 und  $\alpha$ 63) bzw. ohne Antikörperzugabe in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l (1 x PBS) pro Ansatz bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Immunkomplexe mit gewaschenem Pansorbin<sup>®</sup> (10 % (w / v) Suspension von hitzeinaktivierten *Staphylococcus aureus* Zellen in PBS mit 0,1 % NaN<sub>3</sub> der Firma Calbiochem, beinhaltet Protein A) für 3,5 h bei 4°C unter leichtem Schütteln präzipitiert. Nach dreimaligem Waschen mit gekühltem 1 × PBS (3.000 rpm, 5 min, bei RT in einer Tischzentrifuge) wurden die Immunkomplexe durch Zugabe von 50  $\mu$ l 2 × Probenpuffer und kurzes Aufkochen eluiert und im Westernblot (s. Proteinanalyse) mit den monoklonalen Antikörpern  $\alpha$ 1H1 und  $\alpha$ 4F8 die präzipitierten SVP- bzw. Viren-Antikörperkomplexe detektiert.

## 5.9 Virusherstellung klonierter Genome

## Transfektion von LMH-Zellen:

Für die Herstellung von Wildtyp- oder im DHBVpreS-Mutationen-tragendes DHBV wurden LMH-Zellen (Kawaguchi et al., 1987) in 15 cm Kulturschalen mit einer Konfluenz zwischen 50 - 60 % in Anlehnung an (Condreay et al., 1990) mit der Calcium-Phosphat-Methode mit je 15 µg Plasmid-DNA transfiziert. 2-3 h vor der Transfektion wurde das Medium ausgetauscht. 14 - 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit 1 × PBS gewaschen und das Medium ausgetauscht, was am darauf folgenden Tag wiederholt wurde. Die Kulturüberstände wurden am Tag 7 nach Transfektion durch einen Zentrifugationsschritt bei 5.000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur geerntet. Die geklärten Überstände wurden entweder bei 4°C gelagert oder direkt für die Fällung der Viren eingesetzt. Die Fällung erfolgte durch die Zugabe von Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000) und HEPES mit Endkonzentrationen von 6,5 % bzw. 2,5 mM über Nacht auf Eis bei 4°C im Kühlraum. Die gefällten Viren wurden mit einer Zentrifugation bei 6.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C pelletiert und 100fach in 1 × PBS und 10 % Glycerol resuspendiert. Die resuspendierten Viren wurden bei -80°C gelagert.

## Bestimmung des Virustiters :

Die Konzentration umhüllter DNA-haltiger Viruspartikel wurde anschließend mit einem *Caesiumchlorid-Stufengradienten* bestimmt. Dazu wurden entweder 2 ml geklärte LMH-Überstände oder entsprechend verdünnte PEG-gefällte Überstände auf einen Caesiumchlorid-Stufengradienten (Dichte von unten nach oben: 1,4 g / ml; 1,3 g / ml; 1,2 g / ml CsCl je 0,5 ml und 0,8 ml Sucrose (20 % (w / w in PBSE)) geladen. Nach der Zentrifugation für 4 h bei 55.000 rpm und 20°C in einem SW 60 Rotor (Beckman) wurden je 6 Tropfen pro Fraktion (ca. 160µl) mit einem Fraktionensammler gesammelt und in einem *DNA-Dotblot* (Sprengel et al., 1984) analysiert. Durch die Auftrennung im CsCl-Stufengradienten kann man im DNA-Dotblot zwischen Core-enthaltenden Fraktionen und Viren-enthaltenden Fraktionen unterscheiden. Dazu wurden je 50 µl Fraktion pro Dot mit einer Dotblot-Apparatur (S&S Minifold I Dot-Blot System, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) auf einen Nylonfilter (Nytran-N, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) aufgetragen. Nach Trocknen des Nylonfilters für ½ h bei Raumtemperatur, wurde der Filter zweimal für 3 Minuten auf einem Whatman 3 mm Papier mit Soak I (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) denaturiert und anschließend viermal für 3 Minuten auf einem Whatman 3 mm Papier

mit Soak II (3 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,4) renaturiert. Abschließend wurde durch Backen für 1 h bei 80°C fixiert. Danach erfolgte die Hybrisierung des Filters mit einer für 10 Minuten bei 100°C aufgekochten <sup>32</sup>P-markierten DHBV-Sonde (Megaprime<sup>TM</sup> DNA labelling systems, *amersham pharmacia*) in Hybridisierungsmix (6 × SSC, 5 × Denhardts, 0,5 % SDS, 10  $\mu$ g / ml Kalbsthymus-DNA) über Nacht bei 65°C. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Sonden DNA wurde der Nylonfilter einmal für 10 Minuten bei 65°C und einmal für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Waschlösung (1× SSC mit 0,5 % SDS) gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde der Filter über Nacht exponiert. Die mit jedem Auftragspunkt assoziierte Radioaktivität wurde im Phosphorimager Personal Molecular Imager FX (BioRad) gemessen und mit dem Analyse-Programm Quantity One (BioRad) ausgewertet. Durch Vergleich der erhaltenen Messwerte mit Werten eines Plasmid Standards konnte die Menge DNA-haltiger Viren mit Excel (Microsoft) errechnet und graphisch dargestellt werden.

## 5.10 Infektion primärer Entenhepatozyten

PDHs (2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Vertiefung bei 6-Lochplatte; 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Vertiefung bei 12-Lochplatte) wurden 2 bis 5 Tage nach Plattieren über Nacht (ca. 12 h) bei 37<sup>o</sup>C mit DHBVpositivem Entenserum oder nach Transfektion von LMH-Zellen erhaltenen, im DHBVpreS-Teil Mutationen-tragenden viralen Partikeln mit der gewünschten Multiplizität von Genomequivalenten (MGE) inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und das PDH-Kulturmedium ausgetauscht. Nach 4 bzw. 7 Tagen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, kurz durch Zentrifugation geklärt und mit einer TCA-Fällung die sezernierten SVPs und Viren ankonzentriert für die Proteinanalyse mit einem Nachweis des L- oder S-Proteins im Westernblot. Die intrazelluläre virale DNA wurde aus den PDHs mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte mit 150 µl Reinstwasser. Die Analyse der Infektionsereignisse erfolgte mit einem DNA-Dotblot durch Auftropfen von je 50 µl Eluat pro Versuchsansatz. Die Durchführung erfolgt wie bereits unter der Bestimmung des Virustiters beschrieben.

#### 5.11 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen

Die zu färbenden Zellen wurden dreimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung (4 % Paraformaldehyd in 1 x PBS pH 7,4) fixiert. Die so fixierten Zellen wurden erneut mit 1 x PBS dreimal gewaschen und mit Blocklösung (3 % Rinderserumalbumin Fraktion IV (BSA, Roth AG) mit 0.1 % TritonX-100 in 1 × PBS) permeabilisiert und unspezifische Bindestellen abgesättigt. Nach erneutem Waschen (dreimal 1 × PBS) wurden die Erstantikörper in einer Verdünnung von 1 : 200 ( $\alpha$ MT92 oder  $\alpha$ DO87) in Blocklösung zugegeben und die Zellen nach einer weiteren Stunde mit 1 × PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten Ziege gegen Kaninchen-spezifischen Serum (in einer Verdünnung von 1 : 1.000, Molecular Probes) für 1 h inkubiert. Zum Anfärben der DNA in den Kernen wurde dem letzten Waschschritt mit  $1 \times PBS$  10 µg / ml Bisbenzimid H 33342 (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zugefügt. Die Fluoreszenz wurde entweder direkt in der Plattenvertiefung mit einem Leica DM IRB Inversfluoreszenzmikroskop und dem Programm Spot Advanced bei einer Vergrößerung von 100 analysiert. Oder der Ablauf war wie folgend aufgeführt: auf Glasplättchen fixierte Zellen wurden nach der Färbung der Zellen auf Objektträger gelegt, mit MobiGlow (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) eingebettet und mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica CR Mic und dem Programm Leica FW 4000 bei einer 100fachen Vergrößerung analysiert.

## 5.12 Fluoreszenzkonjugate

Die kovalente Bindung von Rhodamin an das rekombinante DHBVpreS Protein 1 - 130 (in 25 erfolgte durch eine Kopplungsreaktion mM NaP<sub>i</sub>, pН 6,88) mit 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin-N-hydroxy-succinimidester (NHS-Rhodamin, Pierce). Dazu wurden 10 µl einer frisch angesetzten Lösung des Farbstoffs in DMSO (10 µg / µl) zu 43,37 µg DHBVpreS 1 - 130 gegeben und die Reaktionslösung 2 h auf Eis bei 4°C gelassen. Das Konjugat wurde anschließend über eine PD-10 Säule (amersham pharmacia biotech) vom überschüssigen Farbstoff getrennt und portioniert. Für die in vitro Bindungsstudie mit HepG2-Zellen wurden je 5 µl Rhodamin-markiertes DHBVpreS 1 - 130 ohne Antikörper-Zusatz oder mit 2 µl aMT92 bzw. 100 µl a4F8 in 200 µl HepG2-Zellmedium für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Nach 2 h im Brutschrank wurden die Zellen kurz mit 1 × PBS gewaschen, das Medium ausgetauscht und die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop Olympus TH3 mit einer 200-fachen Vergrößerung ohne Fixierung auf beiden Fluoreszenzkanälen (roter Kanal für Rhodamin und grüner Kanal für GFP) analysiert.

## 6 Literaturverzeichnis

Aden, D. P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov and B. B. Knowles (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." <u>Nature</u> 282(5739): 615-616.

amershampharmaciabiotech (2002). Affinity Chromatography - Principles and Methods.

- amershampharmaciabiotech (2002). <u>Antibody Purification Handbook</u>, amershampharmaciabiotech.
- Antonucci, T. K. and W. J. Rutter (1989). "Hepatitis B virus (HBV) promoters are regulated by the HBV enhancer in a tissue-specific manner." J.Virol. 63(2): 579.
- Bartenschlager, R. (1990). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des P-Proteins der Hepatitis B Viren. <u>Dissertation</u>. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: 1-139.
- Bartenschlager, R., M. Junker-Niepmann and H. Schaller (1990). "The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation." J.Virol. 64(11): 5324.
- Bartenschlager, R. and H. Schaller (1988). "The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription." <u>EMBO J.</u> 7(13): 4185-4192.
- Bartz, R., U. Brinckmann, L. M. Dunster, B. Rima, V. Ter Meulen and J. Schneider-Schaulies (1996). "Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation." <u>Virology</u> 224(1): 334-337.
- Bjerrum, O. J., and Schafer-Nielsen, C. (1986). <u>Buffer Systems and transfer parameters for</u> <u>semidry electorblottin with a horizontal apparatus.</u> 5th Meeting of the International Electrophoresis Society, Deerfield Beach, Florida, VCH.
- Borst, E. M. (1997). Untersuchungen zur Interaktion des Enten-Hepatitis-B-Virus-L-Proteins mit primären Entenhepatozyten. <u>Dissertation</u>. Ulm, Universität Ulm: 1-137.
- Bosch, V., R. Bartenschlager, G. Radziwill and H. Schaller (1988). "The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand." Virology 166(2): 475-485.
- Breiner, K. M. (1998). Carboxypeptidase D (gp180): Rezeptor, Transzeptor und Signalmolekül für Vogelhepatitis B Viren. <u>Dissertation</u>. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: 1-76.
- Breiner, K. M. and H. Schaller (2000). "Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection." J. Virol. 74(5): 2203-2209.
- Breiner, K. M., S. Urban, B. Glass and H. Schaller (2001). "Envelope protein-mediated downregulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes." J. Virol. 75(1): 143-150.

- Breiner, K. M., S. Urban and H. Schaller (1998). "Carboxypeptidase D (gp180), a Golgiresident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses." <u>J.Virol.</u> **72**(10): 8098-8104.
- Bruns, M., S. Miska, S. Chassot and H. Will (1998). "Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles." J. Virol. 72(2): 1462-1468.
- Bruss, V. (1997). "A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation." J.Virol. 71(12): 9350.
- Bruss, V. and W. H. Gerlich (1988). "Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein." <u>Virology</u> **163**(2): 268-275.
- Bruss, V., J. Hagelstein, E. Gerhardt and P. R. Galle (1996a). "Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity." <u>Virology</u> **218**(2): 396.
- Bruss, V., X. Lu, R. Thomssen and W. H. Gerlich (1994a). "Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein." <u>EMBO J.</u> 13(10): 2273.
- Bruss, V. and R. Thomssen (1994b). "Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation." J.Virol. **68**(3): 1643.
- Bruss, V. and K. Vieluf (1995). "Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis." J.Virol. 69(11): 6652.
- Bulla, G. A. and A. Siddiqui (1988). "The hepatitis B virus enhancer modulates transcription of the hepatitis B virus surface antigen gene from an internal location." J.Virol. 62(4): 1437.
- Burger, R., W. H. Gerlich, L. Gürtler, M. Heiden, W. Hitzler, B. Jansen, V. Kretschmer, H. Lefèvre, J. Löwer, W.-D. Ludwig, T. Montag-Lessing, R. Neumann, A. Paessens, G. Pauli, R. Seitz, U. Schlenkrich, E. Werner and H. Willkommen (2000). "Hepatitis-B-Virus (HBV)." <u>Bundesgesundheitsbl -Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz</u> 43: 240-248.
- Calvert, J. and J. Summers (1994). "Two regions of an avian hepadnavirus RNA pregenome are required in cis for encapsidation." J.Virol. **68**(4): 2084-2090.
- Cattaneo, R., H. Will, N. Hernandez and H. Schaller (1983). "Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription." <u>Nature</u> **305**(5932): 336.
- Cattaneo, R., H. Will and H. Schaller (1984). "Hepatitis B virus transcription in the infected liver." <u>EMBO J.</u> **3**(9): 2191.
- Chang, L. J., R. C. Hirsch, D. Ganem and H. E. Varmus (1990). "Effects of insertional and point mutations on the functions of the duck hepatitis B virus polymerase." <u>J.Virol.</u> 64(11): 5553-5558.

