

Natur und Funktion der Hepatitis B Virus Proteinkinase

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Wittkop, Linda
aus Lich

Giessen 2007

Aus dem Institut für medizinische Virologie

Direktor:
Prof. Dr. Wolfram Gerlich

1. Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Gerlich

2. Gutachter:

HSD Dr. Niepmann

Tag der Disputation:

6.11.2007

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Das Hepatitis B Virus	6
1.1.1 Klassifikation	6
1.1.2 Struktur	7
1.1.3 Replikation	11
1.1.3.1 Anheftung und Penetration	11
1.1.3.2 Freisetzung und Transkription der viralen DNA	12
1.1.3.3 Reifung des Genoms	13
1.1.3.4 Verpackung und Sekretion	17
1.2 Proteinkinasen	18
1.2.1 Proteinkinase C	18
1.2.1.1 Struktur	18
1.2.1.2 Regulation und Aktivierung	20
1.2.1.3 Verteilung der Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben	21
1.3 HBV und Proteinkinasen	22
1.4 Ansätze und Ziele der Arbeit	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Enzyme	23
2.1.3 Antikörper	24
2.1.4 Molekulargewichtsmarker	24
2.1.5 Lösungen und Puffer	24
2.1.6 Zelllinien	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Eukaryonte Zellkultur	28
2.2.2 Proteinkinase C Inhibition in HepG2.2.15 Zellen	28
2.2.3 Endogene Proteinkinase Reaktion mit Zellkulturüberstand aus HepG2.2.15 Zellen	29
2.2.4 Darstellung ³² P markierter Coreproteine	30
2.2.5 Konjugation von Antikörpern an Dynabeads	30
2.2.6 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15 Zellen	31
2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese	31
2.2.8 Immunblot	31
2.2.9 Aufreinigung von viraler DNA aus Zellkulturüberstand von HepG2.2.15 Zellen	32
2.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)	33
2.2.11 Nachweis von HBe und HBs Antigen im Zellkulturüberstand mittels ELISA	34
2.2.12 Isolierung von Hepatitis B Viren aus Plasma	34
2.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	35
2.2.14 Endogene Proteinkinase Reaktion mit aus Plasma isolierten Hepatitis B Viren	36
2.2.15 Proteinkinase C Inhibition in mit HBV-Wildtyp-Genom transfizierten HuH-7 Zellen	36

3	ERGEBNISSE	38
3.1	Proteinkinase-Aktivität in Capsiden von aufgereinigten Viren aus Plasma	38
3.1.1	Nachweis von rekombinanten <i>in vitro</i> phosphorylierten Capsiden und Capsiden aus Plasma	38
3.1.2	Optimierung des Nachweises der endogenen Proteinkinase Reaktion	40
3.1.3	Phosphorylierungskinetik in aus Plasma aufgereinigten Capsiden	43
3.1.4	Exogene versus endogene Phosphorylierung von Capsiden	44
3.1.5	Charakterisierung der Proteinkinase in Capsiden aus Plasma	45
3.1.6	Kontrollphosphorylierungen zur Inhibitorspezifität	48
3.1.7	Inhibition der exogenen gegenüber der endogene Phosphorylierung	49
3.1.8	Charakterisierung der Proteinkinase in Capsiden von Viren aus HepG2.2.15 Zellkulturüberstand	51
3.2	Intrazelluläre Effekte der PKC-Inhibitoren	52
3.2.1	Einfluss der PKC-Inhibition auf die intrazelluläre Capsidverteilung	52
3.2.2	Einfluss der PKC-Inhibition auf die Virussekretion	53
3.2.2.1	Endogene Proteinkinase Reaktion mit intrazellulärem Capsiden	54
3.2.2.2	Bestimmungen von HBs-Antigen und HBe-Antigen im Zellkulturüberstand.	56
3.2.2.3	Bestimmung der Virusmenge im Zellkulturüberstand	56
3.2.2.4	Endogene Proteinkinase-Aktivität in Viren aus Proteinkinase C Inhibitor-behandelten Hep G2.2.15 Zellen	57
4	DISKUSSION	60
4.1	Potentielle Phosphorylierungsstellen und Proteinkinasen des HBV Capsid	60
4.2	Phosphorylierung und Genomreifung	61
4.2.1	Proteinkinasen und HBV	61
4.2.2	Lokalisation der Proteinkinase	61
4.2.3	Natur der verpackten Proteinkinase	64
4.2.4	Funktion der Proteinkinase	66
5	LITERATURVERZEICHNIS	71
	ZUSAMMENFASSUNG	84
	ABSTRACT	85

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid Aminosäure	EDTA	Ethylindiamintetraacetat
Abb	Abbildung	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Abl	Abelson Kinase	ER	Endoplasmatisches Reticulum
Ak	Antikörper	ERK-1	Extracellular signal- regulated kinase 1
ALT	Alanin-Aminotransferase		extrazellulär Signal- regulierte Kinase
APS	Amoniumpersulfat		
AST	Aspartat-Aminotransferase		
ATP	Adenosintriphosphat		
b	Basen	FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
bp	Basenpaare	FKS	Fötale Kälber Serum
BSA	Bovines Serumalbumin		
bkg	background, Hintergrund	GAPD	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase
ccc	covalently closed, circular kovalent geschlossen, zirkulär	HBc	Hepatitis B Core (Kern) Protein
C-Terminus	Carboxyterminus	HBe	Hepatitis B e Protein
CAK	Core associated Serin kinase	HBs	Hepatitis B Surface (Oberflächen) Protein
	Core-assozierte-Serin- Kinase	HBx	Hepatitis B X Protein
cAMP	cyclic Adenosinmomophosphat	HBV	Hepatitis B Virus
	zyklisches Adenosinmonophosphat	HIV	Human Immunodeficiency Virus, Humanes Immundefizienz Virus
Cdc	Cell division cycle Zellteilungszyklus	hsp	heat shock protein, Hitzeschock Protein
Cdk	Cyclin dependent protein kinase	IC ₅₀	halb maximale Inhibitions- konzentration
	Cyclin abhängige Proteinkinase	LHBs	Large Hepatitis B Surface Protein, Großes Hepatitis B Virus Oberflächenprotein
Cdk	CDC like kinase CDC ähnliche Kinase		
D	Dalton	MHBs	Middle Hepatitis B Surface Protein, Mittleres Hepatitis B Virus Oberflächenprotein
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan		
DMEM	Dulbeccos Modified Essential Medium		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MW	molecular weight, Molekulargewicht
DR	direct repeat direkte Wiederholung		
ds	double stranded doppelsträngig	NES	nuclear export signal, Kernexport Signal
DTT	Dithiothreitol	NLS	nuclear lokalization signal, Kerntransport Signal
ECL	enhanced, verstärkte chemiluminescence	NPC	nuclear pore complex, Kernporen-Komplex

Abkürzungsverzeichnis

NP-40	Nonidet P-40	SDS	Sodiumdodecylsulfat
nt	nucleotides, Nukleotide	SHBs	Natriumdodecylsulfat Small Hepatitis B Surface Protein
N-Terminus	Aminoterminus		Kleines Hepatitis B Virus Oberflächenprotein
ORF	open reading frame, Offener Leserahmen	SH3	Src homology 3
PAGE	Polyacrylamid	ss	single stranded
PBS	Gelelektrophorese phosphat buffered saline Phosphat gepufferte Salzlösung	SSC	einzelsträngig sodium chloride sodium citrate
PCR	polymerase chain reaction Polymerase Kettenreaktion	SRPK	Serin-Arginin-rich Proteinkinase
PDK	3-phosphoinositide- dependent kinase 3-phosphoinositide abhängige Kinase	TAE	Serin-Arginin reiche Proteinkinase
PK	Proteinkinase	Tab	Tris Acetat EDTA Tabelle
PKC	Proteinkinase C	TEMED	Tetramethylenethylendiamin
POD	Peroxydase	TNE	Tris Natrium EDTA
POL	Polymerase	U	Units, Einheiten
PVDF	Polyvinylendifluorid	v/v	volume/volume Volumenprozent
RACK	Receptor for activated C kinases Rezeptor für aktivierte C- Kinasen	Well	Probenvertiefung der ELISA-Platte
rc	relaxed circular relaxiert zirkulär	w/v	weight/volume Gewicht/Volumen-Prozent
RNA	Ribonukleinsäure	w/w	weight/weight Gewichtsprozent
s	siehe	ZNS	Zentrales Nervensystem

Alle hier nicht aufgeführten Einheiten sind SI- bzw. erweiterte SI-Einheiten. Die letzte Stelle aller angegebenen Werte ist gerundet.

Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

1 Einleitung

Eine Hepatitis (griech. hepar = Leber; -itis = Entzündung) bezeichnet eine akute oder chronische entzündliche Erkrankung der Leber. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Einmal kann eine Hepatitis durch exogene Noxen wie Alkohol, Medikamente oder Chemikalien sowie bakterielle und parasitäre Erkrankungen ausgelöst werden, aber auch endogen durch Autoimmunerkrankungen hervorgerufen werden. Zu den häufigsten Ursachen gehören jedoch die viralen Hepatitiden. Hierbei muss man prinzipiell Infektionen mit primär hepatotropen Viren A – E von Infektionen mit nicht primär hepatotropen Viren unterscheiden. Letztere können im Rahmen einer systemischen Virusinfektion zu einer Begleithepatitis führen. Hierzu gehören unter anderen das Epstein-Bar-Virus, das Cytomegalievirus, Adenoviren und das Human Immunodeficiency Virus.

Weltweit gesehen ist die Infektion mit dem Hepatitis B Virus die Hauptursache für eine Hepatitis. Schätzungsweise 50 % der Weltbevölkerung hatten Kontakt zu diesem Virus und von diesen haben ca. 350 Millionen Menschen eine persistierende Infektion entwickelt. Chronisch Hepatitis B Infizierte haben ein stark erhöhtes Risiko eine Leberzirrhose zu entwickeln und das Risiko ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln liegt 20-100 fach über dem der Normalbevölkerung (Beasley et al., 1981).

Symptome einer Hepatitis sind meist unspezifisch wie Müdigkeit, Appetitlosigkeit Übelkeit und Schmerzen im rechten Oberbauch oder fehlen ganz, so dass auf eine laborchemische Diagnostik bei Verdacht auf eine Hepatitis nicht verzichtet werden kann. Eine Erhöhung der Transaminasen ALT und AST dient hierbei als richtungsweisende Diagnostik und zeigt das Ausmaß der Leberschädigung an. Aussagen über die Ursache der Erkrankung lassen sich nur durch weitere Parameter treffen. Im Falle einer Infektion mit dem Hepatitis B Virus sind dies unter anderen der Nachweis von HBc-Antikörpern, HBs-Antigen oder der viralen DNA im Serum des Patienten. In weniger als einem Prozent der akuten Infektionen mit HBV kommt es zu einer fulminanten Hepatitis mit letalem Ausgang. An den Folgen einer chronischen Infektion sterben ca. 1 Millionen Menschen pro Jahr. Infizieren sich Erwachsene kommt es in ca. 90 % der Fälle zu einer Ausheilung und lebenslangen Immunität. Kommt es jedoch schon im Neugeborenen Alter zu einer Infektion, so entwickelt sich in über 90 % der Fälle eine chronisch persistierende Form. Die Prävalenz der HBV Infektion zeigt eine große geographische und ethnische Variabilität. Diese liegt beispielsweise bei mehr als 50 % für die Bevölkerung von Sub-Sahara-Afrika, Teilen von Asien und Ozeanien, jedoch in Nordeuropa, Nordamerika und Teilen von Südamerika bei weniger als 5 %. In Ländern wie z.B. Taiwan und Ozeanien, welche eine generelle Impfung bereits im Kindesalter durchführen zeigte sich ein Rückgang der Prävalenz in der entsprechenden Altersgruppe um den Faktor 5 (Lin et al., 2003).

1.1 Das Hepatitis B Virus

1.1.1 Klassifikation

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist ein umhülltes DNA Virus und gehört zur Familie der Hepadnaviridae, welche in zwei Genera die Orthohepadnavirus und die Avihepadnavirus unterteilt werden. Säugetiere dienen den Orthohepadnaviren als Wirt und Vögel den Avihepadnaviren. Zusätzlich werden die HBV des Menschen noch in 8 Genotypen (A – H) unterschieden.

Tabelle 1: Übersicht bisher bekannte Hepadnaviren und deren Wirte (gemäß dem 8. ICTV* Bericht)

Gruppe	Hepadnavirus	Wirt	
Orthohepadnavirus	Hepatitis B Virus HBV; (Dane et al., 1970)	Mensch	
	Woodchuck Hepatitis Virus WHV; (Summers et al., 1978)	Waldmurmeltier	
	Ground Squirrel Hepatitis Virus GSHV; (Marion et al., 1980)	Erdhörnchen	
	Chimpanzee Hepatitis B Virus ChHBV; (Vaudin et al., 1988)	Schimpanze	
	Gibbon Hepatitis B Virus GiHBV; (Norder et al., 1996)	Gibbon	
	Arctic Squirrel Hepatitis Virus ASHV; (Testut et al., 1996)	Arktisches Ziesel	
	Woolly Monkey Hepatitis Virus WMHBV; (Lanford et al., 1998)	Wollaffe	
	Orangutan Hepatitis B Virus OuHBV; (Warren et al., 1998)	Orang-Utan	
	Gorilla Hepatitis B Virus GoHBV; (Grethe et al., 2000)	Gorilla	
	Avihepadnavirus	Duck Hepatitis B Virus DHBV; (Mason et al., 1980)	Pekingente
		Heron Hepatitis B Virus HHBV; (Sprengel et al., 1988)	Graureiher
		Ross Goose Hepatitis Virus RGHBV;	Ross Gans
		Grey Teal Hepatitis B Virus GTHBV; (Li et al., 1998)	Weißkehlente
Maned Duck Hepatitis B Virus MDHBV; (Li et al., 1998)		Mähnenente	
Stork Hepatitis B Virus STHBV; (Pult et al., 1998)		Weißstorch	
Snow Goose Hepatitis Virus SGHBV; (Chang et al., 1998)		Schneegans	
Crane Hepatitis B Virus CHBV; (Prassolov et al., 2003)		Kranich	

*ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

Allen Hepadnaviren ist eine hohe Spezies-Spezifität eigen. Als man herausfand, dass ein RNA-Prägenom als Matrize zur Transkription des negativen DNA Stranges innerhalb der

Core-Partikel dient (Summers and Mason, 1982), erkannte man eine den Retroviren ähnliche Replikationsstrategie.

Heute nennt man die Hepadnaviridae zusammen mit den Caulimo- und Badnaviridae, die ebenfalls die reverse Transkription benutzen (Toh et al., 1983), auch Pararetroviren. Orthoretroviren besitzen wie das Human Immunodeficiency Virus (HIV) ein RNA Genom.

1.1.2 Struktur

Das Hepatitis B Virus ist ein umhülltes sphärisches Partikel, welches auch nach seinem Entdecker Dane-Partikel genannt wird (Dane et al., 1970). In der Elektronenmikroskopie nach Negativkontrastierung schwankt die Größe der Viren zwischen 42 und 47 nm. Neben diesen findet man im Serum Infizierter 20 nm Sphären und Filamente unterschiedlicher Länge. Bei hochvirämischen Patienten können diese die Menge der Virionen um das tausendfache übersteigen, wobei letztere in einer Konzentration von bis zu 10^{11} Partikeln/ml vorkommen. Filamente und 20 nm Sphären enthalten kein Genom und bestehen nur aus den verschiedenen Oberflächenproteinen. Man unterscheidet das SHBs (Small Hepatitis surface protein), das MHBs (Middle Hepatitis surface protein) und das LHBs (Large Hepatitis surface protein). Carboxyterminal zeigen diese Proteine eine Kolinearität und unterscheiden sich aminoterminal durch zusätzliche Domänen. Das LHBs besteht aus der S-Domäne sowie den beiden N-terminal gelegenen PreS1- und PreS2-Domänen. Das MHBs besitzt zusätzlich zur S-Domäne die PreS2-Domäne und das SHBs besteht nur aus der S-Domäne. Für das LHBs sind zwei mögliche Topologien für die PreS-Domäne beschrieben. Diese kann sich entweder innerhalb oder außerhalb des Virus befinden (Bruss et al., 1994; Lambert and Prange, 2003). Da das HBs-Protein an einer oder zwei Stellen glykosyliert werden kann, können sechs Proteine unterschieden werden. Zusammen mit einer zellulären Lipidmembran bilden sie die äußere Hülle des Virus. Innerhalb dieser findet sich das Nucleocapsid, welches aus den Core-Proteinen gebildet wird. Die Core-Partikel können mit den innen gelegenen PreS - Domänen interagieren (Bruss, 1997; Ponsel and Bruss, 2003).

Core-Proteine bilden Dimere und sie schließen sich spontan zu Capsiden zusammen (Seifer et al., 1993; Zhou and Standring, 1992). Sie bestehen aus 180 oder 240 Core-Proteinen, abhängig davon ob sie sich in einer $T = 3$ oder $T = 4$ Symmetrie zusammenlagern. Ihre Größe beträgt 32 und 36 nm (Crowther et al., 1994; Kenney et al., 1995). Innerhalb des Nucleocapsids finden sich 2 nm große Löcher, die die Diffusion von Nucleotiden erlauben. Im Bereich des Carboxyterminus besitzen die Coreproteine vier so genannte Arginin-reiche Cluster sowie 7 Serinreste als potentielle Phosphorylierungsstellen. In Gegenwart von RNA kommt es zu einer verstärkten Bildung von Nucleocapsiden, da es zu einer Interaktion der RNA mit den Arginin reichen Cluster kommt (Seifer and Standring, 1995). Für den carboxyterminalen Bereich sind in der Literatur zwei Lokalisationen beschrieben. In RNA

haltigen Partikeln befindet er sich innen (Zlotnick et al., 1997). Nach Genomreifung kommt es teilweise zu einer Exposition auf der Oberfläche der Capside (Rabe et al., 2003).

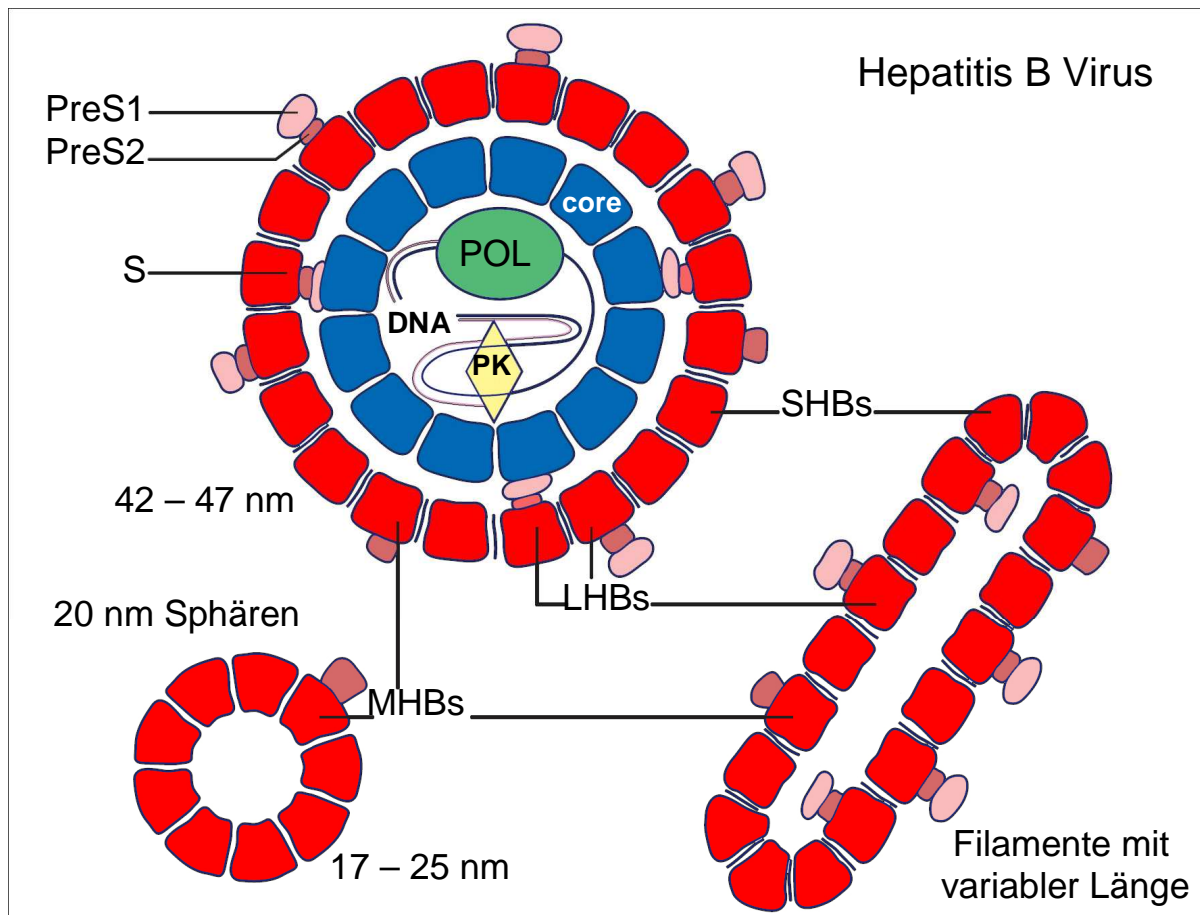


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus und der subviralen Partikel (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005)

POL: Polymerase; PK: Proteinkinase; SHBs, MHBs; LHBs: Small, Middle, Large Hepatitis surface Protein; core: Core-Protein; S: S-Domäne; PreS1, PreS2: PreS1-, PreS2- Domäne

Innerhalb reifer Core-Partikel befindet sich eine zirkuläre, partiell doppelsträngige DNA (Robinson et al., 1974). Der längere negative DNA-Strang (Abb. 2 in blau) besteht aus ca. 3200 Nukleotiden (je nach Subtyp kann die Länge variable sein). Das 5' Ende dieses Stranges ist kovalent mit der viralen Polymerase verbunden (Gerlich and Robinson, 1980). Die virale Polymerase transkribiert die prägenomische RNA, welche zunächst in das Nucleocapsid verpackt wird, in den negativen DNA-Strang. Sie besitzt neben einer Domäne, die als Primer fungiert, eine Reverse Transkriptase und RNase H Aktivität. Die zirkuläre Struktur kommt über Bildung von Basenpaaren zwischen den überhängenden Enden der negativen und positiven DNA-Stränge zustande (Charnay et al., 1979; Will et al., 1987). Partiiell liegt das Genom sogar dreisträngig vor, da die Enden des negativen DNA Stranges in einem Bereich (sog. terminale Redundanz, redundancy) von 9 Basen überlappen (Will et al., 1987). Der positive DNA Strang (Abb. 2 in pink, gepunktete Linie stellt die variable Länge dar) besitzt eine variable Länge von 1100 bis 2600 nt (Kaplan et al., 1976; Landers et al., 1977). Sein 5' Ende ist definiert und mit einem 18 nt langem RNA Oligonukleotid (Abb. 2

RNA primer) verbunden, welches als Primer für die Zweitstrang Synthese fungiert (Seeger et al., 1986).