- Chang, S. F., H. J. Netter, E. Hildt, R. Schuster, S. Schaefer, Y. C. Hsu, A. Rang and H. Will (2001). "Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame." J. Virol. 75(1): 161-170.
- Chassot, S., V. Lambert, A. Kay, C. Godinot, B. Roux, C. Trepo and L. Cova (1993b). "Fine mapping of neutralization epitopes on duck hepatitis B virus (DHBV) pre-S protein using monoclonal antibodies and overlapping peptides." <u>Virology</u> **192**(1): 217-223.
- Chassot, S., V. Lambert, A. Kay, C. Godinot, C. Trepo and L. Cova (1994). "Identification of major antigenic domains of duck hepatitis B virus pre-S protein by peptide scanning." <u>Virology</u> 200(1): 72-78.
- Cheung, R. C., W. S. Robinson, P. L. Marion and H. B. Greenberg (1989). "Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibodies against duck hepatitis B virus." J. Virol. **63**(6): 2445-2451.
- Chiang, P. W., K. S. Jeng, C. P. Hu and C. M. Chang (1992). "Characterization of a cis element required for packaging and replication of the human hepatitis B virus." <u>Virology</u> **186**(2): 701.
- Chojnacki, J., D. A. Anderson and E. V. Grgacic (2005). "A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome." J. Virol. 79(23): 14945-14955.
- Condreay, L. D., C. E. Aldrich, L. Coates, W. S. Mason and T. T. Wu (1990). "Efficient duck hepatitis B virus production by an avian liver tumor cell line." J. Virol. 64(7): 3249-3258.
- Courtois, G., S. Baumhueter and G. R. Crabtree (1988). "Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **85**(21): 7937-7941.
- Dane, D. S., C. H. Cameron and M. Briggs (1970). "Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis." Lancet 1(7649): 695-698.
- Deindl, E. (1994). Gespleißte Transkripte des Enten Hepatitis B Virus: Charakterisierung und Mutationsanalyse. <u>Dissertation</u>. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: 1-125.
- Deleage, G. and B. Roux (1987). "An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction." Protein Eng 1(4): 289-294.
- Enders, G. H., D. Ganem and H. Varmus (1985). "Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant." <u>Cell</u> **42**(1): 297-308.
- Eng, F. J., E. G. Novikova, K. Kuroki, D. Ganem and L. D. Fricker (1998). "gp180, a protein that binds duck hepatitis B virus particles, has metallocarboxypeptidase D-like enzymatic activity." J Biol Chem 273(14): 8382-8388.

- Eng, F. J., O. Varlamov and L. D. Fricker (1999). "Sequences within the cytoplasmic domain of gp180/carboxypeptidase D mediate localization to the trans-Golgi network." <u>Mol.Biol.Cell</u> **10**(1): 35.
- Feitelson, M. A., P. L. Marion and W. S. Robinson (1981). "Antigenic and structural relationships of the surface antigens of hepatitis B virus, ground squirrel hepatitis virus, and woodchuck hepatitis virus." J.Virol. **39**(2): 447.
- Fernholz, D. (1992). Studien zur Synthese und Funktion der Hüllproteine bei Hepatitis B Viren. <u>Dissertation</u>. München, Ludwig-Maximilians-Universität München: 1-236.
- Fernholz, D., G. Wildner and H. Will (1993). "Minor envelope proteins of duck hepatitis B virus are initiated at internal pre-S AUG codons but are not essential for infectivity." <u>Virology</u> 197(1): 64-73.
- Frishman, D. and P. Argos (1996). "Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence." <u>Protein Eng</u> 9(2): 133-142.
- Funk, A., H. Hohenberg, M. Mhamdi, H. Will and H. Sirma (2004b). "Spread of hepatitis B viruses in vitro requires extracellular progeny and may be codetermined by polarized egress." J. Virol. 78(8): 3977-3983.
- Funk, A., M. Mhamdi, L. Lin, H. Will and H. Sirma (2004a). "Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry." J. Virol. 78(15): 8289-8300.
- Galibert, F., E. Mandart, F. Fitoussi, P. Tiollais and P. Charnay (1979). "Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli." <u>Nature</u> **281**(5733): 646.
- Galle, P. R., J. Hagelstein, B. Kommerell, M. Volkmann, P. Schranz and H. Zentgraf (1994). "In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus." <u>Gastroenterology</u> **106**(3): 664-673.
- Ganem, D. and R. J. Schneider (2001). Hepadnaviridae: The Viruses and Their Replication. <u>Fields Virology.</u> D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffinet al. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2:** 2923-2969.
- Ganem, D. and H. E. Varmus (1987). "The molecular biology of the hepatitis B viruses." <u>Annu Rev Biochem</u> 56: 651-693.
- Garcia, J. V. and A. D. Miller (1991). "Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef." <u>Nature</u> **350**(6318): 508-511.
- Garcia, P. D., J. H. Ou, W. J. Rutter and P. Walter (1988). "Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm." J Cell Biol **106**(4): 1093-1104.

- Garnier, J., J. F. Gibrat and B. Robson (1996). "GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence." <u>Methods Enzymol</u> **266**: 540-553.
- Geourjon, C. and G. Deleage (1994). "SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction." Protein Eng 7(2): 157-164.
- Gerlich, W. H. and W. S. Robinson (1980). "Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand." <u>Cell **21**(3)</u>: 801-809.
- Grgacic, E. V., C. Kuhn and H. Schaller (2000b). "Hepadnavirus envelope topology: insertion of a loop region in the membrane and role of S in L protein translocation." J. Virol. 74(5): 2455-2458.
- Grgacic, E. V. and H. Schaller (2000a). "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(11): 5116-5122.
- Gripon, P., C. Diot, N. Theze, I. Fourel, O. Loreal, C. Brechot and C. Guguen-Guillouzo (1988). "Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide." J.Virol. 62(11): 4136.
- Gripon, P., J. Le Seyec, S. Rumin and C. Guguen-Guillouzo (1995). "Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity." <u>Virology</u> 213(2): 292.
- Guermeur, Y., C. Geourjon, P. Gallinari and G. Deleage (1999). "Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination." <u>Bioinformatics</u> **15**(5): 413-421.
- Guo, J. T. and J. C. Pugh (1997b). "Topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus suggests a mechanism for membrane translocation during particle morphogenesis." J. Virol. 71(2): 1107-1114.
- Guo, J. T., J. C. Pugh, Q. Di, W. S. Mason, H. Simmons, I. Fourel, J. M. Cullen, J. Saputelli, C. E. Aldrich, P. Schaffer, D. R. Averett, J. Pugh, A. L. Horwich, K. Furtak, J. Summers, J. W. Summers, A. Zweidler, K. Yaginuma, K. Koike, J. J. Sninsky, E. Schaeffer and J. S. Tuttleman (1997a). "Monoclonal antibodies to a 55-kilodalton protein present in duck liver inhibit infection of primary duck hepatocytes with duck hepatitis B virus" J. Virol. 71(6): 4829-4831.
- Guo, W. T., J. Wang, G. Tam, T. S. Yen and J. S. Ou (1991). "Leaky transcription termination produces larger and smaller than genome size hepatitis B virus X gene transcripts." <u>Virology</u> **181**(2): 630.
- Halpern, M. S., J. Egan, S. B. McMahon and D. L. Ewert (1985). "Duck hepatitis B virus is tropic for exocrine cells of the pancreas." <u>Virology</u> 146(1): 157.
- Halpern, M. S., J. M. England, D. T. Deery, D. J. Petcu, W. S. Mason and K. L. Molnar-Kimber (1983). "Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus." <u>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</u> 80(15): 4865.

- Halpern, M. S., J. M. England, L. Flores, J. Egan, J. Newbold and W. S. Mason (1984). "Individual cells in tissues of DHBV-infected ducks express antigens crossreactive with those on virus surface antigen particles and immature viral cores." <u>Virology</u> 137(2): 408.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol 166(4): 557-580.
- Heermann, K. H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten and W. H. Gerlich (1984). "Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence." J.Virol. 52(2): 396.
- Hild, M. (1997). Zelluläre Funktionen während der frühen und späten Schritte im Infektionszyklus des Enten Hepatitis B Virus. <u>Dissertation</u>. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: 166.
- Hirsch, R. C., J. E. Lavine, L. J. Chang, H. E. Varmus and D. Ganem (1990). "Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as wel as for reverse transcription." <u>Nature</u> **344**(6266): 552-555.
- Hirsch, R. C., D. D. Loeb, J. R. Pollack and D. Ganem (1991). "cis-acting sequences required for encapsidation of duck hepatitis B virus pregenomic RNA." J.Virol. 65(6): 3309.
- Hollinger, F. B. and T. J. Liang (2001). Hepatitis B Virus. <u>Fields Virology</u>. D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffinet al. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2: 2971-3036.
- Honigwachs, J., O. Faktor, R. Dikstein, Y. Shaul and O. Laub (1989). "Liver-specific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer." J.Virol. 63(2): 919.
- Horton, R. M., Z. L. Cai, S. N. Ho and L. R. Pease (1990). "Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction." <u>Biotechniques</u> 8(5): 528-535.
- Hosoda, K., M. Omata, K. Uchiumi, F. Imazeki, O. Yokosuka, Y. Ito, K. Okuda and M. Ohto (1990). "Extrahepatic replication of duck hepatitis B virus: more than expected." <u>Hepatology</u> **11**(1): 44.
- Hu, J. and C. Seeger (1996). "Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **93**(3): 1060.
- Hu, J., D. O. Toft and C. Seeger (1997). "Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids." <u>EMBO J.</u> **16**(1): 59-68.
- Hu, S. L., S. G. Kosowski and J. M. Dalrymple (1986). "Expression of AIDS virus envelope gene in recombinant vaccinia viruses." <u>Nature</u> **320**(6062): 537-540.

- Huang, J. and T. J. Liang (1993). "A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products." <u>Mol Cell Biol</u> **13**(12): 7476-7486.
- Ishikawa, T. and D. Ganem (1995). "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**(14): 6259-6263.
- Ishikawa, T., K. Kuroki, R. Lenhoff, J. Summers and D. Ganem (1994). "Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein to the preS protein of duck hepatitis B virus." <u>Virology</u> **202**(2): 1061-1064.
- Jilbert, A. R., J. S. Freiman, E. J. Gowans, M. Holmes, Y. E. Cossart and C. J. Burrell (1987). "Duck hepatitis B virus DNA in liver, spleen, and pancreas: analysis by in situ and Southern blot hybridization." <u>Virology</u> **158**(2): 330.
- Junker-Niepmann, M., R. Bartenschlager and H. Schaller (1990). "A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA." <u>EMBO J.</u> 9(10): 3389.
- Kann, M., B. Sodeik, A. Vlachou, W. H. Gerlich and A. Helenius (1999). "Phosphorylationdependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex." J <u>Cell Biol</u> 145(1): 45-55.
- Kann, M., R. Thomssen, H. G. Kochel and W. H. Gerlich (1993). "Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus." <u>Arch Virol Suppl</u> 8: 53-62.
- Kawaguchi, T., K. Nomura, Y. Hirayama and T. Kitagawa (1987). "Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH." <u>Cancer Res</u> **47**(16): 4460-4464.
- King, R. D. and M. J. Sternberg (1996). "Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction." <u>Protein Sci</u> **5**(11): 2298-2310.
- Klingmüller, U. (1992). Interaktion des Entenhepatitis B Virus (DHBV) mit primären Enteneleberzellen: Charakterisierung des viralen Liganden und Nachweis des zellulären Rezeptors. <u>Dissertation</u>. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: 1-108.
- Klingmüller, U. and H. Schaller (1993). "Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor." J Virol 67(12): 7414-7422.
- Knowles, B. B., C. C. Howe and D. P. Aden (1980). "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen." <u>Science</u> **209**(4455): 497-499.

- Kock, J., E. M. Borst and H. J. Schlicht (1996). "Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment." J. Virol. 70(9): 5827-5831.
- Kock, J. and H. J. Schlicht (1993). "Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity." J. Virol. 67(8): 4867-4874.
- Krantic, S., C. Gimenez and C. Rabourdin-Combe (1995). "Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation." J Gen Virol **76**(Pt 11): 2793-2800.
- Kuroki, K., R. Cheung, P. L. Marion and D. Ganem (1994). "A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles." J. Virol. 68(4): 2091-2096.
- Kuroki, K., F. Eng, T. Ishikawa, C. Turck, F. Harada and D. Ganem (1995). "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**(25): 15022-15028.
- Lam, C. W., Y. P. Yuen, W. F. Cheng, Y. W. Chan and S. F. Tong (2005). "Missense mutation Leu72Pro located on the carboxyl terminal amphipathic helix of apolipoprotein C-II causes familial chylomicronemia syndrome." <u>Clin Chim Acta</u> 7: 7.
- Lambert, V., S. Chassot, A. Kay, C. Trepo and L. Cova (1991a). "In vivo neutralization of duck hepatitis B virus by antibodies specific to the N-terminal portion of pre-S protein." <u>Virology</u> 185(1): 446-450.
- Lambert, V., D. Fernholz, R. Sprengel, I. Fourel, G. Deleage, G. Wildner, C. Peyret, C. Trepo, L. Cova and H. Will (1990). "Virus-neutralizing monoclonal antibody to a conserved epitope on the duck hepatitis B virus pre-S protein." J. Virol. 64(3): 1290-1297.
- Lazarowitz, S. G., R. W. Compans and P. W. Choppin (1973). "Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA." <u>Virology</u> **52**(1): 199-212.
- Lee, L. G., C. R. Connell and W. Bloch (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." <u>Nucleic Acids Res</u> **21**(16): 3761-3766.
- Lenburg, M. E. and N. R. Landau (1993). "Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4." J. Virol. 67(12): 7238-7245.
- Lenhoff, R. J. and J. Summers (1994a). "Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus." J. Virol. **68**(7): 4565-4571.
- Lenhoff, R. J. and J. Summers (1994b). "Construction of avian hepadnavirus variants with enhanced replication and cytopathicity in primary hepatocytes." J. Virol. **68**(9): 5706-5713.
- Levin, J. M., B. Robson and J. Garnier (1986). "An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity." <u>FEBS Lett</u> **205**(2): 303-308.
- Li, J. S., L. Cova, R. Buckland, V. Lambert, G. Deleage and C. Trepo (1989). "Duck hepatitis B virus can tolerate insertion, deletion, and partial frameshift mutation in the distal pre-S region." J Virol 63(11): 4965-4968.
- Lien, J. M., C. E. Aldrich and W. S. Mason (1986). "Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis." J.Virol. 57(1): 229.
- Lien, J. M., D. J. Petcu, C. E. Aldrich and W. S. Mason (1987). "Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation." J. Virol. 61(12): 3832-3840.
- Lu, C. C., M. Chen, J. H. Ou and T. S. Yen (1995). "Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression." <u>Virology</u> **206**(2): 1155.
- Mabit, H., C. Vons, S. Dubanchet, F. Capel, D. Franco and M. A. Petit (1996). "Primary cultured normal human hepatocytes for hepatitis B virus receptor studies." <u>J.Hepatol.</u> 24(4): 403.
- Macrae, D. R., V. Bruss and D. Ganem (1991). "Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly." <u>Virology</u> **181**(1): 359.
- Mahoney, F. J. (1999). "Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection." <u>Clin. Microbiol. Rev.</u> **12**(2): 351-366.
- Mandart, E., A. Kay and F. Galibert (1984). "Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences." J. Virol. **49**(3): 782-792.
- Mangasarian, A., V. Piguet, J. K. Wang, Y. L. Chen and D. Trono (1999). "Nef-induced CD4 and major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation are governed by distinct determinants: N-terminal alpha helix and proline repeat of Nef selectively regulate MHC-I trafficking." J. Virol. 73(3): 1964-1973.
- Marion, P. L., L. S. Oshiro, D. C. Regnery, G. H. Scullard and W. S. Robinson (1980). "A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans." <u>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</u> 77(5): 2941.
- Mason, W. S., G. Seal and J. Summers (1980). "Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus." J. Virol. 36(3): 829-836.
- McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller and M. R. Hilleman (1984). "Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast." <u>Nature</u> **307**(5947): 178-180.

- Meier, P., C. A. Scougall, H. Will, C. J. Burrell and A. R. Jilbert (2003). "A duck hepatitis B virus strain with a knockout mutation in the putative X ORF shows similar infectivity and in vivo growth characteristics to wild-type virus." <u>Virology</u> **317**(2): 291-298.
- Miller, R. H. and W. S. Robinson (1986). "Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **83**(8): 2531.
- Molnar-Kimber, K. L., J. Summers, J. M. Taylor and W. S. Mason (1983). "Protein covalently bound to minus-strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus." <u>J.</u> <u>Virol.</u> **45**(1): 165-172.
- Mushahwar, I. K., L. C. McGrath, J. Drnec and L. R. Overby (1981). "Radioimmunoassay for detection of hepatitis B e antigen and its antibody. Results of clinical evaluation." <u>Am</u> <u>J Clin Pathol</u> 76(5): 692-697.
- Mushahwar, I. K., L. R. Overby, G. Frosner, F. Deinhardt and C. M. Ling (1978). "Prevalence of hepatitis B e antigen and its antibody as detected by radioimmunoassays." J Med <u>Virol</u> 2(2): 77-87.
- Nassal, M. and A. Rieger (1996). "A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first-strand DNA synthesis." J.Virol. **70**(5): 2764.
- Nassal, M. and H. Schaller (1993). "Hepatitis B virus replication." <u>Trends Microbiol.</u> 1(6): 221.
- Nassal, M. and H. Schaller (1996). "Hepatitis B virus replication--an update." <u>J.Viral Hepat.</u> **3**(5): 217.
- Obert, S., B. Zachmann-Brand, E. Deindl, W. Tucker, R. Bartenschlager and H. Schaller (1996). "A splice hepadnavirus RNA that is essential for virus replication." <u>EMBO J</u> **15**(10): 2565-2574.
- Ostapchuk, P., P. Hearing and D. Ganem (1994). "A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis." <u>EMBO J.</u> **13**(5): 1048.
- Pasek, M., T. Goto, W. Gilbert, B. Zink, H. Schaller, P. MacKay, G. Leadbetter and K. Murray (1979). "Hepatitis B virus genes and their expression in E. coli." <u>Nature</u> 282(5739): 575.
- Patzer, E. J., G. R. Nakamura and A. Yaffe (1984). "Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells." J.Virol. **51**(2): 346.
- Persing, D. H., H. E. Varmus and D. Ganem (1987). "The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid." J. Virol. 61(5): 1672-1677.
- Pollack, J. R. and D. Ganem (1993). "An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation." J.Virol. 67(6): 3254.

Pollack, J. R. and D. Ganem (1994). "Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis." J.Virol. **68**(9): 5579.

Previsani, N. and D. Lavanchy (2002). Hepatitis B. Geneve, WHO: 1-76.

- Pugh, J. C., Q. Di, W. S. Mason and H. Simmons (1995). "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(8): 4814-4822.
- Pugh, J. C., J. J. Sninsky, J. W. Summers and E. Schaeffer (1987). "Characterization of a pre-S polypeptide on the surfaces of infectious avian hepadnavirus particles." <u>J.Virol.</u> 61(5): 1384-1390.
- Pugh, J. C. and J. W. Summers (1989). "Infection and uptake of duck hepatitis B virus by duck hepatocytes maintained in the presence of dimethyl sulfoxide." <u>Virology</u> 172(2): 564-572.
- Qiao, M., C. A. Scougall, A. Duszynski and C. J. Burrell (1999). "Kinetics of early molecular events in duck hepatitis B virus replication in primary duck hepatocytes." <u>J.Gen.Virol.</u> 80 (Pt 8): 2127.
- Radziwill, G., W. Tucker and H. Schaller (1990). "Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity." J.Virol. **64**(2): 613.
- Radziwill, G., H. Zentgraf, H. Schaller and V. Bosch (1988). "The duck hepatitis B virus DNA polymerase is tightly associated with the viral core structure and unable to switch to an exogenous template." <u>Virology</u> **163**(1): 123.
- Raney, A. K., J. L. Johnson, C. N. Palmer and A. McLachlan (1997). "Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter." J.Virol. 71(2): 1058.
- Rigg, R. J. and H. Schaller (1992). "Duck hepatitis B virus infection of hepatocytes is not dependent on low pH." J.Virol. 66(5): 2829.
- Roingeard, P. and C. Sureau (1998). "Ultrastructural analysis of hepatitis B virus in HepG2transfected cells with special emphasis on subviral filament morphogenesis." <u>Hepatology</u> **28**(4): 1128-1133.
- Rothmann, K. (1998). Kommunikation zwischen Virus und Wirtszelle: Die Phosphorylierung des großen Hüllproteins des Enten Hepatitis B Virus vermittelt intrazelluläre Signaltransduktion. <u>Dissertation</u>. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: 88.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). <u>Molecular Cloning: A Laboratory</u> <u>Manual</u>. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schaller, H. and M. Fischer (1991). "Transcriptional control of hepadnavirus gene expression." Curr Top Microbiol Immunol 168: 21-39.

- Schlicht, H. J., C. Kuhn, B. Guhr, R. J. Mattaliano and H. Schaller (1987). "Biochemical and immunological characterization of the duck hepatitis B virus envelope proteins." J <u>Virol</u> 61(7): 2280-2285.
- Schlicht, H. J., J. Salfeld and H. Schaller (1987). "The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation." J.Virol. **61**(12): 3701.
- Schneider, R., D. Fernholz, G. Wildner and H. Will (1991). "Mechanism, kinetics, and role of duck hepatitis B virus e-antigen expression in vivo." <u>Virology</u> **182**(2): 503-512.
- Schultz, U., E. Grgacic and M. Nassal (2004). "Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection." <u>Adv Virus Res</u> 63: 1-70.
- Seeger, C., D. Ganem and H. E. Varmus (1986). "Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy." <u>Science</u> 232(4749): 477.
- Siddiqui, A., S. Jameel and J. Mapoles (1986). "Transcriptional control elements of hepatitis B surface antigen gene." <u>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</u> **83**(3): 566.
- Song, L. and L. D. Fricker (1995). "Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary." J.Biol.Chem. 270(42): 25007.
- Spandau, D. F. and C. H. Lee (1988). "trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein." J.Virol. **62**(2): 427.
- Sprengel, R., E. F. Kaleta and H. Will (1988). "Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons." J.Virol. **62**(10): 3832-3839.
- Sprengel, R., C. Kuhn, C. Manso and H. Will (1984). "Cloned duck hepatitis B virus DNA is infectious in Pekin ducks." J.Virol. **52**(3): 932-937.
- Sprengel, R., C. Kuhn, H. Will and H. Schaller (1985). "Comparative sequence analysis of duck and human hepatitis B virus genomes." J.Med.Virol. 15(4): 323.
- Summers, J. and W. S. Mason (1982). "Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate." Cell **29**(2): 403-415.
- Summers, J., P. M. Smith and A. L. Horwich (1990). "Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification." J.Virol. 64(6): 2819-2824.
- Summers, J., P. M. Smith, M. J. Huang and M. S. Yu (1991). "Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus." J.Virol. 65(3): 1310-1317.
- Summers, J., J. M. Smolec and R. Snyder (1978). "A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks." <u>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</u> **75**(9): 4533.

- Sunyach, C., C. Rollier, M. Robaczewska, C. Borel, L. Barraud, A. Kay, C. Trepo, H. Will and L. Cova (1999). "Residues critical for duck hepatitis B virus neutralization are involved in host cell interaction." <u>J.Virol.</u> 73(4): 2569-2575.
- Swameye, I. (1996). Das große Hüllprotein der Hepadnaviren: ein Membranprotein mit zwei alternativen Topologien. <u>Dissertation</u>. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: 109.
- Swameye, I. and H. Schaller (1997). "Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing pre-S translocation and glycosylation." J.Virol. 71(12): 9434-9441.
- Takahashi, K., A. Machida, G. Funatsu, M. Nomura, S. Usuda, S. Aoyagi, K. Tachibana, H. Miyamoto, M. Imai, T. Nakamura, Y. Miyakawa and M. Mayumi (1983).
  "Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum." J Immunol 130(6): 2903-2907.
- Tan, F., M. Rehli, S. W. Krause and R. A. Skidgel (1997). "Sequence of human carboxypeptidase D reveals it to be a member of the regulatory carboxypeptidase family with three tandem active site domains." <u>Biochem.J.</u> **327** (**Pt 1**): 81.
- Tavis, J. E. and D. Ganem (1995). "RNA sequences controlling the initiation and transfer of duck hepatitis B virus minus-strand DNA." J.Virol. **69**(7): 4283.
- Tavis, J. E. and D. Ganem (1996). "Evidence for activation of the hepatitis B virus polymerase by binding of its RNA template." J.Virol. 70(9): 5741.
- Tavis, J. E., S. Perri and D. Ganem (1994). "Hepadnavirus reverse transcription initiates within the stem-loop of the RNA packaging signal and employs a novel strand transfer." J.Virol. 68(6): 3536.
- Tong, S., J. Li and J. R. Wands (1995). "Interaction between duck hepatitis B virus and a 170kilodalton cellular protein is mediated through a neutralizing epitope of the pre-S region and occurs during viral infection." J.Virol. 69(11): 7106-7112.
- Tong, S., J. Li and J. R. Wands (1999). "Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor." J.Virol. 73(10): 8696-8702.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **76**(9): 4350-4354.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." <u>Biotechnology</u> 24: 145-149.
- Tuttleman, J. S., C. Pourcel and J. Summers (1986b). "Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells." <u>Cell</u> **47**(3): 451-460.
- Tuttleman, J. S., J. C. Pugh and J. W. Summers (1986a). "In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus." J.Virol. **58**(1): 17-25.

- Urban, S. (2004). "Binding of duck carboxypeptidase D to duck hepatitis B virus." <u>Methods</u> <u>Mol Med</u> 95: 199-212.
- Urban, S., K. M. Breiner, F. Fehler, U. Klingmuller and H. Schaller (1998). "Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180." J.Virol. 72(10): 8089-8097.
- Urban, S. and P. Gripon (2002). "Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein." J.Virol. 76(4): 1986-1990.
- Urban, S., C. Kruse and G. Multhaup (1999). "A soluble form of the avian hepatitis B virus receptor. Biochemical characterization and functional analysis of the receptor ligand complex." J Biol Chem 274(9): 5707-5715.
- Urban, S., C. Schwarz, U. C. Marx, H. Zentgraf, H. Schaller and G. Multhaup (2000). "Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction." <u>EMBO J</u> 19(6): 1217-1227.
- Urban, S., C. Schwarz, U. C. Marx, H. Zentgraf, H. Schaller and G. Multhaup (2000). "Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction." <u>EMBO J.</u> **19**(6): 1217-1227.
- Valenzuela, P., A. Medina, W. J. Rutter, G. Ammerer and B. D. Hall (1982). "Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast." <u>Nature</u> 298(5872): 347-350.
- Van Damme, P., M. Kane and A. Meheus (1997). "Integration of hepatitis B vaccination into national immunisation programmes. Viral Hepatitis Prevention Board." <u>Bmj</u> 314(7086): 1033-1036.
- Wampler, D. E., E. D. Lehman, J. Boger, W. J. McAleer and E. M. Scolnick (1985). "Multiple chemical forms of hepatitis B surface antigen produced in yeast." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> 82(20): 6830-6834.
- Wang, G. H. and C. Seeger (1993). "Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses." J.Virol. 67(11): 6507.
- Weber, M., V. Bronsema, H. Bartos, A. Bosserhoff, R. Bartenschlager and H. Schaller (1994). "Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription." <u>J.Virol.</u> **68**(5): 2994.
- Wen, Y. M., Y. Y. Xu, W. Zhang and Y. Z. Liu (1990). "A synthetic peptide elicits antibody reactive with the native duck hepatitis B virus pre-S protein." J Gen Virol 71(Pt 10): 2467-2469.
- Will, H., W. Reiser, T. Weimer, E. Pfaff, M. Buscher, R. Sprengel, R. Cattaneo and H. Schaller (1987). "Replication strategy of human hepatitis B virus." J.Virol. **61**(3): 904.
- Wilson, J. N., D. J. Nokes and W. F. Carman (1999). "The predicted pattern of emergence of vaccine-resistant hepatitis B: a cause for concern?" <u>Vaccine</u> **17**(7-8): 973-978.