Die HBV DNA kodiert für vier teilweise überlappende offene Leserahmen (open reading frame, ORF), welche auf dem negativem DNA Strang konserviert sind (Tiollais et al., 1985). Diese kodieren das Core-Protein (HBc) und eine zusätzliche Präcore Region, die zu einer modifizierten Form des Core-Proteins, genannt HBe-Protein führt; des Weiteren für die verschiedenen Oberflächen Proteine, die DNA Polymerase und für das so genannte HBx-Protein, dessen Funktion bisher noch nicht vollständig geklärt ist.

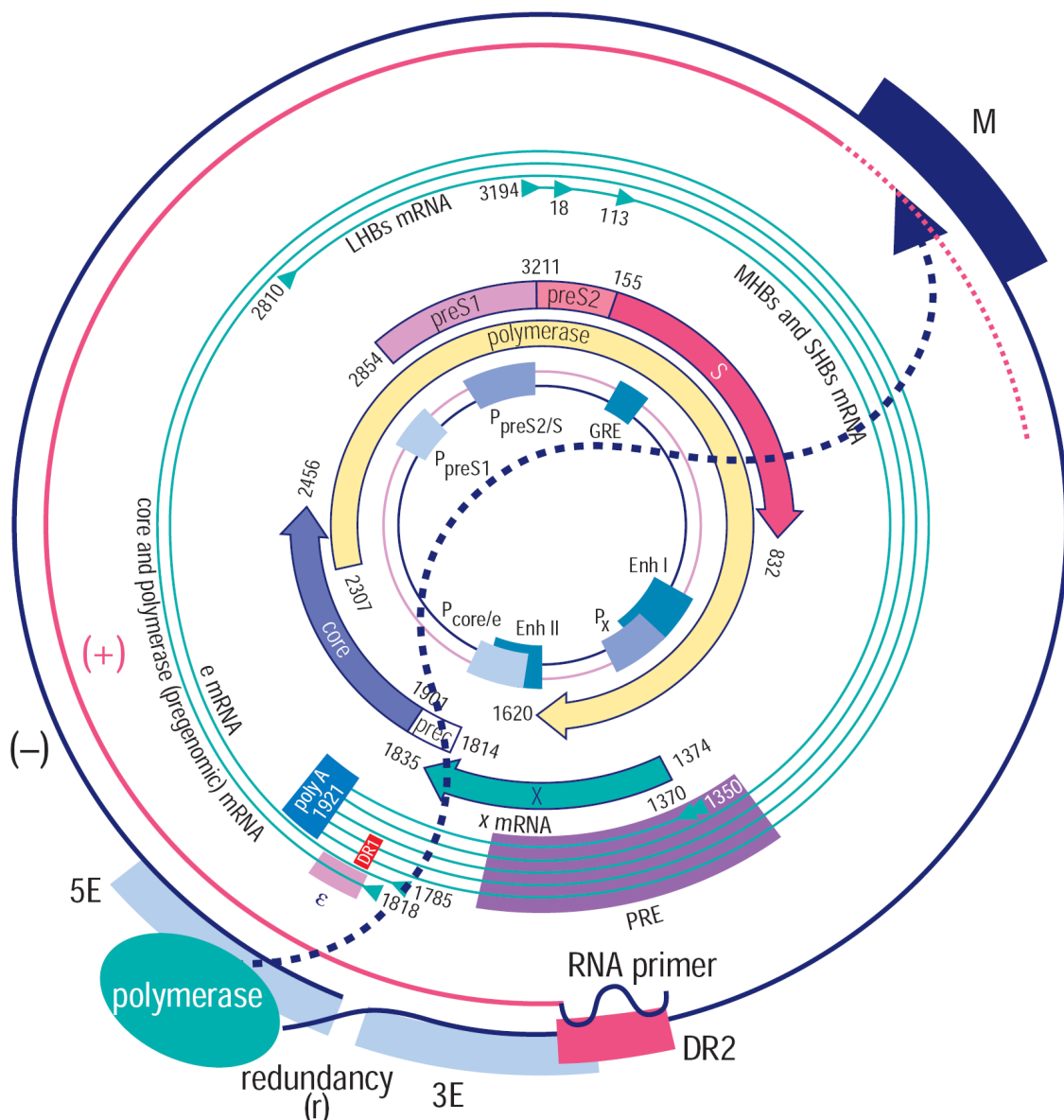


Abbildung 2: Genomstruktur und regulatorische Elemente (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005) 3E, 5E und M: Elemente die zur Zirkularisierung des Genom benötigt werden; weitere Abkürzungen sind im Text erläutert.

Für die Kontrolle der Transkription existieren neben den vier HBV Promotern (Pcore/e, Px, PpreS1 und PpreS2/S) ein Glucocorticoid responsive element (GRE), sowie zwei Enhancer

(Enh I und Enh II), welche zu einer Zunahme der Transkription führen. Inhibiert wird die Transkription durch ein Negative Regulatory Element (NRE) (Donello et al., 1996; Huang and Yen, 1995; Huang et al., 1996). Alle viralen mRNAs haben ein gemeinsames 3' Ende, da für die Beendigung der Transkription ein einzelnes Polyadenylierungs Signal (TATAAA) existiert (Cherrington et al., 1992).

Auf der Ebene der mRNA existieren weitere regulatorische Elemente. Das Posttranscriptional regulatory element (PRE) supprimiert das Spleißen der RNA (Huang and Liang, 1993). Weiterhin findet man ein so genanntes ϵ Signal, welches für die Bindung der viralen Polymerase verantwortlich gemacht wird (Bartenschlager and Schaller, 1992; Junker Niepmann et al., 1990; Tavis and Ganem, 1993). Zusätzlich finden sich 2 Wiederholungssequenzen einer Länge von 11 nt, die DR1 und DR2 (DR = direct repeat) genannt werden und bei der Initiation der reversen Transkription und der DNA-Plusstrangsynthese eine Rolle spielen. Eine M Region findet sich auf dem DNA Strang negativer Polarität und bewirkt – vermutlich über die Struktur der DNA - die Translokation des Primers und der Polymerase zu dem Ort, wo die Synthese des positiven DNA Stranges beginnt.

Neben Genom und Polymerase findet man im Nucleocapsid eine Proteinkinase zellulären Ursprungs, welche Serinreste im carboxyterminalen Bereich des Core-Protein phosphoryliert (Albin and Robinson, 1980; Gerlich et al., 1982). Diese Aminosäuren sind im Innern des Capsids lokalisiert und gegen Hydrolyse geschützt (Gerlich et al., 1982). Als Kandidat für die so genannte Virus assoziierte Kinase werden in der Literatur mehrere Kinasen beschrieben. Eine endogene Proteinkinase C Aktivität wurde durch Inhibitor- und Antikörper-Studien beschrieben (Kann and Gerlich, 1994; Kann et al., 1993). Außerdem wurde eine endogene GADP-Kinase Aktivität sowie eine 46 kDa Serin Kinase Aktivität beschrieben (Duclos Vallee et al., 1998; Kau and Ting, 1998).

1.1.3 Replikation

1.1.3.1 Anheftung und Penetration

Das Hepatitis B Virus zeigt eine hohe Affinität zu Hepatozyten, ist jedoch in der Lage auch andere Zellen mit einer deutlich eingeschränkten Effizienz zu infizieren. Der Aufnahmemodus des Hepatitis B Virus ist noch nicht eindeutig geklärt. Für die PreS1 Domäne konnte durch Peptid- und Antikörper-Studien eine essentielle Rolle bei der Bindung an Hepatozyten Membranen festgestellt werden (Neurath et al., 1986; Pontisso et al., 1989). Für primäre humane Hepatozyten Kulturen und für Hepatozyten von *Tupaia belangeri*, sowie für die susceptible humane Zelllinie HepaRG konnte dies bestätigt werden (Glebe et al., 2005; Gripon et al., 2005; Maeng et al., 2000). Auch Antikörper gegen SHBs sind in der Lage die Infektion zu verhindern. Untersuchungen mit *Tupaia* Hepatozyten zeigten, dass durch monoclonale Antikörper gegen PreS1 und natives SHBs, die Infektion komplett gestoppt werden kann. Antikörper gegen PreS2 und SHBs Sequenzen konnten diese nur teilweise unterbinden (Glebe et al., 2003). HBV Mutanten, denen ein Startcodon für die Bildung des MHBs (PreS2-Domäne) fehlt, sind sowohl in Patienten als auch in Zellkultur lebensfähig (Fernholz et al., 1993). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass lediglich das LHBs- und SHBs-Protein bei der Anheftung eine bedeutende Rolle spielen. Als mögliche Rezeptoren für PreS1 sind unter anderem der Interleukin-6 (Neurath et al., 1992) und der Asialoglycoprotein-Rezeptor (Treichel et al., 1994) beschrieben, für SHBs kommt Apolipoprotein H (Mehdi et al., 1994) und Annexin V (Gong et al., 1999; Hertogs et al., 1993) hinzu und PreS2 kann z.B. an Fibronectin (Budkowska et al., 1995) oder an den Transferrin-Rezeptor (Franco et al., 1992) binden. Eine entscheidende Rolle bei der Infektion des humanen HBV konnte jedoch noch für keinen Rezeptor gezeigt werden.

Ebenso ist die Penetration des Virus noch nicht vollständig geklärt. So wird angenommen, dass das Virus über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen wird. Im Gegensatz zu anderen Viren die diesem Aufnahmepfad folgen - wie z.B. Adeno- und Parvoviren (Greber et al., 1993; Suikkanen et al., 2003) - scheint jedoch eine Ansäuerung im Zuge der Endozytose nicht notwendig zu sein (Köck et al., 1996).

Alle Hepadnaviridae besitzen in der S-Domäne carboxyterminal eine kurze hydrophobe Sequenz, die mit so genannten Fusionspeptiden anderer umhüllter Viren vergleichbar ist. Tauscht man die Sequenz des Fusionspeptid des Influenza-Hemagglutinins gegen die hydrophobe Sequenz der S-Domäne aus, so führt diese auch weiterhin zu einer Membran Fusion (Berting et al., 2000). Der weitere Transport des ins Zytoplasma gelangten Nucleocapsid geschieht wahrscheinlich als ganzes Capsid, wie für das DHBV von Köck et al. impliziert wird (Köck et al., 2003). Die Caside werden dann mit Hilfe von Mikrotubuli zum Nucleus transportiert (Rabe et al., 2006).

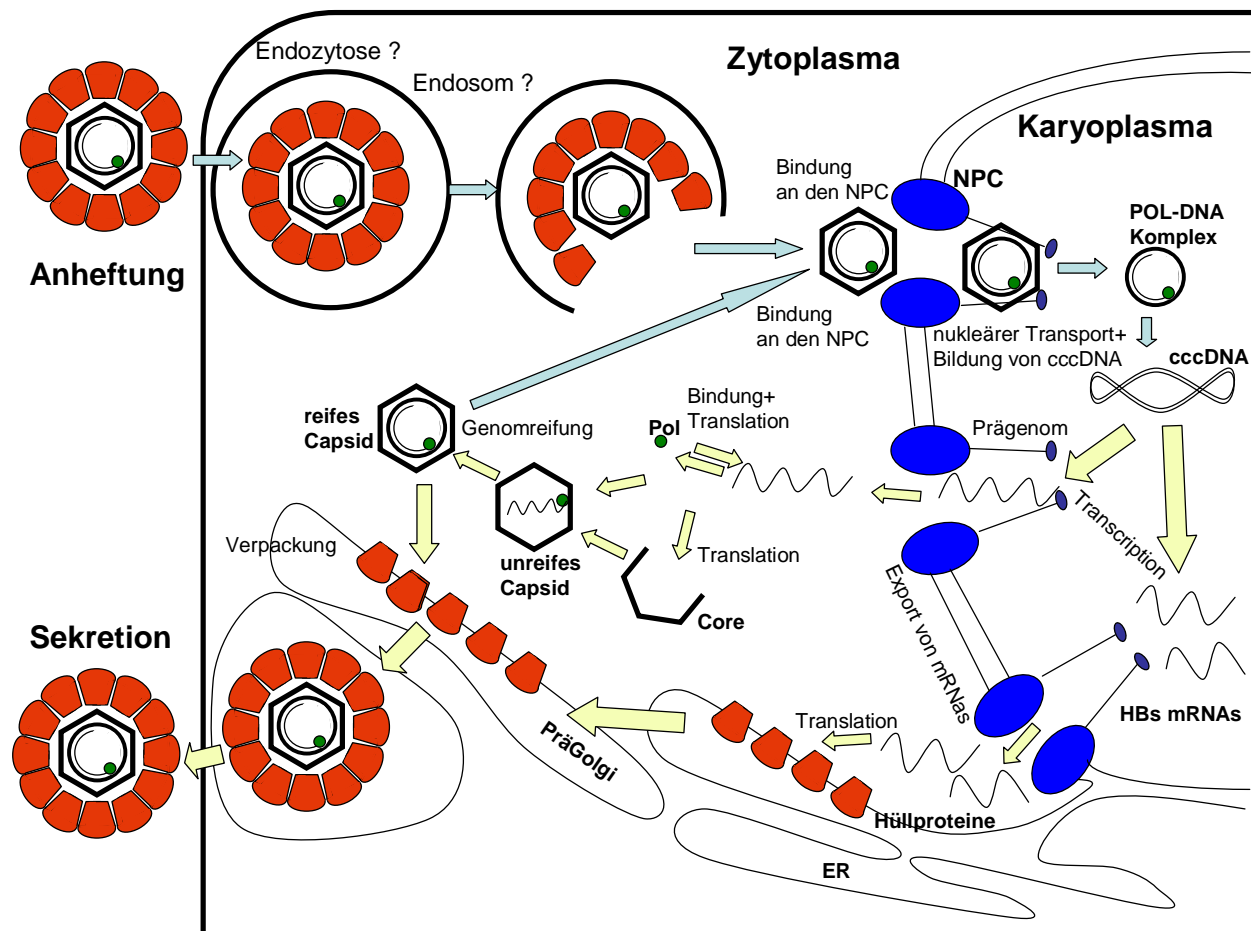


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HBV Replikationszyklus (modifiziert nach Kann und Gerlich, 2005)

NPC: nuclear pore complex; ER: Endoplasmatisches Retikulum; Pol: Polymerase; PräGolgi: Prä-Golgi-Kompartiment; ccc: covalently closed, circular

1.1.3.2 Freisetzung und Transkription der viralen DNA

Die Vermehrung der viralen DNA des HBV Genoms erfolgt mittels der zellulären RNA-Polymerase II (Köck and Schlicht, 1993), so dass der Eintritt des Genoms in das Karyoplasma des Nucleus essentiell ist. Das Nucleocapsid ist in der Lage an den Kernporen-Komplex (nuclear pore complex = NPC, im Folgenden so abgekürzt) zu binden. Hierzu erfolgt ein klassischer Import karyophiler Proteine. Importin α und β reagieren dafür mit einem nuclear localisation signal (NLS), welches in Abhängigkeit der Genomreife und/oder der Phosphorylierung der Core-Proteine an der Oberfläche exponiert wird (Kann et al., 1999). Hiernach kommt es dann zu einer Translokation des gesamten Komplex in den nukleären Korb (nuclear basket), der an der Innenseite der Kernpore lokalisiert ist. Die Capside können dabei als Ganzes durch den NPC transportiert werden (Pante and Kann, 2002). Es folgt eine Dissoziation des Nucleocapsids und die partiell doppelsträngige DNA wird in das Karyoplasma entlassen (Rabe et al., 2003). Im weiteren Verlauf wird eine zirkuläre kovalent geschlossene DNA (cccDNA: covalently closed, circular DNA) gebildet,

was die Abspaltung der kovalent gebundenen Polymerase und das Auflösen der terminalen Redundanz beinhaltet, ohne dass diese Schritte im Einzelnen näher bekannt sind. Der positive Strang wird dann durch zelluläre DNA-Polymerasen aufgefüllt (Köck and Schlicht, 1993) und schließlich werden die Enden ligiert. Anschließend liegt das Genom als episomales Minichromosom mit Nukleosomen assoziiert vor (Bock et al., 1994).

Der negative DNA Strang dient der zellulären Polymerase II als Matrize zur Transkription. Es werden insgesamt fünf mRNA synthetisiert. Unter diesen kann man mRNA subgenomischer Länge, die für das X-Protein und die Oberflächenproteine kodieren, von mRNAs supergenomischer Länge, welche für HBe-, core-Protein und die Polymerase kodieren, unterscheiden. Aufgrund eines posttranskriptionalen regulatorischen Elements (PRE; (Huang and Liang, 1993; Huang et al., 1996)) bleiben die viralen mRNA im Unterschied zu zellulären mRNA weitgehend ungespleißt. Da das HBV Genom nur für ein Polyadenylationssignal (TATAAA) kodiert, sind alle viralen mRNA mit dem gleichen Poly A Schwanz am 3' Ende versehen. Nachdem sie am 5' Ende mit einer CAP Struktur versehen wurden, gelangen sie ins Zytoplasma und dienen den Ribosomen als Matrize zur Translation.

1.1.3.3 Reifung des Genoms

Eine mRNA mit einer Länge von näherungsweise 3350 nt inklusive einer terminalen Redundanz von 150 nt dient als so genannte prägenomische RNA als Matrize zur Synthese des negativen DNA Strang (Nassal and Rieger, 1993). Daneben werden von der prägenomischen RNA auch die Core-Proteine und die Polymerase translatiert. Die Core-Proteine bilden im Zytoplasma Dimere die spontan zu Capsiden assemblieren. *In vivo* werden dabei neben der an das Prägenom gebundenen Polymerase auch noch zelluläre Chaperone wie Hsp90 und Hsp70 verpackt (Beck and Nassal, 2003; Hu and Anselmo, 2000). Die Verpackung des Prägenoms wird durch die Bindung der Polymerase an den "bulge", der durch Basenpaarung entstandenen stem-loop RNA Sekundärstruktur des ϵ -Signals am 5' Ende des prägenomischen RNA, initiiert (Junker Niepmann et al., 1990) (Abbildung 4A). Daraufhin wird die negativ-Strang DNA-Synthese begonnen, die auch als Erststrangsynthese bezeichnet wird. *In vivo* findet diese innerhalb der cytoplasmatischen Core-Partikel statt. Das erste Nucleotid bindet an eine Hydroxylgruppe des Tyrosins 63 (Weber et al., 1994) bzw. in DHBV an Tyrosin 96 (Zoulim and Seeger, 1994) in der Primer Domäne der Polymerase. (Abbildung 4A und 4B).

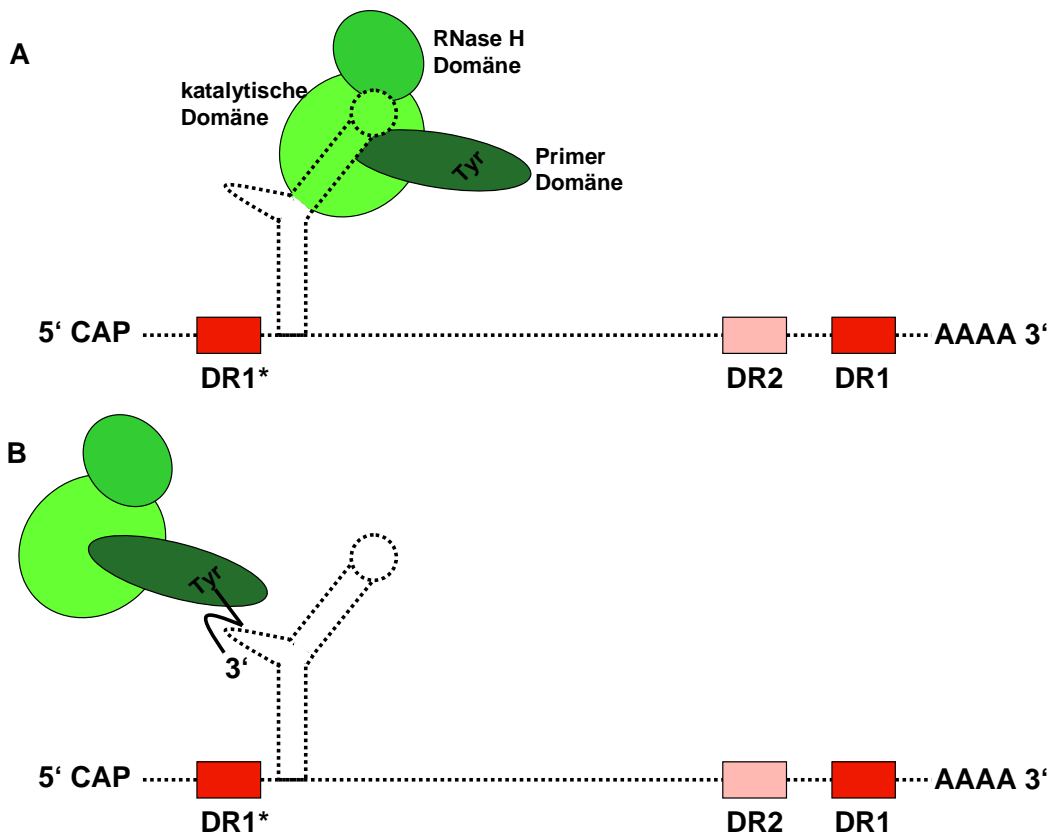


Abbildung 4: Reifung des HBV Genoms (modifiziert nach Kann and Gerlich, 2005)

A: Bindung der viralen Polymerase an das Verpackungssignal ε am 5' Ende der prägenomischen RNA
 B: Start der reversen Transkription mit den ersten 3 Nucleotiden am bulge des stem-loop

Nach der Synthese der ersten drei Nucleotide des negativ-Strangs (bei DHBV 4 nt) kommt es zu einer Translokation des Polymerase-Oligonucleotid-Komplex zum sogenannten DR1 am 3' Ende des RNA Prägenoms, der zu den bereits gebildeten Basen komplementär ist (Abbildung 4C). Von hier wird die Synthese Richtung 5' Ende der RNA fortgesetzt. Während der Synthese kommt es zu einer Degradation der RNA-Matrize durch die RNase H Aktivität der Polymerase. Ausgenommen von der Degradation ist eine 18 nt lange Sequenz am 5' Ende, welche die DR1 Sequenz enthält (Abbildung 4D).