- Yaginuma, K., Y. Shirakata, M. Kobayashi and K. Koike (1987). "Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA." <u>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</u> **84**(9): 2678.
- Yokosuka, O., M. Omata and Y. Ito (1988). "Expression of pre-S1, pre-S2, and C proteins in duck hepatitis B virus infection." <u>Virology</u> **167**(1): 82.
- Yokosuka, O., M. Omata, Y. Z. Zhou, F. Imazeki and K. Okuda (1985). "Duck hepatitis B virus DNA in liver and serum of Chinese ducks: integration of viral DNA in a hepatocellular carcinoma." <u>Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A</u> **82**(15): 5180.
- Yuasa, S., R. C. Cheung, Q. Pham, W. S. Robinson and P. L. Marion (1991). "Peptide mapping of neutralizing and nonneutralizing epitopes of duck hepatitis B virus pre-S polypeptide." <u>Virology</u> 181(1): 14-21.
- Zahm, P., P. H. Hofschneider and R. Koshy (1988). "The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis." <u>Oncogene</u> **3**(2): 169-177.
- Zamenhof, P. J. and M. Villarejo (1972). "Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting -complementation of -galactosidase fragments in vivo." J Bacteriol **110**(1): 171-178.
- Zang, W. Q. and T. S. Yen (1999). "Distinct export pathway utilized by the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element." <u>Virology</u> **259**(2): 299.
- Zdunek, J., G. V. Martinez, J. Schleucher, P. O. Lycksell, Y. Yin, S. Nilsson, Y. Shen, G. Olivecrona and S. Wijmenga (2003). "Global structure and dynamics of human apolipoprotein CII in complex with micelles: evidence for increased mobility of the helix involved in the activation of lipoprotein lipase." <u>Biochemistry</u> 42(7): 1872-1889.
- Zoulim, F. and C. Seeger (1994). "Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase." J.Virol. **68**(1): 6.

# 7 Anhang

## Nukleotidsequenzen der Plasmide:

# pQE8 DHBV16preS 1 – 165 (3923 bp):

1- ctcgagaa	aat cataaaaa	aat ttatttgo	ett tgtgageg	gga taacaatt	tat aatagatt	ica attgtgag	gcg gataacaatt
tcacaca <i>gaa</i>	<i>ttc</i> attaaag	aggagaaatt	aactatgaga	ggatcgcatc	accatcacca	tcacggatcc	<b>atg</b> gggcaac
atccagcaaa	atcaatggac	gtcagacgga	tagaaggagg	agaaatactg	ttaaaccaac	ttgccggaag	gatgatccca
aaagggactt	tgacatggtc	aggcaagttt	ccaacactag	atcacgtgtt	agaccatgtg	caaacaatgg	aggagataaa
caccctccag	aatcagggag	cttggcctgc	tggggcggga	aggagagtag	gattatcaaa	tccgactcct	caagagattc
ctcagcccca	gtggactccc	gaggaagacc	aaaaagcacg	cgaagctttt	cgccgttatc	aagaagaaag	accaccggaa
accaccacca	ttcctccgtc	ttcccctcct	cagtggaagc	tacaacccgg	ggacgatcca	ctcctgggaa	atcagtctct
cctcgagact	catccgctat	accagtcaga	accagcggtg	ccagtgataa	aaactccccc	cttgaagaag	aaaatgtctg
<i>gtacc</i> taaag	cttaattagc	tgagcttgga	ctcctgttga	tagatccagt	aatgacctca	gaactccatc	tggatttgtt
cagaacgctc	ggttgccgcc	gggcgttttt	tattggtgag	aatccaagct	agcttggcga	gattttcagg	agctaaggaa
gctaaaatgg	agaaaaaaat	cactggatat	accaccgttg	atatatccca	atggcatcgt	aaagaacatt	ttgaggcatt
tcagtcagtt	gctcaatgta	cctataacca	gaccgttcag	ctggatatta	cggccttttt	aaagaccgta	aagaaaaata
agcacaagtt	ttatccggcc	tttattcaca	ttcttgcccg	cctgatgaat	gctcatccgg	aatttcgtat	ggcaatgaaa
gacggtgagc	tggtgatatg	ggatagtgtt	cacccttgtt	acaccgtttt	ccatgagcaa	actgaaacgt	tttcatcgct
ctggagtgaa	taccacgacg	atttccggca	gtttctacac	atatattcgc	aagatgtggc	gtgttacggt	gaaaacctgg
cctatttccc	taaagggttt	attgagaata	tgtttttcgt	ctcagccaat	ccctgggtga	gtttcaccag	ttttgattta
aacgtggcca	atatggacaa	cttcttcgcc	cccgttttca	ccatgggcaa	atattatacg	caaggcgaca	aggtgctgat
gccgctggcg	attcaggttc	atcatgccgt	ctgtgatggc	ttccatgtcg	gcagaatgct	taatgaatta	caacagtact
gcgatgagtg	gcagggcggg	gcgtaatttt	tttaaggcag	ttattggtgc	ccttaaacgc	ctggggtaat	gactctctag
cttgaggcat	caaataaaac	gaaaggetea	gtcgaaagac	tgggcctttc	gttttatctg	ttgtttgtcg	gtgaacgctc
tcctgagtag	gacaaatccg	ccgctctaga	gctgcctcgc	gcgtttcggt	gatgacggtg	aaaacctctg	acacatgcag
ctcccggaga	cggtcacagc	ttgtctgtaa	gcggatgccg	ggagcagaca	agecegteag	ggcgcgtcag	cgggtgttgg
cgggtgtcgg	ggcgcagcca	tgacccagtc	acgtagcgat	agcggagtgt	atactggctt	aactatgcgg	catcagagca
gallglacig	agagigcacc	alalgoggig	lgaaalaccg	cacagalgeg	Laaggagaaa	ataccgcatc	aggegelell
ccgcllcclc	geleacigae		cgglclglcg	gctgcggcga	gcgglalcag	CLCaCLCaaa	ggcgglaala
agaagagtta	cagaattagg	taastaacyca	ggaaagaaca	ragagagata	aggeeageaa	aaggeeagga	accyladada
ggeegegelg		agataggge	agtttagaga	tagaagataa	acaaaaatcy	acycicaagi	cagaggugge
gaaaccegae	aggactataa	ayataccayy	taggaggagg	tggaagette	tapatgataa	agatatagat	accordecty
agtataggat	attagataga	agatagaata	tatagaagaa	rggegettte	agaagaagaaga	cyclylaggi	taggetaget
atcatatta	gttcgetcca	ayetyyyety	acttatogoo	actageagea	ageectaata	acaggattag	cagagggagg
tatataggg	gtccaacccg	gtaayacacy	tagtageeta	actggcagca	gecaetggta	acagyattay	atatatacaa
totactaggeg	ccarttacct	tcoraaaaaa	agttggccca	tetteateeg	cceecagaagg	caccactact	agcagtagt
tttttatta	caagcagcag	attaccccca	ageeggeage	atctcaacaa	gedddedddde	tettttetae	ageggeggee
actcagtoga	accasaacto	acattaaaaa	attttaatca	trarattatc	aaaaaaaatc	ttcacctaca	toottttaaa
ttaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttoot	ctgacagtta	ccaatgetta	atcagtgagg
cacctatete	agcgatctgt	ctatttcatt	catccatago	tacctaacto	cccatcatat	agataactac	gatacgggggg
ggettaccat	ctggccccag	tactacaata	ataccocoao	acccacgete	accooctcca	gatttatcag	caataaacca
accaaccaaa	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattot	taccaaaaaa
ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tacacaacat	tattaccatt	gctacaggca	tcataatatc	acgctcgtcg
tttggtatgg	cttcattcag	ctccaattcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatccccc	atgttgtgca	aaaaaaacaat
tagctccttc	ggtcctccga	tcqttqtcaq	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	gcactgcata
attctcttac	tgtcatgcca	tccqtaaqat	acttttctat	gactggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagtgt
atgcggcgac	cgagttgctc	ttacccaaca	tcaatacqqq	ataataccqc	gccacatagc	agaactttaa	aagtgctcat
cattggaaaa	cgttcttcqq	ggcgaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccactcgtg
cacccaactq	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacaq	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa
aagggaataa	gggcgacacq	gaaatgttga	atactcatac	tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta
ttgtctcatq	agcggataca	tatttgaatg	tatttagaaa	aataaacaaa	taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaaq
tgccacctga	cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	aacctataaa	aataggcgta	tcacgaggcc	ctttcgtctt

cac-3923

Die *EcoR I-* und *Kpn I-*Erkennungssequenz sind in kursiver Schrift und mit grauer Hinterlegung hervorgehoben. Der sechsfach-Histidin-Tag ist durch orangene Unterstreichung gekennzeichnet. Das Start-Kodon für die DHBVpreS Sequenz ist mit **fetter Schrift** eingetragen. Die DHBVpreS-kodierende Sequenz wurde mit hellgelber Farbe hinterlegt.

Zur Vereinfachung wird im Folgenden nur jeweils der Ausschnitt nt 1 - 721 (laut Vector NTI) aufgelistet, in welchem die Mutationen eingeführt wurden.

# pQE8 DHBV16preS RR71,72KK:

1- ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaatt aactatgaga ggatcgcatc accatcacca tcacggatcc atggggcaac atccagcaaa atcaatggac gtcagacgga tagaaggagg agaaatactg ttaaaccaac ttgccggaag gatgatccca aaagggactt tgacatggtc aggcaagttt ccaacactag atcacgtgtt agaccatgtg caaacaatgg aggagataaa caccetccag aatcagggag ettggeetge tggggegga agaaagtag gattateaaa teegaeteet caaggagate etcageecea gtggaeteee gaggaagaee aaaaageaeg egaagettt egeegttate aagaagaaag aceaeeggaa aceaeegaee teeetgete teeeteet eagtggaage taeaaeeegg ggaegateea eteetgggaa ateagteet etcagagaet cateegetat aceagteaga aceaeeggtg eeagtgataa aaateeeeee ettgagaaga aaaatgtetg gtaeetaaag ettaattage tgagettgga eteetgtga tagateeagt aatgaeetea gaetteet ggaetteet ggegtteet tattggtgag aateeeage agettggegg gaettee ggettgeege ggeegttet tattggtgag aateeageet agettggeg gaetteeage agettggega getteeage agettgge agettggega aceaeege ggttgeegee ggeegttet tattggtgag aateeageet agettggeg gaetteeage agettggeag agetaaggaa -721 Mit roter Hinterlegung sind die geänderten Kodons hervorgehoben; in fetter Schrift die

geänderten Nukleotide.

Klon 20 wurde am 28.05.04 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 126 –614 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS RR71,72GT:

1- ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcataaag aggagaaat aactatgaga ggatcgcatc accatcacca tcacggatcc atggggcaac atcaaggaa atcaatggac gtcagacgga tagaaggagg agaaatactg ttaaaccaac ttgccggaag gatgatccca aaagggactt tgacatggtc aggcaagtt ccaacactag atcacgtgt agaccatgt caacaatgg aggagataaa caccetccag aatcaggagg cttggcctgc tggggggg gatgatcgaa tcaggtag gataacaatt ccaagagatc caagagatc aaaagcacg cgaagcttt cgccgtatc aagaagaag accaceggaa accaceggaa atcacegtga accacegg ggcgatccc categgaag accaceggaa accacegg ggcgatca ctcetgggaa accaecgg ggacgatca ctcetgggaa atcagtcg ggagatca aaaagcacg ggaggataaa accaecgg ggacgatca ctcetgggaa atcagtcet categgaac categgaag accaecgg ggacgatca ctcetgggaa aaaatgtcg gtacctaaag cttaattage tgagettgg ctcetgttga tagatccagt aagaccece cttgaagaag aaaatgtcg gataccata agaacgete ggttgccgce gggcgtttt tattggtgg aatccaagc agettggcga gatttcaag agactaaggaa -721

Mit roter Hinterlegung sind die geänderten Kodons hervorgehoben; in fetter Schrift die geänderten Nukleotide.

Klon 4 wurde am 04.08.04 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 110 –623 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

## pQE8 DHBV16preS 69RRVK:

Mit roter Hinterlegung sind die geänderten Kodons hervorgehoben; in fetter Schrift die geänderten Nukleotide.

Klon 1 wurde am 29.08.04 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 125 –520 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS E91V:

#### geänderte Nukleotid.

Klon 3 wurde am 09.06.03 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 114 –677 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS D93Q:

1- ctcgagaa	aat cataaaaa	aat ttatttgo	ett tgtgageg	gga taacaatt	at aatagatt	ca attgtgag	gcg gataacaa	itt
tcacaca <i>gaa</i>	<i>ttc</i> attaaag	aggagaaatt	aactatgaga	ggatcgcatc	accatcacca	tcacggatcc	atggggcaac	
atccagcaaa	atcaatggac	gtcagacgga	tagaaggagg	agaaatactg	ttaaaccaac	ttgccggaag	gatgatccca	
aaagggactt	tgacatggtc	aggcaagttt	ccaacactag	atcacgtgtt	agaccatgtg	caaacaatgg	aggagataaa	
caccctccag	aatcagggag	cttggc <u>ctg</u> c	tggggcggga	aggagagtag	gattatcaaa	tccgactcct	caagagattc	
ctcagcccca	gtggactccc	gaggaa <mark>cag</mark> c	aaaaagcacg	cgaagctttt	cgccgttatc	aagaagaaag	accaccggaa	
accaccacca	ttcctccgtc	ttcccctcct	cagtggaagc	tacaacccgg	ggacgatcca	ctcctgggaa	atcagtctct	
cctcgagact	catccgctat	accagtcaga	accagcggtg	ccagtgataa	aaactccccc	cttgaagaag	<u>a</u> aaatgtct <i>g</i>	
<i>gtacc</i> taaag	cttaattagc	tgagcttgga	ctcctgttga	tagatccagt	aatgacctca	gaactccatc	tggatttgtt	
cagaacgctc	ggttgccgcc	gggcgttttt	tattggtgag	aatccaagct	agcttggcga	gattttcagg	agctaaggaa	-72

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in **fetter Schrift** das geänderte Nukleotid. Es wurde fälschlicherweise ein Restriktions-Primer eingesetzt, der ein Stop-Kodon einführte, was durch <u>Unterstreichung</u> markiert wurde.