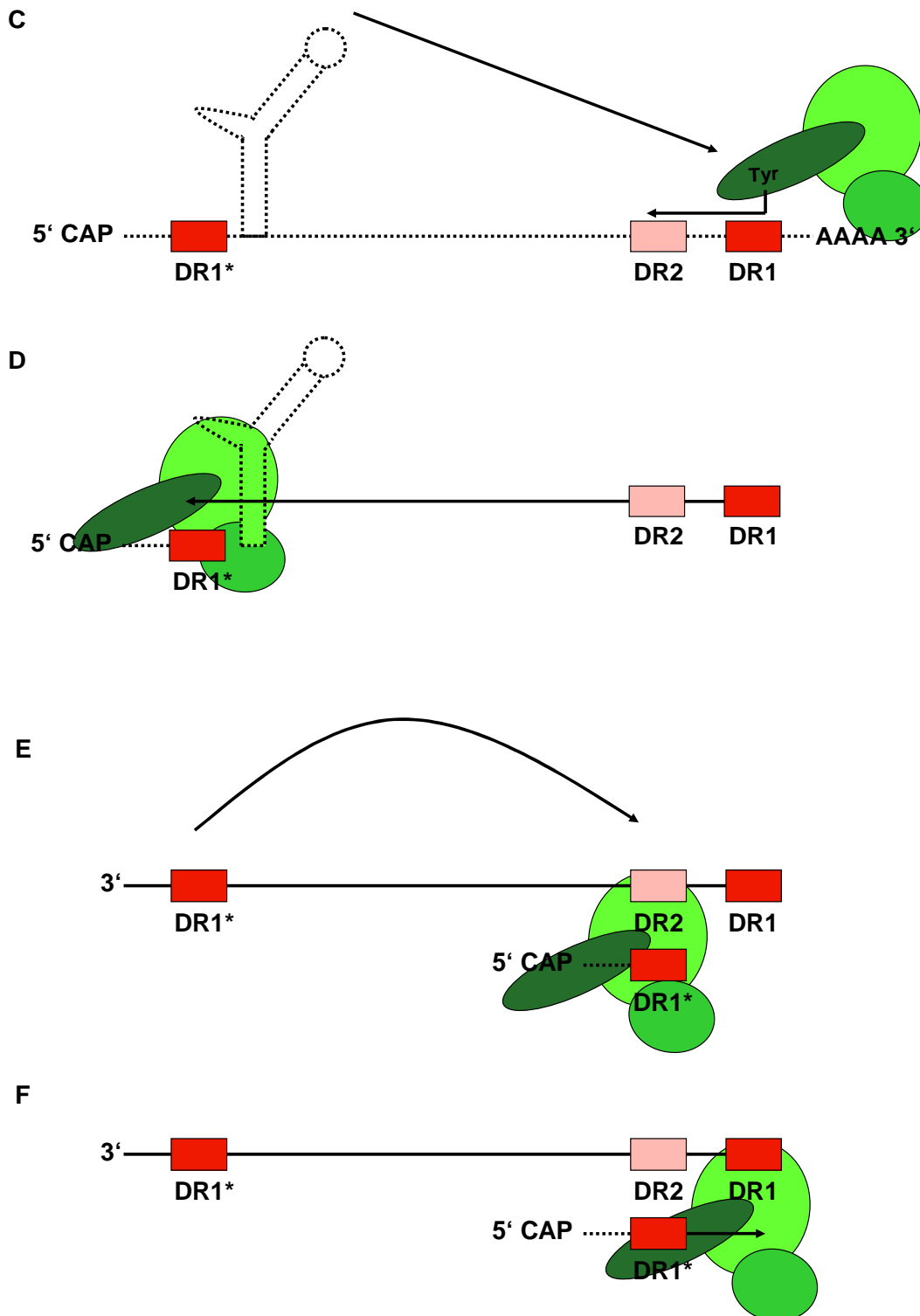


Abbildung 4: Reifung des HBV Genoms (modifiziert nach Kann and Gerlich, 2005)

C: Translokation des Polymerase-Oligonukleotid-Komplexes zum DR1

D: Synthese des negativ-Stranges und Degradation der prägenomischen RNA

E: Translokation der Polymerase mit dem 5' Ende der RNA zum DR2

F: Synthese des positiven Stranges

Diese 18 nt RNA dient als Primer für die Synthese des Positiv-Stranges. Hierzu erfolgt die Translokation des Primers an die DR2 Sequenz, die sich am 5' Ende des neu gebildeten Negativ-Stranges befindet (Abbildung 4E). Zur korrekten Primer-Translokation ist eine Faltung des negativen Stranges notwendig, welcher durch die sog. M-Region im S ORF vermittelt wird (Liu et al., 2003). Die DR2 Sequenz stellt eine zum DR1 repetitive Sequenz dar. Nach Bindung des Primers und der Polymerase erfolgt die Synthese des positiv-Stranges in Richtung 5' Ende des Negativ-Stranges (Abbildung 4F).

Aufgrund der kurzen terminalen Redundanz r ist es möglich, dass das 3' Ende des positiven Stranges sich dem 3' Ende des negativen Stranges annähert und sich so eine zirkuläre DNA bildet, auch rcDNA genannt (relaxed closed DNA) (Abbildung 4G). Zusätzlich sind zwei weitere Regionen, 5E und 3E, beschrieben, die bei der Bildung der zirkulären Struktur der DNA eine Rolle spielen (Liu et al., 2003). Nach dem Annealing wird die Positiv-Strang Synthese fortgesetzt, aber nicht zu Ende geführt (Abbildung 4H). Die Gründe für die unvollständige Synthese sind nicht bekannt.

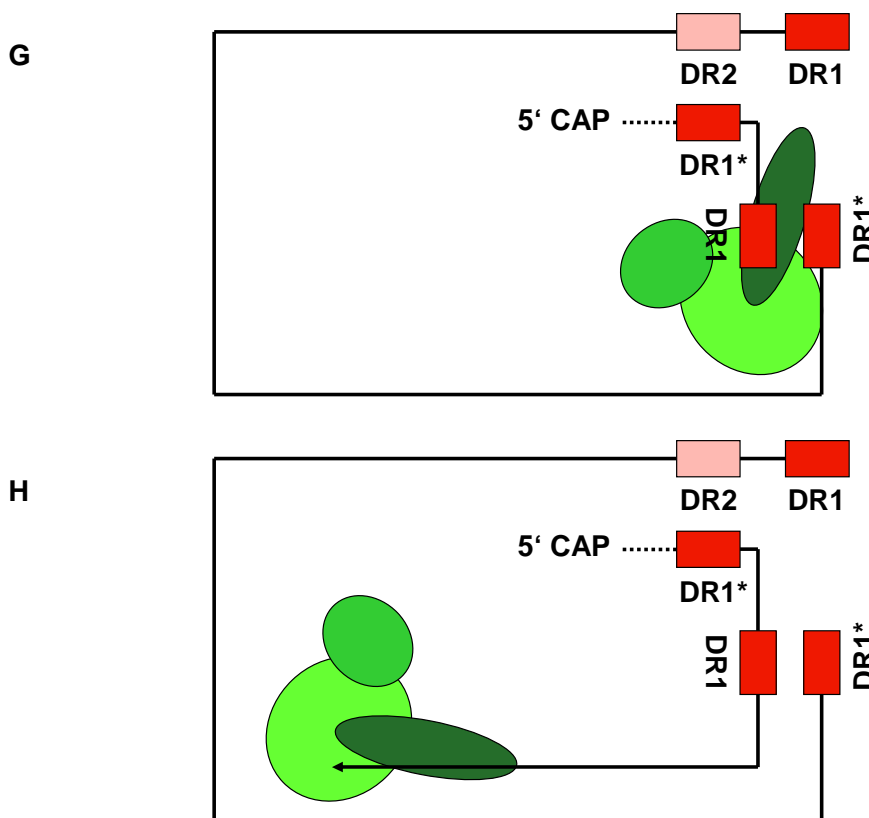


Abbildung 4: Reifung des HBV Genoms (modifiziert nach Kann and Gerlich, 2005)
 G: Anlagerung des 3' Ende des positiven Stranges mit dem 3' Ende des negativen Stranges
 H: Fortsetzung der positiv Strang Synthese

1.1.3.4 Verpackung und Sekretion

Nachdem sich die rcDNA innerhalb der Nucleocapside gebildet hat, werden diese im Prä-Golgi-Kompartiment in die viralen Oberflächenproteine verpackt oder alternativ zurück zum Nukleus transportiert. Zu Beginn der Infektion spielt wahrscheinlich hauptsächlich der zweite Weg eine Rolle. Zum einen sind noch nicht ausreichend Oberflächenproteine synthetisiert worden, zum anderen ist zu Beginn einer Infektion der Aufbau eines cccDNA Pools notwendig (Kann and Gerlich, 2005). Dies führt zu einer Amplifikation der DNA und etabliert die Infektion. Man schätzt dass sich in jeder infizierten Zelle zwischen 2 und 50 Kopien befinden. Nachdem genug Hüllproteine gebildet wurden, werden die Nucleocapside verpackt und als Virus sekretiert. Dies führt gleichzeitig zu einer Regulation der cccDNA Amplifikation (Summers et al., 1990). Um die Verpackung zu ermöglichen, interagiert die Oberfläche des Nucleocapsids mit der PreS1-Domäne des LHBs. Ob dies direkt geschieht oder noch andere Proteine involviert sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Für die PreS1-Domäne sind zwei Topologien beschrieben (Bruss et al., 1994). Man findet sie zum einen innerhalb des ER, was zu einer externen Lokalisation nach Bildung des Virus führt und bei der Infektion eine Rolle spielt. Zum anderen liegt sie in der zytosolischen Seite des ER, wo sie mit dem Nucleocapsid interagieren kann.

1.2 Proteinkinasen

In den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde bei Untersuchungen zu Synthese und Abbau von Glykogen in der Leber die Proteinphosphorylierung als Mechanismus zur Regulation zellulärer Vorgänge entdeckt (Fischer and Krebs, 1955; Sutherland and Wosilait, 1955). Vier Jahre danach konnte mit dem Enzym Phosphorylase Kinase die erste Proteinkinase beschrieben werden (Krebs et al., 1959). Es dauerte weitere 10 Jahre bis die cAMP abhängige Proteinkinase entdeckt wurde (Walsh et al., 1968). Heute weiß man, dass Proteinkinasen eine der größten bekannten Proteinfamilien sind. Ca. 3 % des menschlichen Genoms kodieren für eine Proteinkinase. Schätzungen gehen von über 1000 verschiedenen Kinasen aus. Sie können in der Zellmembran verankert oder auch frei im Zytosol vorkommen. Sie sind Überträger von Signalen innerhalb der Zellen und auch zwischen den Zellen. Sie greifen in wichtige Stoffwechselprozesse wie Zellwachstum, -Differenzierung, -Transformation und auch in die Apoptose regulierend ein.

Unterschieden werden zwei große Gruppen: die Serin/Threonin-Proteinkinasen und die Tyrosin-Proteinkinasen. Es gibt jedoch auch Proteinkinasen, welche alle 3 Hydroxyaminosäuren phosphorylieren können (Hunter et al., 1992).

Die Einteilung der Proteinkinasen erfolgt nach ihrer Aminosäuresequenz. Die Enzyme der Untergruppen haben meist eine ähnliche Vorliebe für bestimmte Zielsequenzen und werden auf ähnliche Weise reguliert.