Klon 8 wurde am 23.04.03 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 3824 –962 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS E98V:

1- ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaag aggagaaatt aactatgaga ggatcgcatc accatcacca tcacggatcc atggggcaac atccaggcaa atcaatggac gtcagacgga tagaaggagg agaatactg ttaaaccaac ttgccggaa gatgatccca aaagggactt tgacatggtc aggcaagtt ccaacactag atcacgtgtt agaccatgg caacaatgg aggagataaa cacccccag aatcagggag cttggcctgc tggggcgga aggaggatgg gattatcaaa tccgactcct caagagattc ctaggccca gtggactccc gaggaagacc aaaagcacg cttggcttt cgccgtatc acactcggaa atcagtctt caccgctat accactcag accaccgg a accaccgga accaccgg gacgatca catccgctat accagtcag accaccgg gacgatca catcggaag accaccgga accaccgg gacgatca catcggcag accacggaa accaccgg ggacgatca catccgctat accagtcag accacgggt ccagtggataa aaactccccc cttgaagaag aaaatgtctg gtacctaaag cttaattagc tgagcttgga ctcctgttga tagatccagt aatgaccta gaactccatc tggattgtt cagaacgctc ggttgccgcc gggcgttttt tattggtgag aatccaagct agcttggca gatttcaag agctaggaa -721

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 2 wurde am 09.06.03 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 122 –698 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS EE91,98VV:

1- ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaat aactatgaga ggatcgcatc accatcacca tcacggatcc atggggcaac atcaggcaaa atcaatggac gtcagacgga tagaaggagg agaaatactg ttaaaccaac ttgccggaag gatgatccca aaaggggactt tgacatggtc aggcaagttt ccaacactag atcacgtgtt agaccatgtg caaacaatgg aggagataaa caccetccag aatcagggag cttggectgc tggggegga aggagagtag gattatcaaa tcegactect caagagattc ctaggecca gtggactece gtggaagacc aaaaagcacg cgtagettt cgecgttatc aagaagaaag accaceggaa accaceggaa accacegga accageggtg ccagtgataa aaatteete ctegggaat cateegetat accagtega accageggtg ccagtgataa aaatteete cteggagat cateegetat accagtega accageggtg ccagtgataa aaatteete ctegagaag cttaattage tgagettgga cteetgttga tagatecagt aggacetea gatteete tgagttgtt cagaaegete ggtggeege gggegtttt tattggtgag aatcaaget agettggeege ggeegtttt tattggtgag aatcaaget agettggeege ggeegttete tatteage accaget agettageaget accased accaget agettageage -721

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 1 wurde am 21.07.03 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 136 –594 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS R101H:

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 3 wurde am 29.08.04 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 125 –594 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS R101L:

geänderte Nukleotid.

Klon 1 wurde am 02.07.04 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 181 –570 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS R101P:

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 3 wurde am 21.07.03 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 106 –627 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS R102H:

geänderte Nukleotid.

Klon 2 wurde am 29.08.04 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 126 –599 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS R102P:

1- ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaatt aactatgaga ggatcgcatc accatcacca tcacggatcc atggggcaac atcaaggaaa atcaatggac gtcagacgga tagaaggagg agaaatactg ttaaaccaac ttgccggaag gatgatccca aaagggactt tgacatggtc aggcaagttt ccaacactag atcacgtgtt agaccatgtg caacaatgg aggagataaa caccctccag aatcagggag cttggcctgc tggggcgga aggaggatgg gattatcaaa tccgactcct caagagattc ctaagcacca gtggactcc gaggaagacc aaaagcacg cgaagttt cgc tacaccag ggacgatca ctcctgggaa accaccggaa accaccgg ggacgatca ctcctggaa accaccggaa accaccggaa accaccggaa accaccgg ggacgatca ctcctgggaa accaccggaa accaccgg ggacgatca ctcctgggaa acagtctct catcggcac catcggcag accaccgg ggacgatca aaatgtcct ggacgac acaccgg ggacgatca ctcctgggaa acagtctct catcggact catccgcta accagtcaga accaccgg ccagtgataa aaactcccc cttgaagaag aaaatgtctg gtacctaaag cttaattagc tgacttgg ctctgttga tagatccagt aatgacctca gaactccatc tggattgtt cagaacgct ggttgccgc gggcgtttt tattggtgag aatcaagct agcttggca gattatcaag agctaaggaa -721

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 7 wurde am 21.07.03 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 139 –645 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pQE8 DHBV16preS R104P:

1- ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaag aggagaaatt aactatgaga ggatcgcatc accatcacca tcacggatcc atggggcaac atcagggaaa atcaatggac gtcagacgga tagaaggagg agaaatactg ttaaaccaac ttgccggaag gatgatccca aaagggactt tgacatggtc aggcaagttt ccaacactag atcacgtgtt agaccatgtg caaacaatgg aggagataaa caccetccag aatcagggag cttggectgc tggggeggga aggagagag gattatcaaa tcegactect caaggagtt ctaggectgc tggggeggga aggagagag gatgatcca tceteggaa accacegga accaceceg gtggactece gaggaagacc aaaaagcacg cgaagettt cgccgttat catcggaaa accaecggaa accaecggaa accaecagtgt accaecee cttgagaaa acaeteete ctegggaat catcegetat accagtega accaecegg gacgatca cteetgggaa aaaatgete ggtacectaaag ctaattage tgagettgga cteetgttga tagatccagt agaceete gaacceete tggattgtt cagaacgete ggttgeegee ggeegtttt tattggtgg aatceaaget agettggeg gatttcagg agetaaggaa -721 Mit atag Unterlawyya ist dag cagadarta Kodan harverenhaban; in fotter Sahwift dag

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 8 wurde am 21.07.03 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 130 –642 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pCD0 (6291 bp):

1- gtcgacgt	tgg aacttaag	gca <u>ttacacco</u>	<u>ect ctc</u> cttco	gga gctgctto	gcc aaggtato	ctt tacgtcta	aca ttgctgttgt
cgtgtgtgac	tgtacctttg	gtatgtacca	ttgtttatga	ttcttgctta	tat <b>atg</b> gata	tcaatgcttc	tagagcctta
gccaatgtgt	atgatctacc	agatgatttc	tttccaaaaa	tagatgatct	tgttagagat	gctaaagacg	ctttagagcc
ttattggaaa	tcagattcaa	taaagaaaca	tgttttgatt	gcaactcact	ttgtggatct	cattgaagac	ttctggcaga
ctacacaggg	catgcatgaa	atagccgaat	cattaagagc	tgttatacct	cccactacta	ctcctgttcc	accgggttat
cttattcagc	acgaggaagc	tgaagagata	cctttgggag	atttatttaa	acaccaagaa	gaaaggatag	taagtttcca
acccgactat	ccgattacgg	ctagaattca	tgctcatttg	aaagctt <b>atg</b>	caaaaattaa	cgaggaatca	ctggataggg
ctaggagatt	gctttggtgg	cattacaact	gtttactgtg	gggagaagct	caagttacta	actatatttc	tcgtttgcgt
acttggttgt	caactcctga	gaaatataga	ggtagagatg	ccccgaccat	tgaagcaatc	actagaccaa	tccaggtggc
tcagggaggc	agaaaaacaa	ctacgggtac	tagaaaacct	cgtggactcg	aacctagaag	aagaaaagtt	aaaaccacag
ttgtctatgg	gagaagacgt	tcaaagtccc	gggaaaggag	agcccctaca	ccccaacgtg	cgggctcccc	tctcccacgt
agttcgagca	gccaccat <mark>ag</mark>	atctccctcg	cctaggaaat	aaattacctg	ctaggcatca	cttaggtaaa	ttgtcaggac
tatatcaaat	gaagggctgt	acttttaacc	cagaatggaa	agtaccagat	atttcggata	ctcattttaa	tttagatgta
gttaatgagt	gcccttcccg	aaattggaaa	tatttgactc	cagccaaatt	ctggcccaag	agcatttcct	actttcctgt
ccaggtaggg	gttaaaccaa	agtatcctga	caatgtgatg	caacatgaat	caatagtagg	taaatattta	accaggctct
atgaagcagg	aatcctttat	aagcggatat	ctaaacattt	ggtcacattt	aaaggtcagc	cttataattg	ggaacagcaa
caccttgtca	atcaacatca	catttatg <mark>at</mark>	<b>g</b> gggcaacat	ccagcaaaat	caatggacgt	cagacggata	gaaggaggag
aaatactgtt	aaaccaactt	gccggaagga	tgatcccaaa	agggactttg	acatggtcag	gcaagtttcc	aacactagat
cacgtgttag	accatgtgca	aacaatggag	gagataaaca	ccctccagaa	tcagggagct	tggcctgctg	gggcgggaag
gagagtagga	ttatcaaatc	cgactcctca	agagattcct	cagccccagt	ggactcccga	ggaagaccaa	aaagcacgcg
aagcttttcg	ccgttatcaa	gaagaaagac	caccggaaac	caccaccatt	cctccgtctt	cccctcctca	gtggaagcta
caacccgggg	acgatccact	cctgggaaat	cagtctctc	tcgag <mark>actca</mark>	tccgctatac	cagtcagaac	cagcggtgcc
agtgataaaa	actccccct	tgaagaagaa	aatgtctggt	accttcgggg	gaatactagc	tggcctaatc	ggattactgg
taagcttttt	cttgttgata	aaaattctag	aaatactgag	gaggctagat	tggtggtgga	tttctctcag	ttctccaaag
ggaaaaatgc	aatgcgcttt	ccaagatact	ggagcccaaa	tctctccaca	ttacgtagga	tcttgcccgt	ggggatgccc
aggatttctt	tggacctatc	tcaggctttt			tgctagtagc	agcaggcttg	ctgtatctga
cggacaacgg	gtctactatt	ttaggaaagc	tccaatgggc	gtcggtctca	gcccttttct		ttcactactg
ccctcggatc	cgaaatctct	cgtcgcttta	acgtttggac		atggatgact	tcctcctctg	ccacccaaac
gctcgtcacc	ttaacgcaat	tagccacgct	gtctgctctt	ttttacaaga	<mark>gt</mark> taggaata	agaataaact	ttgacaaaac
cacgccttct	ccggtgaatg	aaataagatt	cctcggttac	cagattgatg	aaaatttcat	gaagattgaa	gaaagcagat
ggaaagaatt	aaggactgta	atcaagaaaa	taaaagtagg	agaatggtat	gactggaaat	gtattcaaag	atttgtgggg
catttgaatt	ttgttttgcc	ttttactaaa	ggtaatattg	aaatgttaaa	accaatgtat	gctgctatta	ctaaccaagt
aaactttagc	ttctcttcat	cctataggac	tttgttatat	aaactaacaa	tgggtgtgtg	taaattaaga	ataaagccaa
agtcctctgt	acctttgcca	cgtgtagcta	cagatgctac	cccaacacat	ggcgcaatat	cccatatcac	cggcgggagc
gcagtgtttg	ctttttcaaa	ggtcagagat	atacatgttc	aggaactatt	gatgtcttgt	ttagccaaga	taatgattaa
accacgttgt	ctcttatctg	attcaacttt	tgtttgccat	aagcgttatc	agacgttacc	atggcatttt	gctatgttgg
ccaaacaatt	gctcaaaccg	atacaattgt	actttgtccc	gagcaaatat	aatcctgctg	acggcccatc	caggcacaaa
cctcctgatt	ggacggcttt	tcca <u>tacacc</u>	<u>cctctc</u> tcga	aagcaatata	tattccacat	aggetatgtg	gaacttaaga
at <u>tacacccc</u>	<u>tctc</u> cttcgg	agetgettge	caaggtatct	ttacgtctac	attgctgttg	tcgtgtgtga	ctgtaccttt
ggtatgtacc	attgtttatg	attettgett	atatatggat	atcaatgett	ctagagcett	agccaatgtg	tatgatctac
cagatgattt	ctttccaaaa	atagatgatc	ttgttagaga	tgctaaagac	gctttagagc	cttattggaa	atcagattca
ataaagaaac	atgttttgat	tgcaactcac	tttgtggatc	tcatgcatga	gctcgctagc	cctatagtga	gtcgtattaa
tagetegaat	tgatctgatc	aaattccgtg	tattctatag	tgtcacctaa	atcgtatgtg	tatgatacat	aaggttatgt
attaattgta	gccgcgttct	aacgacaata	tgtggcctcg	tgatacgcct	attttatag	gttaatgtca	tgataataat
ygtttcttag	caggtggcac	LTTTCgggga	aatgtgcgcg	yaacccctat	LCGTTTATT	LECTABATAC	aitcaaatat
glatecgete	algagacaat	aaccctgata	aatgetteaa	Laatattgaa	aaaggaagag	Latgagtatt	Caacatttcc
gtgtcgccct	tattcccttt	tttgcggcat	tttgccttcc	tgtttttgct	cacccagaaa	cgctggtgaa	agtaaaagat

gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatctcaa	cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc
cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	taaagttctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtattgac	gccgggcaag
agcaactcgg	tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	tcttacggat
ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgct	gccataacca	tgagtgataa	cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat
cggaggaccg	aaggagctaa	ccgcttttt	gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc
tgaatgaagc	cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgtagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	actattaact
ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	ggcggataaa	gttgcaggac	cacttctgcg
ctcggccctt	ccggctggct	ggtttattgc	tgataaatct	ggagccggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac
tggggccaga	tggtaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	acgaaataga
cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	aactgtcaga	ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga
tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaaatc	ccttaacgtg
agttttcgtt	ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	cttttttct	gcgcgtaatc
tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcggtgg	tttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa
ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact
ctgtagcacc	gcctacatac	ctcgctctgc	taatcctgtt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc
gggttggact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	aacggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt
ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgccac	gcttcccgaa	gggagaaagg
cggacaggta	tccggtaagc	ggcagggtcg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	ctggtatctt
tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	atgctcgtca	gggggggcgga	gcctatggaa
aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc
ctgattctgt	ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgagc	tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	gcgcagcgag
tcagtgagcg	aggaagcgga	agagcgccca	atacgcaaac	cgcctctccc	cgcgcgttgg	ccgattcatt	aatgcagctg
gcacgacagg	tttcccgact	ggaaagcggg	cagtgagcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	gctcactcat	taggcacccc
aggctttaca	ctttatgctt	ccggctcgta	tgttgtgtgg	aattgtgagc	ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat
gaccatgatt	acgccaagct	gcttgggctg	cagattattg	actagttatt	aatagtaatc	aattacgggg	tcattagttc
atagcccata	tatggagttc	cgcgttacat	aacttacggt	aaatggcccg	cctggctgac	cgcccaacga	cccccgccca
ttgacgtcaa	taatgacgta	tgttcccata	gtaacgccaa	tagggacttt	ccattgacgt	caatgggtgg	agtatttacg
gtaaactgcc	cacttggcag	tacatcaagt	gtatcatatg	ccaagtacgc	cccctattga	cgtcaatgac	ggtaaatggc
ccgcctggca	ttatgcccag	tacatgacct	tatgggactt	tcctacttgg	cagtacatct	acgtattagt	catcgctatt
accatggtga	tgcggttttg	gcagtacatc	aatgggcgtg	gatagcggtt	tgactcacgg	ggatttccaa	gtctccaccc
cattgacgtc	aatgggagtt	tgttttggta	ccaaaatcaa	cgggactttc	caaaatgtcg	taacaactcc	gccccattga
cgcaaatggg	cggtaggcgt	gtacggtggg	aggtctatat	aagcagagct	c -6291		

Die *Bgl II-* und *Xho I-*Erkennungssequenz sind in kursiver Schrift und mit grauer Hinterlegung hervorgehoben. Die **Start-Kodons** für das Core-Protein, die Polymerase und das *DHBV L* sind durch **fette Schrift** angezeigt. Der <u>Core-Leserahmen</u> ist <u>unterstrichen</u>, der Polymerase-Leserahmen mit hellblauer Farbe und der <u>preS/S-Leserahmen</u> mit <u>dunkelblauer</u> Farbe hinterlegt. In roter Schrift ist das Polyadenylierungssignal markiert. <u>DR1</u> (direct repeat 1) ist <u>doppelt-unterstrichen</u> in <u>orange</u> und <u>DR2</u> (direct repeat2) in <u>dunkelgrün</u>. Der Bereich des CMV-Promotors ist in dunkelblauer Schrift hervorgehoben.

Zur Vereinfachung wird im Folgenden nur jeweils der Ausschnitt nt 801 - 1920 (laut Vector NTI) aufgelistet, in welchem die Mutationen eingeführt wurden, sowie in fetter, kursiver Schrift das Start-Kodon des preS/S-Leserahmens.

#### *pCD0 R71K*:

#### geänderte Nukleotid.

Klon 5 wurde am 18.06.04 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 834 –1694 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 R72K*:

801- ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagteee gggaaaggag ageeeetaa eeceaacgtg eggeteeee teteecacgt agttegagea geeaeeata att eeceteg eetaggaaat aaattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae tatateaat gaagggetgt aetttaace eagaatggaa agtaeeagat atteggata eteatttaa tttagatgta gttaatgagt geeetteeg aaattggaaa tattgaete eageeaaatt etggeeeaag ageatteet aetteetgt eeaggtaggg gttaaaceaa agtateetga eaatgtgatg eaaeatgaat eaatgtagg taaatatta aceaggetet atgaageagg aateettat aageggatat etaaaeattt ggteaeatt aaaggteag etataattg ggaaeageaa eaeettgtea ateaaeatea eattatga**t** ggggeaaeat eeageaaat eaatggaegt eagaeggata gaaggaggag aaataetgtt aaaeeaatt geeggaagga tgateeeaa agggaettg acatggeag geaagttee aaeaetagat eaegtgttag aceatgtgea aaeaatggag gagataaea eeeteeaga teaggaget tggeetgetg gggegggaag gaaagtagga ttateaate egaeteetea agagatteet eageeeaga teaggaget tggeetgetg gggegggaag gaagatgga eegateeaet eeggaaga eagteetee tegagaetea teegetatae eagteagae eageggtae eageeggg aegateeaet eetgggaaat eagtetee tegagaetea teegetatee eagteagae eageggtee agtgataaaa acteeeeet tgaagaagaa aatgteegg gagteagat tggtegtgga ttteeteeag ggataetgg taagetttt ettgttgata aaaatteag aaataetgag gaggetagat tggtggtgga ttteeteeag teeteeaag -1920 Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das

geänderte Nukleotid.

Klon 2 wurde am 18.06.04, 10.03.05 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 827 –1876 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 RR71,72KK*:

**801-** ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagteee gggaaaggag ageeeetaa ecceaacgtg eggeteeee teteecacgt agttegagea geeaeeatag atcteeteg eetaggaaat aaattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae tatateaat gaagggetgt actttaaee eagaatggaa agtaeeagat atteggata eteatttaa ttagatgta gttaatgagt geeetteeeg aaattggaaa tattgaete eageeaaatt etggeeeaag ageatteet aetteetg eeaggtaggg gttaaaceaa agtateetga eaatgtgatg eaaeatggat eaatagtagg taaatatta acetggetet atgaageagg aateettat aageggatat etaaeeatt ggteaeatt aaaggteage ettataatg ggaaeageaa eaeettgee ateaeeate eattatg**at** gggeeaeeat eeageaaat eaatggaegt eageeggata gaaggaggag aaataetgtt aaaeeaatt geeggaagga tgateeeaa agggaettg aeatggeeg geaagttee aaeeetagat eaegtgttag aceatggee aaeatggag gagataaee eeeteeaa agggaett tgeeetgeg gggegga gaaggtttee gegtateaa gaagaagae eaeeeggaae eeeeeaa eeeeegggagaee gagagaeeea aaageeegg aagetttee eegtateaa gaagaaagae eaeeeggaaee eeeeeeat eeeeeee eeeeee eeeee agtgataaa aeteeeet gaagaaa aatgteegt aeetteggg gaateetae eagteagae eageggtee agtgataaa acteeeeet gaagaagaa aatgteegt aeetteggg gaateetae eagteagaa eagegteee agtgataaa acteeeet tgaagaagaa aatgteegt aeetteggg gaateetae tegeetaae eggetgee aageetttt ettgttgata aaaatetag aaatetga gaggedaat teggegg gaateetage tggeeteate ggataegg taagetttt ettgttgata aaaatteag aatgteegt aeetteggg gaateetage tggeetaate ggateegg taagetttt ettgttgata aaatteeg aatategg gagedaat teggedga tteeteeag tteeteeag -1920

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 1 wurde am 18.06.04, 10.03.05 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 849 –1878 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 RR71,72GT*:

801- ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagtee gggaaaggag ageeetaa eeceaacgtg eggeteeee teteecacgt agttegagea geeaceatag ateteetee eggaaatgaa aattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae taataeaat gaagggetgt aetttaace eagaatggaa agtaeeagat atteeggaa etatteaa ttagatgta gttaatgagt geeetteeg aaattggaaa tattgaete eageeaaatt etggeeeaag ageatteet aetteetgt eeaggaaggag gttaaaceaa agtaeetga eaatgtggt eaaeatgaat eaatgtagg taaatatta aceaggeet ataeeaatt ggageegg aateettat aageggaat etaaaeatt ggteaeatt aaaggteage etataattg ggaaeagea eaeetgtea ateeaeate eattatgat gegeeaeat eeageeaaat eaatggeeg eaaggata gaaggagga aaataetgtt aaaceaaet geeggaagga tgateeeaa agggaettg aeatggteag geaagttee aaeeatgga eaegtgtag aceatgtgea aeaatggg gagataaee eeeteeaga teaggaget tggeetgetg gggeggagg macagtagga ttateaaate eggeteete aggagtee eeeteeggagee eeeteeggagee aagetttee eegtateaa gaagaaagae eaeeggaae eeeeeegg ggaeteeega ggaagaeeaa aageaegeg aagetttee eegtateaa gaagaaagae eageteete tegggaetea teegetatae eagteagae eageggge aagetttee eegtateaa gaagaaagae eaeeggaaee eaeeeeetee eeetee eeeeee eeeeee agtgataaaa aeteeeeet tgaagaagaa aatgteeg aeeteeggg gaataetae eagteagae teggegtaga ttgeeteeag ggataeee agtgataaaa aeteeeeet tgaagaagaa aatgteeg aeeteeggg gaataetae eagteegaae eageggtee aagetttte ettgttgata aaaattetag aaataetgag gaggetagat tggtggtgga ttteeteeag tteeeaaag -1920 Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das

geänderte Nukleotid.

Klon 3 wurde am 28.05.04, 10.03.05 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 849 –1875 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 69RRVK72:*

**801-** ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagteec gggaaaggag ageeeetaa eeeaacgtg egggeteeee teteeeacgt agttegagea geeaceat<mark>ag atet</mark>eeetaggaaat aaattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae tatateaaat gaagggetgt aettttaaee eagaatggaa agtaeeagat atteeggata eteatttaa tttagatgta gttaatgagt geeetteeeg aaattggaaa tatttgaete eageeaaatt etggeeeaag ageattteet aettteetgt

aaatactgtt	aaaccaactt	gccggaagga	tgatcccaaa	agggactttg	acatggtcag	gcaagtttcc	aacactagat	
cacgtgttag	accatgtgca	aacaatggag	gagataaaca	ccctccagaa	tcagggagct	tggcctgctg	gg <mark>aggagagt</mark>	
ga <b>a</b> agtagga	ttatcaaatc	cgactcctca	agagattcct	cagccccagt	ggactcccga	ggaagaccaa	aaagcacgcg	
aagcttttcg	ccgttatcaa	gaagaaagac	caccggaaac	caccaccatt	cctccgtctt	cccctcctca	gtggaagcta	
caacccgggg	acgatccact	cctgggaaat	cagtctctcc	tcgagactca	tccgctatac	cagtcagaac	cagcggtgcc	
agtgataaaa	actccccct	tgaagaagaa	aatgtctggt	accttcgggg	gaatactagc	tggcctaatc	ggattactgg	
taagcttttt	cttgttgata	aaaattctag	aaatactgag	gaggctagat	tggtggtgga	tttctctcag	ttctccaaag -	1920
Mit rotor	Hintonlow	int da	a a a ä m d a mt	Vadan 1		have in fa	tton Cabuif	+ doo

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 2 wurde am 18.06.04 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 868 –1693 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 E91V*:

801- ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagteee gggaaaggag ageeeetaa eeceaacgtg eggeteeee teteeeacgt agttegagea geeaeeatag ateteeetag eetaggaaat aaattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae tatateaat gaagggetgt aetttaace eagaatggaa agtaeeagat atteeggata eteatttaa tttagatgta gttaatgagt geeetteeeg aaattggaaa tatttgaete eageeaaatt etggeeeaag ageatteet aetteetgt eeaggtaggg gttaaaeeaa agtateetga eaatgtgatg eaaeatgaat eaatggagg taaatatta aeeaggetet atgaageagg aateettat aageggatat etaaaeatt ggteaeatt aaaggteage ettataattg ggaaeageaa eaeetgtea ateaaeate geeggaagga tgateeeaaa egggaettg eadaggeeg gaaggteeggaa gaaggagga aaataetgtt aaaeeaatt geeggaagga tgateeeaaa agggaettg aeeaggeag geaagttee aaeeaetga eaegtgttag aceatgtgea aaeatgggg gagataaee eeeeeag ggaeteeent ggaagaeea aaageeegg aagetttee eggtateaa gagaaagae eaeeggaae eaeeeeag ggaeteeent ggaagaeea aaageeegg aagetttee eeggaaat eegeeeaa eeeeeet eegagaeee teegeette eeeeetee aggagtagga ttateaate egaeteetea aggatteet eageeeeagt ggeeteeent ggaagaeea aaageeegg aagetttee eegtateaa gaagaagae eaeeggaae eaeeeeete eegeeete eegeetee eegeetee aggagtaaaa aeteeeete tgaagaagaa eatgteegg gaagteee teegeetae eegeetae eegeetee eegeetee agtgataaaa aeteeeete tgaagaagaa aatgteegg gagetagat teggeggaa tteeteetee ggataeegg aagetttte ettgttgata aaaattetag aaateetga gaggetagat tggtggtgga ttteeteeag teteeeaag -1920 Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das

geänderte Nukleotid.

Klon 4 wurde am 09.06.03 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 809 –1694 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 D93Q*:

geänderte Nukleotid.