1.2.1 Proteinkinase C

1.2.1.1 Struktur

Zu den Serin/Threonin Proteinkinasen gehört auch die Proteinkinase C Familie, für die bis jetzt 12 Isotypen beschrieben worden sind. Sie werden eingeteilt in Calcium abhängige c-Isotypen (α , β I, β II, γ ; auch klassische Isotypen genannt), neue n-Isotypen (δ , ϵ , η , θ) (Parekh et al., 2000) und atypische a-Isotypen (ζ , λ / τ mouse/human) sowie PKC μ (bei Mäusen als PKD bekannt) (Webb et al., 2000) und ein weiterer Subtyp PKC ν (Hayashi et al., 1999). Beide sind noch keiner Gruppe zugeteilt. Sie haben jedoch eine große Ähnlichkeit untereinander, so dass evtl. eine vierte Gruppe entstehen könnte. Für PKC μ ist bis jetzt beschrieben, dass sie Calcium unabhängig ist, aber durch Phorbolster aktiviert werden kann. Zusätzlich verfügt sie über zwei hydrophobe Domänen, die möglicherweise zur Bindung an Zellmembranen dienen. Im Weiteren wird jedoch nur näher auf den Aufbau und die Regulation, der schon länger bekannte Kinasen eingegangen.

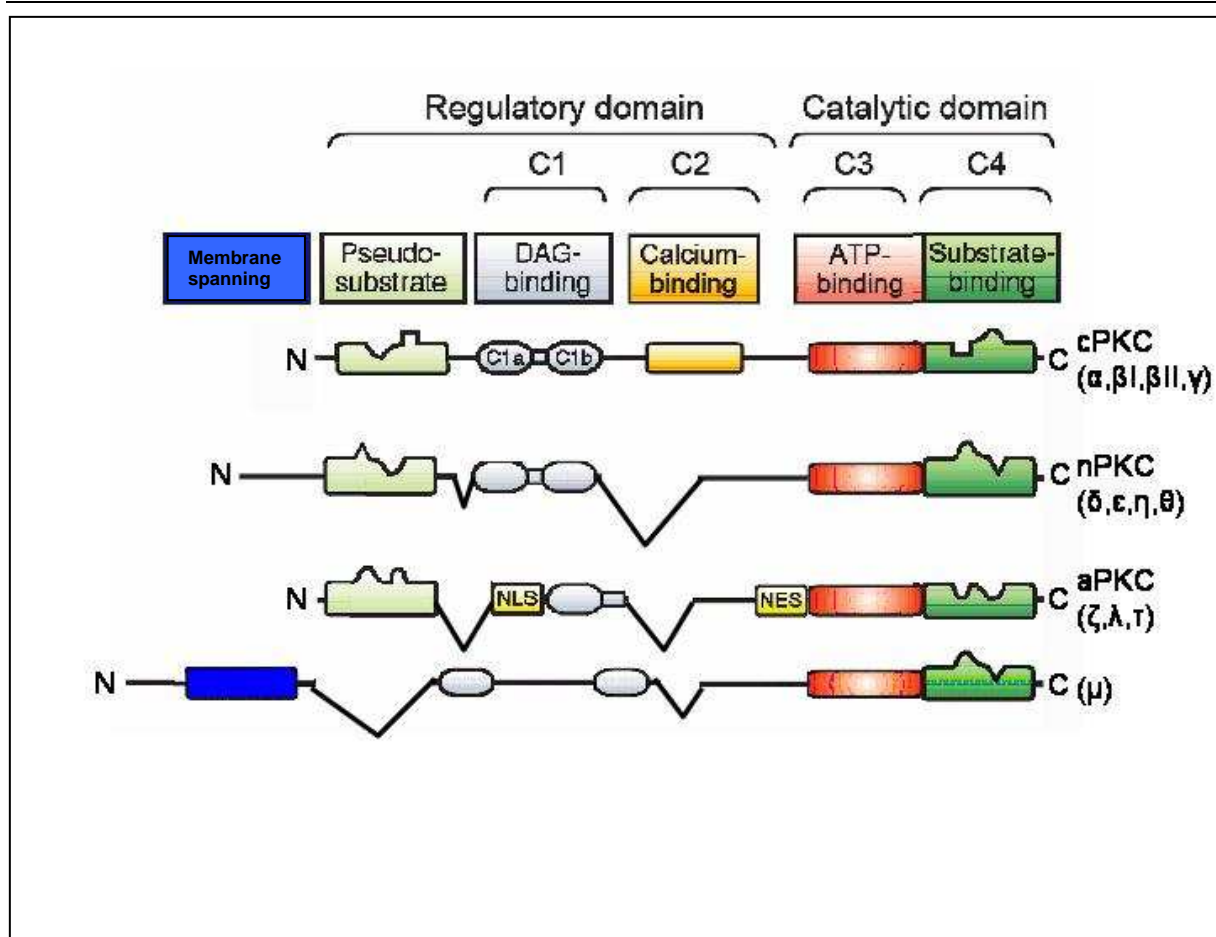


Abbildung 5: Aufbau der PKC-Isotypen (modifiziert nach Mochly-Rosen and Kauvar, 2000; Spitaler and Cantrell, 2004) cPKC: Calcium abhängige PKC Typen; nPKC: neue PKC Typen; aPKC: atypische PKC Typen; DAG: Diacylglycerol; NLS: nuclear localization signals; NES: nuclear export signals; weitere Abkürzungen sind im Text erläutert.

Im Aufbau zeigen alle Isotypen starke Ähnlichkeiten. Es findet sich bei allen eine aminoterminal gelegene regulatorische Region (ca. 20-40 kDa) und eine carboxyterminal gelegene katalytische Region (ca. 45 kDa). Es finden sich vier konservierte Domänen (C1-C4) (Coussens et al., 1986), die alle eine unterschiedliche Funktion übernehmen. Die Unterschiede zwischen den Isotypen kommen durch 5 variable Regionen zustande, welche zwischen den konservierten Domänen liegen. Die Domäne C1 (Abb. 5 grau) besitzt ein Cystein reiches Motiv, oftmals doppelt vorliegend, welches die Bindungsstelle für Diacylglycerol und Phorbol ester bildet (Bell and Burns, 1991). Direkt aminoterminal zur C1 Domäne findet man eine Pseudosubstratsequenz (Abb. 5 hellgrün) (House and Kemp, 1987). Die Ca^{2+} abhängigen Isotypen zeigen im Bereich der C2 Domäne (gelb) eine Ca^{2+} Bindungsstelle. Die neuen und atypischen Isotypen besitzen zwar ebenfalls eine C2 Domäne jedoch ohne eine Ca^{2+} Bindungsstelle (Sossin and Schwartz, 1993). Für die ATP-Bindung zeigt sich die C3 Domäne verantwortlich und die Substratbindungsstelle wird durch die Domäne C4 geformt (Taylor and Radzio-Andzelm, 1994). Zwischen der regulatorischen und katalytischen Einheit findet sich eine Region, die proteolytisch durch Calpain gespalten werden kann. Nach Spaltung liegt die katalytische Untereinheit als so genannte Protein

Kinase M vor und ist weiterhin in der Lage zu phosphorylieren. Die Regulation der Proteinkinase M erfolgt durch Proteolyse.

1.2.1.2 Regulation und Aktivierung

Die Regulierung und Aktivierung der Proteinkinasen C erfolgt über zwei nacheinanderfolgende Schritte, Phosphorylierung und Ligandenbindung. Nach der Bildung eines neuen Enzyms erfolgt zur vollständigen Reifung eine Phosphorylierung des Enzyms an drei konservierten Positionen, die sich an der katalytischen Domäne befinden. Die erste Phosphorylierung am so genannten activation-loop (Thr⁵⁰⁰ bei PKC-βII; (Orr and Newton, 1994)) erfolgt durch PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent kinase) (Dempsey et al., 2000). Die Phosphorylierung an dieser Stelle führt zu einer Autophosphorylierung an zwei weiteren Stellen der katalytischen Einheit (Thr⁶⁴¹ und Ser⁶⁶⁰ bei PKCβII; (Dutil et al., 1994)). In dieser Form verbleibt es als inaktives Enzym im Zytosol, da sein katalytisches Zentrum durch eine Pseudosubstratsequenz geblockt wird. Zur Aktivierung des Enzyms kommt es durch die Bindung von Diacylglycerol (oder Phorbolestern) und Phosphatidylserin an die Domäne C1, sowie eine Ca²⁺ abhängige Bindung (bei den cPKC) von anionischen Phospholipiden an die Domäne C2. Dies führt zu einer Membranbindung und zum Freiwerden des katalytischen Zentrums (Newton, 1995). Hierbei spielt jedoch die Bindung von Diacylglycerol eine der entscheidenden Rollen, die Bindung weiterer Liganden erhöht jedoch die Membranaffinität und Aktivität des Enzyms. In der Literatur wird jedoch auch eine Kofaktoren-unabhängige Phosphorylierung von Arginin-reichen Proteinen beschrieben (Leventhal and Bertics, 1993; Takai et al., 1979), da sie in der Lage sind das Pseudosubstrat aus dem katalytischen Zentrum zu verdrängen (Orr and Newton, 1994). Der Mechanismus diesbezüglich unterliegt noch weiteren Untersuchungen. Durch die Aktivierung kommt es zu einer Translokation des Enzyms zu einer bestimmten subzellulären Lokalisation, wo es von so genannten Receptors for activated C-Kinases (RACK) gebunden wird (Mochly-Rosen, 1995). Neben den unterschiedlichen Zielsequenzen ist auch die Lokalisation der Proteinkinase für ihre Funktion wichtig. Zum Beispiel assoziiert PKCβII mit fibrillären Strukturen in nicht stimulierten cardialen Myozyten, nach Aktivierung der Zellen erfolgt jedoch eine Translokation zum Perinukleus und in die Zellperipherie. In denselben Zellen ist inaktive PKCε zunächst im Bereich des Nukleus und Perinukleus zu finden und wird nach Stimulation der Zelle in Regionen mit Zell-Zell-Kontakt transloziert (Disatnik et al., 1994; Mochly-Rosen et al., 1990).

1.2.1.3 Verteilung der Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben

Die Verteilung der PKC-Isoformen zeigt erhebliche Unterschiede. Einige wie z.B. PKC α kommen ubiquitär vor, andere wie z.B. PKC γ zeigen eine hohe Zellspezifität. In Leberzellen finden sich fast alle Isoformen, ausgenommen PKC γ , jedoch liegen für PKC η , PKC μ und PKC ν nur wenige Daten vor.

Tabelle 2: Verteilung der PKC-Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben (modifiziert nach Webb et al., 2000)

Zellen/Gewebe	α	β I	β II	γ	δ	ϵ	η	θ	ζ	τ	μ	ν
Leber	+	+	+	-	+	+	?	+	+	+	?	?
Niere	+	+	+	-	+	+	?	?	+	?	+	?
Milz	+	+	+	-	+	+	+	?	?	+	?	?
Lunge	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	?
ZNS*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?
Herz	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	?	?
Neutrophile Granulozyten	+	+	+	-	+	?	?	?	+	?	?	?
T-Zellen	+	+	+	-	+	+	+	?	+	?	?	?
B-Zellen	+	+	+	-	+	+	+	?	+	?	?	?
Dünndarm	+	?	?	-	+	?	?	?	?	+	?	?

Legende: *ZNS: Zentrales Nervensystem, + : Protein oder mRNA nachgewiesen, - : Isoform nicht vorhanden, ? : Vorkommen bisher nicht nachgewiesen.