Klon 3 wurde am 03.12.03 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 840 –1694 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 E98V*:

**801**-ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagtccc gggaaaggag agcccctaca ccccaacgtg cgggctcccc tctcccacgt agttcgagca gccaccatag atctccctcg cctaggaaat aaattacctg ctaggcatca cttaggtaaa ttgtcaggac tatatcaaat gaagggctgt acttttaacc cagaatggaa agtaccagat atttcggata ctcatttaa tttagatgta gttaatgagt gcccttcccg aaattggaaa tattgacte cagccaaatt ctggcccaag agcattcct actttcctgt ccaggtaggg gttaaaccaa agtacctga caatgtgatg caacatgaat caatagtagg taaatattta accaggctct atgagcagg aatccttat aagcggatat ctaaacattt ggtcacatt aaggtcagc cttataattg ggaacagcaa caccttgtca atcaacatc gcggaagga tgatcccaa agggacttg agaggagg aaatactgt aaacaatt gcggaagga tgatcccaa agggacttg caagggag gcaagttcc aacttaggaga aaatactgt aaacaatt gcggaagga tgatcccaa agggacttg acatggtcag gcaagttcc aacatgagt

cacgtgttag accatgtgca aacaatggag gagataaaca ccctccagaa tcagggagct tggcctgctg gggcgggaag gagagtagga ttatcaaatc cgactcctca agagattcct cagccccagt ggactcccga ggaagaccaa aaagcacgc ggcttttcg ccgttatcaa gaagaaagac caccggaaac caccaccatt cctccgtctt cccctccta gtggaagcta caacccgggg acgatccact cctgggaaat cagtctctc tcgagactca tccgctatac cagtcagaac caceggtgcc agtgataaaa actcccccct tgaagaagaa aatgtctggt accttcggg gaatactagc tggcctaatc ggattactgg taagctttt cttgttgata aaaattctag aaatactgag gaggctagat tggtggtgga tttctctcag ttctccaaag -1920 Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid. Klon 3 wurde am 18.06.04 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 838 -1700 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch. Eine Mutation bei nt 1225 GGC zu CGA, führt im P-ORF zu R-> P.

#### *pCD0 R101L*:

801- ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagtee gggaaaggag ageeetaa eeceaacgtg eggeteeee teteecacgt agttegagea geeaceatag ateteetee eggaaaggaa aattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae taataeaat gaagggetg aetttaaee eagaatggaa agtaeeagat atteggata eteatttaa tttagatgta gttaatgagt geeetteeg aaattggaaa tattgaete eageeaaatt etggeeeaag ageatteet aetteetgt eeaggtaggg gttaaaceaa agtaeetga eaatgtgat eaaeatgaat eaatgtagg taaatatta aceaggetet atgaageagg aateettat aageggatat etaaaeattt ggteaeatt aaaggtege ettataattg ggaaeageaa caeetgtea ateaaeate eattatgat geggeaeat eeateggae eaatgtgag geaagttee aaeaetgat eaagtgtgag aceatgtgea acaatggag gagtaeaea eeeeeaa eaggaegt tggeetgetg ggegggaag aaateetgtt aaaeeaatt geeggaagga tgateeeaa agggeettg aeatggteag geaagttee aaeeetagat eaegtgttag aceatgtgea aaeaatggag gagataeae eeeeeaa eaeggaget tggeetgetg ggegggaag gagagtagga ttateaaate egaeteete agagateet eageeeaa teeggaaget tggeetgetg ggegggaag aagetttet gegtateaa gaagaagae eaeeggaae eaeeeeaa eeeeeaa eeeee eagegggee agtgataaa aeteeeeet tgaagaagaa aatgtegg aeetteegg gaataetae eagegggee agtgataaa aeteeeeet tgaagaagaa aatgtegg aeetteeggg gaataetae teggetaate ggetaate ggataetgg taagetttt ettgttgata aaaatteag aaateegg gaggetagat tggtgggga ttteteeag teteeaag -1920 Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 1 wurde am 27.06.04 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 849 –1694 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 R101H*:

801- ttgtct	tatgg gagaag	gacgt_tcaaag	ftccc gggaaa	aggag agccco	ctaca ccccaa	acgtg cgggct	cccc tctccca	cgt
agttcgagca	gccaccatag	atc( <mark>t</mark> )cccto	g cctaggaaa	at aaattacct	g ctaggcato	ca cttaggtaa	a ttgtcaggac	
tatatcaaat	gaagggctgt	acttttaacc	cagaatggaa	agtaccagat	atttcggata	ctcattttaa	tttagatgta	
gttaatgagt	gcccttcccg	aaattggaaa	tatttgactc	cagccaaatt	ctggcccaag	agcatttcct	actttcctgt	
ccaggtaggg	gttaaaccaa	agtatcctga	caatgtgatg	caacatgaat	caatagtagg	taaatattta	accaggctct	
atgaagcagg	aatcctttat	aagcggatat	ctaaacattt	ggtcacattt	aaaggtcagc	cttataattg	ggaacagcaa	
caccttgtca	atcaacatca	catttatg <b>at</b>	<b>g</b> gggcaacat	ccagcaaaat	caatggacgt	cagacggata	gaaggaggag	
aaatactgtt	aaaccaactt	gccggaagga	tgatcccaaa	agggactttg	acatggtcag	gcaagtttcc	aacactagat	
cacgtgttag	accatgtgca	aacaatggag	gagataaaca	ccctccagaa	tcagggagct	tggcctgctg	gggcgggaag	
gagagtag <u>ga</u>	ttatcaaatc	cgactcctca	agagattcct	cagccccagt	ggactcccga	ggaagaccaa	aaagcacgcg	
aagctttt <mark>ct</mark>	<mark>c</mark> cgttatcaa	gaagaaagac	caccggaaac	caccaccatt	cctccgtctt	cccctcctca	gtggaagcta	
caacccgggg	acgatccact	cctgggaaat	cagtctctcc	tcgagactca	tccgctatac	cagtcagaac	cagcggtgcc	
agtgataaaa	actccccct	tgaagaagaa	aatgtctggt	accttcgggg	gaatactagc	tggcctaatc	ggattactgg	
taagcttttt	cttgttgata	aaaattctag	aaatactgag	gaggctagat	tggtggtgga	tttctctcag	ttctccaaag -	1920
Mit roter	Hinterlegu	<mark>ing</mark> ist da	s geändert	e Kodon I	hervorgeho	ben; in fe	tter Schrift	t das

geänderte Nukleotid.

Klon 2 wurde am 29.08.04 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 836 –1701 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch. An der Stelle nt 904 fehlte ein T (in grün und in Klammern hervorgehoben), was zum Verlust der *BglII*-Schnittstelle führte. Dies wurde mit einem *BglII*-Restriktionsverdau zusätzlich überprüft! Dadurch kam es zur Zerstörung der P-Leserahmens und Änderung des C-Leserahmens, wohingegen der S-Leserahmen uverändert blieb.

#### *pCD0 R101P*:

**801-** ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagteec gggaaaggag ageeeetaa eeecaacgtg egggeteeee teteecacgt agttegagea geeaeeatag ateteeeteg eetaggaaat aaattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae tatateaaat gaagggetgt aettttaaee eagaatggaa agtaeeagat attteggata eteattttaa tttagatgta gttaatgagt geeetteeeg aaattggaaa tatttgaete eageeaaatt etggeeeaag ageattteet aettteetgt eeaggtaggg gttaaaeeaa agtateetga eaatgtgatg eaaeatgaat eaatagtagg taaatattta aceaggetet atgaageagg aateetttat aageggatat etaaaeattt ggteaeattt aaaggteage ettataattg ggaacageaa caccttgtca atcaacatca catttatg**at g**gggcaacat ccagcaaaat caatggacgt cagacggata gaaggaggag aaatactgtt aaaccaactt gccggaagga tgatccaaa agggactttg acatggtcag gcaagtttcc aacactagat cacgtgttag accatgtgca aacaatggag gagataaaca ccctccagaa tcagggagct tggcctgctg gggcgggaag gagagtagga ttatcaaate cgactecta agagatteet cageeccagt ggacteecga ggaagaceaa aaageaegeg aagetttt**ce c**cgttatcaa gaagaaagae caceggaaae cacecacatt ectecgtett cceetecte ggggaageta cacegggg acgatecaet ectgggaaat cagtetee tegagactea teegetate cagtegaae cageggtgee agtgataaaa acteeceet tgaagaagaa aatgtetgg acetteggg gaatactage tggcetaate ggattaetgg taagetttt ettgttgata aaaattetag aatactgag gaggetagat tggtggtgga ttteetecag ttetecaaag -1920 Mit motor Unterlagung ist dag gagadarta Kodan hervorgebeben: in fotter Sabrift dag

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 1 wurde am 03.12.03 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 833 –1676 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 R102L*:

801- ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagtee gggaaaggag ageeetaa eeceaacgtg eggeteeee teteecacgt agttegagea geeaceatag ateteetee eggaaaggaa aattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae taataeaat gaagggetgt aetttaace eagaatggaa agtaeeagat atteeggaa etattaa ttagatgta gttaatgagt geeetteeg aaattggaaa tattgaete eageeaaatt etggeeeaag ageatt() et aettteetgt eeaggaaggag gttaaaceaa agtaeetga eaatgggat eaaeatgaat eaatgtagg taaatatta aceaggeet ataeeaat aageegga aateettat aageeggaat etaaaeatt ggteaeatt aaaggteage ettataattg ggaaeagea eaeetgtea ateeaeate eattatga**t** gggeeaeat eeageeaaat eaatggaegt eagaeggata gaaggagga aaataetgtt aaaceaaett geeggaagga tgateeeaaa agggaettg aeetggeeggaeggea eageggata gaaggagga gaggtagga ttateaaate egeeteea aggatteet eageeeaga tegggaget tggeetgeeg ggeegggaag aagetttee eageeeaga eeeeeaggaee eaeeggaae eaeeeggaae eeeeegg gagagtagga ttateaaate egeeteea aggatteet eeggeaeae teeggaaee aaageeegg aagetttee eggtetaa aeeeggaaae eaeeegaae eeeeeeegg ggaagaeeea aageeegg aagetttee eggteaaat eegeteete eeggaaee eaeeeggaaee eaeeggaeee eeeeee eeeee eeeee eeeee agtgataaaa aeteeeeet tgaagaagaa eateeteg teggeggg gaataetae eagteggee agtgataaaa aeteeeeet tgaagaagaa aatgteegt aeetteeggg gaataetae eagtegaae eageggtee agtgataaaa aeteeeeet tgaagaagaa aatgteegg agegetagat tggtggtgga tteeteeag teteeeaag -1920 Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das

geänderte Nukleotid.

Klon 10 wurde am 02.07.04 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 836 –1692 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch. An der Stelle nt 1107 fehlte ein T (in grün und in Klammern hervorgehoben), was zur Änderung des P-Leserahmens und dadurch zur Verkürzung der Polymerase führte, wohingegen weder der C-Leserahmen, noch der S-Leserahmen geändert wurde.

#### *pCD0 R102H*:

801- ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagtccc gggaaaggag agcccctaca ccccaacgtg cgggctcccc tctcccacgt agttcgagca gccaccatag atctccctcg cctaggaaat aaattacctg ctaggcatca cttaggtaaa ttgtcaggac tatatcaaat gaagggctgt acttttaacc cagaatggaa agtaccagat atttcggata ctcattttaa tttagatgta gttaatgagt gcccttcccg aaattggaaa tatttgactc cagccaaatt ctggcccaag agcatttcct actttcctgt ccaggtaggg gttaaaccaa agtatcctga caatgtgatg caacatgaat caatagtagg taaatattta accaggctct atgaagcagg aatcctttat aagcggatat ctaaacattt ggtcacattt aaaggtcagc cttataattg ggaacagcaa caccttgtca atcaacatca catttatg ${\it at}$   ${\it g}$ gggcaacat ccagcaaaat caatggacgt cagacggata gaaggaggag aaatactgtt aaaccaactt gccggaagga tgatcccaaa agggactttg acatggtcag gcaagtttcc aacactagat cacgtgttag accatgtgca aacaatggag gagataaaca ccctccagaa tcagggagct tggcctgctg gggcgggaag gagagtagga t<u>tat</u>caaatc cgactcctca agagattcct cagccccagt ggactcccga ggaagaccaa aaagcacgcg aagetttteg e<mark>rat</mark>tateaa gaagaaagae eaceggaaae eaceaceatt eeteegtett eeeteetea gtggaageta caacccgggg acgatccact cctgggaaat cagtctctcc tcgagactca tccgctatac cagtcagaac cagcggtgcc agtgataaaa actcccccct tgaagaagaa aatgtctggt accttcgggg gaatactagc tggcctaatc ggattactgg Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 2 wurde am 29.08.04 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 849 –1694 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 R102P*:

**801-** ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagtccc gggaaaggag agcccctaca ccccaacgtg cgggctcccc tctcccacgt agttcgagca gccaccatag atctccctcg cctaggaaat aaattacctg ctaggcatca cttaggtaaa ttgtcaggac tatatcaaat gaagggctgt acttttaacc cagaatggaa agtaccagat atttcggata ctcattttaa tttagatgta gttaatgagt gcccttcccg aaattggaaa tatttgactc cagccaaatt ctggcccaag agcatttcct actttcctgt ccaggtaggg gttaaaccaa agtatcctga caatgtgatg caacatgaat caatagtagg taaatattta accaggctct

atgaagcagg aatcetttat aageggatat etaaacattt ggteacattt aaaggteage ettataattg ggaacageaa cacettgtea ateaacatea catttatg**at g**gggeaacat ecageaaaat eaatggaegt eagaeggata gaaggaggag aaataetgtt aaaceaaett geeggaagga tgateecaaa agggaetttg acatggteag geaagttee aaeaetagat caegtgttag aceatgtgea aaeaatggag gagataaaea eeeeecagaa teagggaget tggeetgetg gggegggaag gagagtagga ttateaaate egaeteetea agagatteet eageeecagt ggaeteegg ggaagaeecaa aaageeegg aagetttee erettatea gaagaaagae eaeeggaaae eaeeecaett eeteegtett eeeeteetee gggaagee aageteette etggegaaga aatgeetget eeggaatea teegggage tggeetgaae eageggtgee agtgataaaa aeteeeeet tgaagaagaa aatgeetget aeetteeggg gaataetage tggeetgaae eggetaetee aagettttt ettgttgata aaaattetag aaataetgag gaggetagat tggtggtgga tteeteeteag teeteeaaag -1920 Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das

geänderte Nukleotid.

Klon 2/1 wurde am 06.08.03 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 839 –1704 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### *pCD0 Q104P*:

801- ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagteee gggaaaggag ageeeetaa eeeeaacgtg eggeteeee teteecaagt agttegagea geeaeeatag ateteeeteg eetaggaaat aaattaeetg etaggeata ettaggtaaa ttgteaggae tatateaaat gaaggeetg aetttaaee eagaatggaa agtaeeagat atteggata eteattaa ttagatgta gttaatgagt geeetteeeg aaattggaaa tattgaete eageeaaatt etggeeeaag ageatteet aetteetgt eeaggtaggg gttaaaceaa agtaeegga eaatgtgatg eaacatgaat eaatagtagg taaatatta aeeaggeete atgaageagg aateettat aageggatat etaaaeattt ggteaeatt aaaggteage etataattg ggaaeageaa eaeettgtea ateaaeatte geeggaagga tgateeeaaa eagggeettg eagaeggat gaaggaggag aaataetgtt aaaceaatt geeggaagga tgateeeaaa agggeettg aeagggeet ggeegggaag gagagtagga ttateaaate egaeteetea agagateet eageeeaat eeegeagat tegeetgeg gggegggaag gagagtagga ttateaaate egaeteetea agagateet eageeeaat eeeteegge ggaagaeeaa aaageeegg aageettteg eegttateg agagaagaa eaeetgggaaa eageteete tegggaetea teegetate eeeteetea gtggaageta caaceeggg aegateeet etggaagaa aatgteetge teggageta teegetate eagteggaae eageggtee agtgataaaa acteeeete tgaagaagaa eagtetee teggggaetea teegetate eagteggaae eageggtee aggtgataaaa acteeeet tgaagaagaa aatgteetg gaggetagat tggtggtgga ttteeeaag -1920 Mit moter Hinterlagung ist das geënderte Kodon hervorgehoben: in fetter Schrift das

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 3/2 wurde am 06.11.03 und 08.04.05 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 846 –1865 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

#### pCD0 myr-:

**801-** ttgtctatgg gagaagacgt tcaaagteee gggaaaggag ageeeetaea ecceaacgtg eggeteeee teteecacgt agttegagea geeaeeatag atcleeeteg eetaggaaat aaattaeetg etaggeatea ettaggtaaa ttgteaggae tatateaat gaagggetgt actttaaee eagaatggaa agtaeeagat atteggata eteatttaa ttagatgta gttaatgagt geeetteeeg aaattggaaa tattgaete eageeaaatt etggeeaag ageatteet aetteetgt eeaggtaggg gttaaaceaa agtateetga eaatgtgatg eaaeatggat eaatagtagg taaatatta aeeaggeet atgaageagg aateetttat aageggatat etaaaeattt ggteeaatt eaatggaege etataattg ggaaeageaa eaeettgtea ateaaeatt geeggaagga tgateeeaa agggeettg eaaggaegg gaaggaegga aaataetgtt aaaeeaett geeggaagga tgateeeaa agggeettg eaagggaeg geaagttee aaeaeatgat eaegtgttag aeeatgtgea aaeaatggag gagataaea eeeteeaga teagggaet tggeetgeeg ggeegggaag gagagtagga ttateaaate egaeteetea agagateet eageeeaat eeeteega teggeetee eggaagee aageettteg eegttateaa gaagaagae eaeeggaae eaeeeaet eeeteegg gaataeea eageggeta eaaeeeggg aegateeet eetggaaat eagteetee teggaaete eeeteeggaageet eeetee agtgataaa aeteeeet tgaagaagaa eagteete teggaaeta teegetatee eegteatee eageegg agtgataaaa aeteeeet tgaagaagaa aatgtetggt aeetteggg gaataetage tggeetaate ggataeet agtgataaaa aeteeeet tgaagaagaa aatgtetggt aeetteggg gaataetage tggeetaate ggataeet agtgataaaa aeteeeet tgaagaagaa aatgtetggt aeettegggg gaataetage tggeetaate ggataeetgg taagetttt ettgtgata aaaattega gaagategg gagagaegat tggteggaga tteteeaae eageggtee agtgataaaa aeteeeet tgaagaagaa aatgtetgg gageggagat tggeggaga tteteeaae eageggtee aagetttte ettgtgata aaaatteeg aaateegg gagegatgat tggtggtgga tteteetee gteteaae eagegdee teagettet ettgtgata aaaatteeg aaateegg gagegagat tggteggaga tteteeaae eagegatee teeteese etteeseg teeteeaae eagedeaga tggteggaga tteteeaae eagegdee aagettet etteeseg teeteeaa aaateegg gagegeagat tggteggaga tteteeaae eagegdee aaateeteese etteeseggag gagateaae eagedeage tggeetaae eagegdee aagetteeseggaga etteeseggagaa aaateetga gaggeeagaat tggteggaga tteteeaae eagegaeeseg

Mit roter Hinterlegung ist das geänderte Kodon hervorgehoben; in fetter Schrift das geänderte Nukleotid.

Klon 4 wurde am 13.02.04 und 05.04.04 sequenziert. Die Nukleotidsequenz war lesbar nt 1196 –1690 (laut Vector NTI) und zeigte den gewünschten Austausch.

## Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen des preS verschiedener Avihepadnaviren:



CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

Abbildung 57: Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen des preS-Teils verschiedener Avihepadnaviren. Das Alignment wurde auf der Website <u>http://www.ebi.ac.uk/clustalw</u> durchgeführt. Links stehen die Namen der Virusisolate. RGHBV (Ross Goose HBV, (Guo et al., 2005), CHBV1 (Crane HBV, Kranich Hepatitis B Virus (Prassolov et al., 2003)), DHBV22, DHBV26 und DHBV1 (Sprengel et al., 1991), DHBV3 (Lambert et al., 1990), DHBV16 (Mandart et al., 1984), SGHBV9 (Snow goose HBV, Schneegans Hepatitis B Virus, (Chang et al., 1999), HHBV4 (Heron HBV, Graureiher Hepatitis B Virus, (Sprengel et al., 1998), STHBV21 (Stork HBV, Storchen Hepatitis B Virus, (Pult et al., 2001). Der Beginn (Methionin) der entsprechenden Proteine ist in dicker Schrift hervorgehoben. Durch die gelbe Unterlegung wurde der in allen DHBV-Isolaten identische Bereich AS 89 - 115 markiert. \* entspricht einer in allen Sequenzen identischen AS, was mit roter Unterlegung optisch hervorgehoben wurde. : entspricht einem konservierten AS-Austausch.



# Epitop-Kartierung des DHBV-spezifischen Antikörpers DO84:



# 8 Abkürzungen

Α	Adenin
α	anti, alpha
Ad	Adenovirus
Ac	Acetyl
ACS	Asymptomatischer Carrier Status
AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen oder Silber
AS	Aminosäure(n)
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
C-	Carboxy-
ca.	circa
ссс	kovalent geschlossen zirkulär (engl. covalently closed circular)
CD	Circulardichroismus (engl. circular dichroism)
cDNA	komplementäre DNA
CDR	Komplementaritäts – bestimmende Region(en) (engl.
	complementarity determining region(s))
CHBV	Kranich (engl. Crane) Hepatitis-B-Virus
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CsCl	Caesiumchlorid
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
dCPD	Carboxypeptidase D der Ente (engl. <i>duck Carboxypeptidase D</i> )
dCPD-C	C-Domäne der dCPD
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHBV	Hepatitis-B-Virus der Ente (engl. Duck Hepatitis B Virus)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	
	2 -Desoxyribonukleosid-5 -tripnosphat
DK	direkte Sequenzwiedernolung (engl. <i>direct repeat</i> )
E	
ECL	engl. ennancea chemiluminescence
E. COIL	Escherichia coli
EDIA	Ethylendiamintetraessigsaure
ELISA	engl. enzyme – linkea immunosorbeni assay
engi. Enk	Enhanger
	Enlancer Endonlagmatisches Datilzuhum
EK at al	Endoprasmatisches Kettkulum
Ct al.	ongl fragment antigen hinding
	engi. jragment antigen binaing
rc	engi. jragment crystallizing

FKS	fetales Kälberserum
FPLC	engl. fast performance liquid chromatography
G	Glycin, Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,80665m/s <sup>2</sup> )
GFP	green fluorescent protein
gp	glykolysiert
GSHV	Erdhörnchen (engl. Ground squirrel) Hepatitis Virus
°C	Grad Celsius
H	Histidin
h	Stunde
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
HBc	Hepatitis B "core" – Protein
HBcAg	Hepatitis B "core" – Antigen
HBe	Hepatitis B "early" – Protein
HBeAg	Hepatitis B "early" – Antigen
HBs	Hepatitis B "surface" – Protein
HBsAg	Hepatitis B "surface" – Antigen
HCl	Salzsäure (engl. <i>Hydrochloric acid</i> )
HBV	Hepatitis B Virus
HBV S	S-Region des HBV Genoms, S Domäne des HBs – Proteins
HEPES	4-(2-Hydroxethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HHBV	Graureiher (engl. <i>Heron</i> ) Hepatitis-B-Virus
His	
HSC/U	Hitzeschock Protein /0 (engl. heat shock protein /0)
Hsp90	Hitzeschock Protein 90 (engl. <i>neat shock protein 90</i> )
Ig	
IgG IgM	Immunglobulin G
	Isopropyl & D. Thiogolaktosid
	international unit
K	I vsin
k	Kilo
k kb	Kilobase(n)
kbn	Kilobasennaar(e)
kDa	Kilodalton
L	Leucin, large
1	Liter
Μ	molar, middle
m	milli (10 <sup>-3</sup> ), Meter
mA	Milli – Ampere
mAK	monoklonaler Antikörper
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol
mg	Milligramm
MGE	Multiplizität der Genomequivalente (engl. multiplicity of genome

	• 1
•	equivalents)
	Minute(n)
μι	$Mikroliter = 10^{-1} Liter$
ml	$Milliller = 10^{\circ} Liter$
μM	$mikromolar = 10^{\circ} M$
mM	millimolar = $10^{\circ}$ M
mRNA	messenger – RNA
myr	myristoyliert
N-	Amino-
n	Nano (10 <sup>-2</sup> )
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphatpuffer
ng	Nanogramm
NHS-	5(6)-Carboxtetramethylrhodamin-N-hydroxy-succinimidester
Rhodamin	
nm	Nanometer
nM	nanomolar = $10^{-9}$ M
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
<b>OD</b> <sub>280nm</sub>	optische Dichte bei 280nm
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei 600nm
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
р	Plasmid oder unglykolysiert
Р	Prolin oder Phosphorylierung
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSE	Phosphate Buffered Saline mit EDTA
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDH	primäre Entenhepatozyten (engl. primary duck hepatocytes)
PEG	Polyethylenglykol
pgRNA	prägenomische RNA
рН	pH – Wert
p.i.	post Infektion
pМ	$picomolar = 10^{-12} M$
pmol	picomol
P/S-Mix	Penicillin-Streptomycin-Mix
PO	Peroxidase
preS	pre-S – Region
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Arginin, registriertes Warenzeichen (engl. registered trademark)
RBS	Rezeptorbindestelle
RGHBV	Ross Gänse Hepatitis-B-Virus
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur, engl. reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S	small
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SGHBV	Schneegans (engl. Snow goose) Hepatitis-B-Virus
SOEing	engl. Splicing by Overlap Extension
SS	einzelsträngig (engl. single stranded)
STHBV	Storchen (engl. Stork) Hepatitis-B-Virus
SVP	subvirale(r) Partikel
Т	Thymin, Threonin
Tab.	Tabelle
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TB-	Terrific Broth Medium
Medium	
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	TBS mit zugesetztem Tween20
TCA	Trichloressigsäure (engl. Trichloroacetic acid)
tl	tailless
TM	Warenzeichen (engl. <i>trademark</i> )
ТР	terminales Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat = Polysorbat 20
U	Unit(s) (Enzymeinheit(en)) oder Uracil
ÜN	Übernacht
UV	Ultraviolett
V	Volt, Valin
vgl.	vergleiche
WHV	Waldmurmeltier (engl. Woodchuck) Hepatitis Virus
wt	Wildtyp
w / v	Masse pro Volumen (engl. Weight per volume)
<u>w</u> / w	Masse pro Masse (engl. Weight per weight)
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel

# 9 Veröffentlichungen

# Vorträge

**B. Lange,** N. Schmut, S. Urban: "Reassessment of the role of Carboxypeptidase D in DHBV Infection", The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Heidelberg, 18.-21. September 2005

**N. Schmut**, **B. Lange**, S. Urban: "Mutational Analysis of DHBV preS binding to variants of the duck Carboxypeptidase D C-Domain", 1<sup>st</sup> Meeting on "The Molecular Biology of Hepatitis B and Hepatitis C Viruses", Oderbrück, 10.–12. Oktober 2003

**N. Schmut**, S. Urban: "Interference with DHBV infection of primary duck hepatocytes by Carboxypeptidase D-independent inhibitors: elucidating the cofactors of DHBV infection", HBV / HCV Retreat, Heidelberg, 26.-27. April 2002

# Poster

**N. Schmut**, S. Held, S. Urban: "Distinct roles of the Duck Hepatitis B Virus (DHBV) preS domain of the large envelope protein in receptor interaction, internalisation and infectivity", Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2005, Hannover, 16.-19. März 2005

**N. Schmut**, S. Held, S. Urban: "Role of the DHBV preS part of the large DHBV envelope protein in receptor interaction, internalisation and infectivity", The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Woods Hole, 24.-27. Oktober 2004

**N. Schmut**, **B. Lange**, S. Urban: "Mutational Analysis of the Duck Hepatitis B Virus Receptor Binding Domain: Influence on receptor interaction and infectivity", Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2004, Tübingen, 17.-20. März 2004

**N. Schmut**, **B. Lange**, S. Urban: "Mutational Analysis of DHBV pres binding to variants of the duck Carboxypeptidase D C-Domain", The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Bergamo, 7.-10. September 2003

**N. Schmut**, S. Urban: "Interference with DHBV infection by antibodies recognizing a Carboxypeptidase D (gp180)-independent binding site in the large viral envelope protein", Gesellschaft für Virologie Jahrestagung 2003, Berlin, 26.-29. März 2003

**N. Schmut**, S. Urban: "Interference with DHBV infection by antibodies recognizing a Carboxy-peptidase D-independent binding site in the large viral envelope protein", The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Asilomar, 29. September - 3. Oktober 2002