1.3 HBV und Proteinkinasen

Für das Hepatitis B Virus wurde das erste Mal im Jahre 1980 von Albin und Robinson eine Proteinkinaseaktivität beschrieben, die zwei Jahre später auch von Gerlich et al. (Albin and Robinson, 1980; Gerlich et al., 1982) in Capsiden, die aus HBV-infizierter Leber aufgearbeitet worden waren, beobachtet wurde. Diese Aktivität phosphorylierte das HBV Core-Protein an Serinresten. Als verantwortlich für die Core-Protein-Phosphorylierung wurden bislang folgende Proteinkinasen in der Literatur beschrieben: Eine GAPD-Proteinkinase, welche Core-Partikel, die aus HBV infizierter menschlicher Leber gewonnen wurden, phosphorylierte (Duclos Vallee et al., 1998) und eine so genannte Core-assoziierte-Serin-Kinase (CAK) wurde in intrazellulären Core-Partikeln und extrazellulären Virionen identifiziert (Kau and Ting, 1998). Die Viren bzw. Capside in diesen Untersuchungen wurden aus HuH-7 Zellen bzw. deren Überstand isoliert. Die Zellen waren vorher mit dem HBV Genom-tragenden Plasmid pHBV3,6 transfiziert worden. In Core-Partikeln aus HBV infizierter menschlicher Leber wurde die Verpackung einer Proteinkinase C nachgewiesen (Kann and Gerlich, 1994; Kann et al., 1993). Weiterhin wurde eine SRPK-1 und SRPK-2 Kinase für eine intrazelluläre Phosphorylierung von Core-Proteinen beschrieben (Daub et al., 2002), ohne dass deren Aktivität in assemblierten Capsiden oder Virionen gezeigt wurde.

1.4 Ansätze und Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Proteinkinase im Hepatitis-B-Virus zu charakterisieren und deren Auswirkungen auf den Lebenszyklus des Virus zu erforschen. Unter der Annahme, dass in der Tat eine Form der Proteinkinase C für die Phosphorylierung des Core-Protein verantwortlich ist (Kann et al., 1993), wurden Versuche mit Proteinkinase C Inhibitoren durchgeführt. Diese Inhibitoren unterscheiden sich durch ihre Angriffspunkte, sowie in ihrer Substratspezifität und sollten so ggf. die in Frage kommenden Isotypen der Proteinkinase C erkennen. Da es auch möglich ist, dass die unterschiedlichen publizierten Ergebnisse bezüglich der verpackten Proteinkinase auf den unterschiedlichen Ursprung der Core-Partikel Zellkultur oder Serum – zurückzuführen sind, wurden sowohl Versuche mit aus Plasma aufgereinigten Viren (bzw. Capsiden) und aus Zellkultur gewonnenen Viren (bzw. Capside) untersucht. Da die Phosphorylierung des Core-Proteins in dem Lebenszyklus des Virus mit der Genomverpackung und -reifung eng verknüpft ist, war eine Fragestellung dieser Arbeit, ob eine Inhibition der Proteinkinase eine Veränderung im Lebenszyklus des Virus bewirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose (SEAKEM)	BIOZYM, Oldendorf
Ammoniumpersulfat	SERVA, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	ROTH, Karlsruhe
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	ROTH, Karlsruhe
Dithiothreitol	SIGMA, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat	SIGMA, Deisenhofen
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraaceticacid	SIGMA, Deisenhofen
Fötales Kälberserum	PANSYSTEMS, Aidenbach
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Radiochemikalien	AMERSHAM, Braunschweig
Magermilchpulver	UELZENA, Uelzen
Nonidet P-40	FLUKA, Buchs
TEMED	SERVA, Heidelberg
Tris-Acetat	ROTH, Karlsruhe
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
Ziegenserum	DIANOVA, Hamburg

Alle Chemikalien, Salze und organischen Lösungsmittel wurden, soweit im Text nicht anders vermerkt, in der Qualität "reinst" oder "pro analysi" von MERCK, Darmstadt bezogen.

2.1.2 Enzyme

Nukleasen (DNase (10 U/ μ l), RNase A (1 U/ μ l))	BOEHRINGER, Mannheim
Proteinase K	ROCHE, Mannheim
Proteinkinase C Inhibitoren (Ro-32-0432, Peptid 19-27, Gö-6976, Calphostin C, Chelerythrine Chloride)	CALBIOCHEM/MERCK, Darmstadt

2.1.3 Antikörper

Esel Anti-Kaninchen-Antikörper, vom Esel POD konjugiert	DIANOVA, Hamburg
Kaninchen Anti-Core-Antikörper	DAKO, Hamburg
Tosylactivate Dynabeads M-250	DYNAL, Hamburg
Monoklonaler Anti-HBs Antikörper (H166)	ABBOTT, Illinois, U.S.A.
Maus Anti-Kernporen-Antikörper (mAb414)	BABCO, Richmond, U.S.A.
Anti-Kaninchen-Antikörper von der Ziege, FITC konjugiert	DIANOVA, Hamburg
Ziege Anti-Maus- Antikörper, Texas Red konjugiert	DIANOVA, Hamburg

2.1.4 Molekulargewichtsmarker

Rainbow Marker high	AMERSHAM PHARMACIA, Freiburg
---------------------	------------------------------

2.1.5 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage (Ionenaustauscher, MILLIPORE, Eschborn) des Institutes angesetzt.

Acrylamid-Lösung	30 %	Acrylamid
	0,8 %	
Agarose-Probenpuffer (6x)	50 % (w/v)	Saccharose (SIGMA, Deisenhofen)
	1 % (w/v)	SDS
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	6x	TAE
Agarose-Laufpuffer (TAE pH 7,8)	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA

ECL-Substratlösung	Zur Verdrängung des Luftsauerstoffs wurden 225 ml H ₂ O mit 25 ml 1M Tris-HCl pH 8,5 unter Rühren mehrfach mit Flüssigstickstoff versetzt und 1.250 µl 500 mM 3-Amino-Phtalhydrazid (ad 25 mM, SIGMA, Deisenhofen)/DMSO (frische Lösung mit Stickstoff begast und aliquotiert bei -20°C gelagert), sowie 55 µl 180 mM 4-Hydroxymzimtsäure (ad 3,7 mM, SIGMA, Deisenhofen)/DMSO tropfenweise hinzugegeben. 30 min vor Gebrauch wurde 1:10.000 18,3 % H ₂ O ₂ (ad 0,0018 % (v/v)) zugesetzt.	
ELISA-Beschichtungspuffer	50 mM	Natriumcarbonatpuffer pH 9,6
ELISA-Substratlösung	2 mM	o-Phenylendiamindihydrochlorid
	4 mM	Harnstoffwasserstoffperoxid
	50 mM	Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,0
Moviol	2,4 g	Moviol (HOECHST, Frankfurt) in
	6,0 g	Glycerin lösen,
	12 ml	200 mM Tris-Puffer pH 8,5 dazugeben und bei 50°C inkubieren.
PAGE-Laufpuffer 10x	250 mM	Tris-HCl pH 8,3 (ROTH, Karlsruhe)
	1920 mM	Glycin
	1 %	SDS
PAGE-Probenpuffer 2x	125 mM	Tris-HCl pH 6,8 (ROTH, Karlsruhe)
	6 %	SDS
	6 %	Glycerin
	1 %	Bromphenolblau
	10 %	DTT
vor Gebrauch zugesetzt:	10 %	β-Mercaptoethanol
PAGE-Sammelgelpuffer 4x	0,5 M	Tris-HCl pH 6,8 (ROTH, Karlsruhe)
	0,1 %	SDS

PAGE-Trenngelpuffer 4x	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8 (ROTH, Karlsruhe)
	0,1 %	SDS
PAGE-Transferpuffer 1x	25 mM	Tris-Base (ROTH, Karlsruhe)
	192 mM	Glycin
	15 %	Methanol
PBS pH 7,4	171,0 mM	NaCl (ROTH, Karlsruhe)
	3,4 mM	KCl
	10,0 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,9 mM	KH ₂ PO ₄
Proteinkinase C-Puffer 2x	40 mM	Tris-HCl pH 7,5
	20 mM	MgCl ₂
	2 mM	CaCl ₂
	0,5 %	BSA
	0,75 %	NP40
SSC-Puffer 20x	3 M	NaCl (ROTH, Karlsruhe)
	0,3 M	Natriumcitrat
	in 800 ml	dH ₂ O
		pH mit 10 M NaOH auf 7,0 einstellen
	mit dH ₂ O	auf 1l auffüllen
TAE-Puffer pH 7,8	40 mM	Tris-Acetat pH 7,8 (ROTH, Karlsruhe)
	1 mM	EDTA pH 8,0
TN-Puffer pH 8,0	10 mM	Tris-HCl pH 8,0 (ROTH, Karlsruhe)
	100 mM	NaCl (ROTH, Karlsruhe)
TNE-Puffer pH 8,0	10 mM	Tris-HCl pH 8,0 (ROTH, Karlsruhe)
	100 mM	NaCl (ROTH, Karlsruhe)
	1 mM	EDTA

DMEM High Glucose Pulverform		(GIBCO/BRL, Karlsruhe)
	3,7 g/l	NaHCO ₃
	mit d H ₂ O	auf 9l auffüllen und sterilfiltrieren
	mit CO ₂	auf pH 7,0 einstellen
vor Gebrauch zugesetzt:	ad 10 % (v/v)	FKS
Einfrriermedium	60 %	DMEM High Glucose
	20 %	FKS
	20 %	DMSO

2.1.6 Zelllinien

HepG2.2.15

(Sells et al., 1987)

Hep G2 Zellen, eine Hepatoblastomzelllinie, die stabil mit einem Plasmid (pDoI₁HBV-1, enthält head-to-head Dimere des HBV Genoms, subtyp ayw) des HBV-Genoms, transfiziert und immortalisiert wurde. DNA Analysen haben ergeben, dass sich ca. 8 Kopien des HBV Genoms pro Zelle nachweisen lassen. Die Zellen sezernieren virale Partikel, die nach Injektion bei Schimpansen eine akute Hepatitis auslösen (Acs et al., 1987)

HuH-7

(Nakabayashi et al., 1982)

Aus dem Biopsat eines gut differenzierten hepatozellulärem Karzinom eines 57 jährigen Japaners angelegte Zelllinie.

2.2 Methoden

2.2.1 Eukaryonte Zellkultur

Die verwendeten eukaryonten Zellen wurden in Flüssigstickstoff bei -175°C in 1,8 ml Kryogefäßen der Firma NALGENE (FISHER-SCIENTIFIC, Nidderau) gelagert. Die Arbeiten mit eukaryonten Zellen erfolgte unter einer Sterilbank (LaminAir HB 2448, HERAEUS, Hanau). Aufgetaut wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium. Das Entfernen des Einfriermediums erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei $800 \times g$ in der Zentrifuge CR 422 (Firma Jouan). Die Zellen wurden dann in DMEM-Medium/10 % FKS resuspendiert und auf 15 cm Maxischalen (FALCON, FISHER-SCIENTIFIC, Nidderau) bei 37°C , einem CO_2 -Gehalt von 5 % und 90 % relativer Luftfeuchte im Brutschrank angezogen. Ein Mediumwechsel erfolgte im Mittel alle 2 Tage. Nach Ausbildung eines Monolayers mit ca. 90 % Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann durch Inkubation mit 1x Trypsin-EDTA/PBS-Lösung bei 37°C für 5 Minuten abgelöst und anschließend in DMEM-Medium/10 % FKS suspendiert. Diese Ansätze wurden auf zwei neue Zellkulturplatten verteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Tropfen der Zellsuspension nach dem Ablösen auf das Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Unter einem Mikroskop wurden dann einige der kleinen Quadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit der Gesamtzahl der Quadrate (25) multipliziert und diese Zahl dann mit 10^4 multipliziert. Das Ergebnis entspricht dann der Zellzahl pro Milliliter

2.2.2 Proteinkinase C Inhibition in HepG2.2.15 Zellen

Für die Versuche wurden Zellen einer Maxi-Zellkulturschale (Durchmesser 15 cm) verwendet. Abgelöst wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben und auf kollagenisierte 6 Loch-Platten (FALCON, FISHER-SCIENTIFIC, Nidderau) in insgesamt 20 Wells verteilt. Dies entspricht ca. 1×10^6 Zellen pro Well. Die Zellen wurden mit jeweils 2 ml DMEM-Medium/2 % FKS über Nacht inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium mit FKS abgezogen und 2 ml Medium ohne FKS mit dem jeweiligen Inhibitor zugesetzt. Verwendet wurden die zellpermeablen Proteinkinase C Inhibitoren Ro-32-0432 und PKC-Inhibitor Peptid 19-27. Pro Inhibitor wurden 6 Wells verwendet und die Inhibitoren ausgehend von der doppelten IC_{50} entsprechenden Konzentration, jeweils um die Hälfte insgesamt 5-mal weiter verdünnt. Für Bisindolylmaleimide entspricht eine 10 nM Konzentration der IC_{50} , für Ro-32-0432 9 nM und für das Peptid 19-27 8 μM . Als Kontrolle wurden 2 Wells nur mit Medium ohne FKS und Inhibitoren inkubiert. Die Zellen wurden jeden Tag photographiert und danach aus jedem Well 900 μl abgezogen und die 1,1 fache Menge an Medium mit dem Inhibitor in der entsprechenden Verdünnungsstufe neu hinzugefügt. Die entnommenen

Proben wurden für 10 min bei 2000 x g (Zentrifuge 5417 R, EPPENDORF, Hamburg) zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert. Am 5.Tag wurde das restliche Medium abgezogen für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden geerntet, in dem pro Well 1 ml PBS zugefügt wurde und dann mit einem sterilem Zellschaber (COSTAR, Fernwald) von den Zellkulturschalen gekratzt wurden. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml EPPENDORF-Gefäß überführt und bei 2000 x g für 10 min bei 4°C pelletiert (Zentrifuge 5417 R, EPPENDORF, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei -20°C gelagert.

2.2.3 Endogene Proteinkinase Reaktion mit Zellkulturüberstand aus HepG2.2.15 Zellen

Zum Nachweis einer endogenen Proteinkinase C in den Core-Partikeln wurde zunächst der Zellkulturüberstand, der wie unter 2.2.2 beschrieben gewonnen wurde, mit 0,3 % (v/v) β -Mercaptoethanol und 1 % (v/v) NP40 im Endvolumen für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert, um die HBs-Hülle der Virionen abzulösen (modifiziert nach (Kaplan et al., 1973)). Sollte eine Inhibition der Phosphorylierung erfolgen, wurden die Proben vor der Zugabe von ATP mit dem jeweiligen Proteinkinase C Inhibitor für 1-3 Stunden präinkubiert. Den Proben wurde dann 40 μ Ci [γ ³²P]ATP (800 Ci/mmol) zugesetzt und diese mit Proteinkinase C Puffer für - je nach Experiment - verschiedenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte eine Immunpräzipitation mit an Dynabeads gekoppelten Anti-Core Antikörpern (Herstellung wird unter 2.2.5 beschrieben) ebenfalls über Nacht bei 4°C. Diese Reaktion erfolgte in nicht-silikonisierten Eppendorf-Gefäßen, welche auf einem Schüttler geschwenkt wurden. Die Trennung der Dynabeads erfolgte durch magnetische Anlagerung an das Eppendorf-Gefäß und Verwerfung des Überstandes in entsprechende Gefäße für Radioaktivmüll. Die Dynabeads wurden hiernach resuspendiert in 500 μ l PBS und wieder an das Eppendorf-Gefäß magnetisch angelagert. Nun erfolgte die Resuspension in 500 μ l PBS/0,1 % Tween 20. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt 3 Mal wiederholt und die Dynabeads danach in 10 μ l PBS aufgenommen. Die Probe wurde dann für 10 min bei 100°C mit 10 μ l 2 x Samplebuffer denaturiert und für 2 min in einer Tischzentrifuge (Zentrifuge 5417 R, EPPENDORF, Hamburg) zentrifugiert. Zur Auftrennung der Coreproteine wurde der Überstand einer SDS-Page mit 15 prozentigem Laufgel unterzogen. Die weitere Auswertung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben.

2.2.4 Darstellung ³²P markierter Coreproteine

Nach Auftrennung der Proben im SDS Gel wurde das Gel für 30 min bei Raumtemperatur in 20 % Ethanol/10 % Glycerin geschwenkt. Pro Gel wurden zwei Blatt Cellophan (ROTH, Karlsruhe) in H₂O eingeweicht. Danach wurde das Gel zwischen zwei Cellophan-Blättern luftfrei in einem Geltrocknungsrahmen eingespannt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Auswertung wurde das Gel in einer Röntgenkassette an einem Phosphoimager-Screen exponiert. Die Expositionszeit betrug minimal 2 Stunden und maximal 48 Stunden, abhängig von der Effizienz der Markierung. Der Phosphoimager-Screen wurde am Phosphoimager (FUJI, Japan) als Datei eingelesen (Software: PC-BAS-READER 2.09, RAYTEST, Straubenhardt), gespeichert und mit der Bildverarbeitungssoftware TINA (Version 2.09f, RAYTEST, Straubenhardt) dargestellt und quantifiziert. Die Banden wurden in einheitlichen Flächen eingegrenzt und das gemessene Signal (angegeben in PSL, Phosphor Stimulated Luminescence) wiedergegeben. Zusätzlich wurde eine entsprechend große Fläche, welche den Hintergrund (=background, bkg) wiedergibt, eingegrenzt und vom Signal der jeweiligen Bande subtrahiert. Der so errechnete Wert stellt die Menge der gemessenen Radioaktivität dar. Um eine einfachere Vergleichbarkeit der so gewonnenen Daten bei den Inhibitionsversuchen zu erhalten, wurde in der Regel dem Wert für die Positivkontrolle 100 % zugeordnet und die prozentualen Werte der anderen Ansätze errechnet.

2.2.5 Konjugation von Antikörpern an Dynabeads

Verwendet wurden tosylactivated Dynabeads M-250, um diese durch Konjugation mit Anti-Core Antikörpern und Anti-HBs Antikörpern zur Immunpräzipitation zu verwenden. Es wurden 1mg/100 µl beads eingesetzt, dies entspricht einer Anzahl von ca. 6×10^7 beads/100 µl. 10^7 beads wurden mit 3 µg Antikörper inkubiert. Zunächst wurden 100 µl beads in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und nach magnetischer Anlagerung der beads an die Wand des Gefäßes der Überstand entfernt und die beads zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Es erfolgte nun eine Resuspension in 100 µl PBS und die Zugabe der Antikörper, entweder Anti-Core oder Anti-HBs Antikörper. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Waren die beads mit Anti-Core inkubiert worden, wurden diese nun zunächst mit 500 µl PBS, dann mit 500 µl PBS/0,1 % Tween 20 und noch einmal mit PBS gewaschen und wieder in 100 µl PBS aufgenommen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Nach Inkubation mit Anti-HBs Antikörper wurden die beads zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und dann in 100 µl 0,2 M Tris (pH 8,5) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Hiernach wurde der Waschvorgang mit zweimal PBS wiederholt und die beads in 100 µl PBS

bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch für die endogenen Proteinkinase Versuche wurden die beads in Proteinkinase Puffer gewaschen und in Proteinkinase Puffer resuspendiert.

2.2.6 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15 Zellen

Die HepG2.2.15 Zellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben gewonnen. Zur Isolierung der Core-Partikel wurde das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und 0,1 % NP-40 (v/v) hinzugefügt und die Zellen mit Ultraschall (3 x 15 s, Sonoplus UW 70/HD 70, BANDELIN, Berlin) auf Eis aufgebrochen. Hiernach erfolgte eine Inkubation über 15 min bei 37°C der Probe mit 20 U/ml DNase I und 20 µg/ml RNase A in Gegenwart von 15 mM MgCl₂, um die vollständige Lyse und Degradation zellulärer Nukleinsäuren zu gewährleisten. Zur Abtrennung zellulärer Fragmente vom Rohlysate wurde eine Zentrifugation mit 16.000 x g über 20 min bei 4°C durchgeführt (Biofuge 15 R, HERAEUS, Hanau). Der Überstand mit den darin enthaltenen Core-Partikeln wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von nativen Core-Partikeln wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Benutzt wurde 1 % ige Agarose (SEAKEM, FMC BIOZYM, Oldendorf), die nach dem Aufkochen in 80 ml 1 x TAE in der Mikrowelle, in den Gelschlitzen einer horizontalen Elektrophoresekammer (Horizon 11-14 Gelapparatur, GIBCO/BRL, Eggenstein) gegossen wurde. Um Taschen zur Probenbefüllung auszusparen wurde ein Teflonkamm in die flüssige Agarose gesteckt und nach dem Erstarren vorsichtig entfernt und das Gel mit 1 x TAE überschichtet. Die Proben wurden mit 6 x Agarose-Probenpuffer ad 1 x gemischt und in die Taschen eingefüllt. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung von 10 V/cm.

2.2.8 Immunblot

Zum Nachweis nativer Core-Partikel wurden diese zunächst in einem 1 % igen Agarosegel mit Probenpuffer ohne SDS aufgetrennt. Danach erfolgte ein wie von Southern (1975) beschriebener Saug- oder Kapillarblot in 10 x SSC über Nacht, um die Core-Partikel auf eine PVDF Membran (MILLIPORE, Eschborn) zu transferieren. Die Membran wurde zunächst 5 min bei Raumtemperatur in Methanol inkubiert und danach im Blotpuffer getränkt. Zur Absättigung der Membran wurde diese nach dem Proteintransfer für eine Stunde mit 5 % (w/v) Magermilchpulver/PBS inkubiert. Danach wurde der 1. Antikörper Anti-Core 1:5000 in 5 % Magermilchpulver/PBS hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schwenken für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran 6 x 5 min in PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen und nun der zweite Antikörper, Peroxidase-markierter Anti-Kaninchen Antikörper 1:2000 in 5 % Magermilchpulver/PBS zugegeben. Nach einer Stunde

wurde die Membran wie oben 6 x gewaschen und mit ECL Substratlösung 1 min inkubiert. Die Bindung der Peroxidase-markierten Antikörper kann so durch Chemilumineszenz nachgewiesen werden, in dem man den Blot auf einem Röntgenfilm legt und diese entwickelt. Um eine Quantifizierung der eingesetzten Proben vornehmen zu können wurde eine Verdünnungsreihe rekombinanter Core-Partikel verwendet.

2.2.9 Aufreinigung von viraler DNA aus Zellkulturüberstand von HepG2.2.15 Zellen

Sämtliche Puffer und Materialien zur DNA-Aufreinigung wurden von ROCHE (Mannheim) bezogen (High Pure Viral Nucleic Acid Kit). Das Prinzip der DNA-Isolation beruht auf einer Bindung der DNA an Glasfaser-Membranen. Die Arbeiten wurden in einem templatefreien Raum mit templatefreien Pipetten durchgeführt.

Es wurde Zellkulturüberstand von HepG2.2.15 Zellen verwendet, der wie unter 2.2.2 beschrieben gewonnen wurden. Zunächst wurden 160 µl Zellkulturüberstand mit 40 µl MgCl₂ und 20 µl DNase für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um zelluläre Nukleinsäuren zu entfernen. Danach wurde die Temperatur für 10 Minuten auf 85°C erhöht. Die Probe wurde in 1,5 ml fassende silikonisierte Eppendorf-Gefäße gefüllt und 200 µl Bindepuffer (6 M Guanidinium-HCl, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100 (w/v), pH 4.4 (25°C)), dem vor Gebrauch Poly A beigefügt wird, hinzugefügt. Es erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 10 min in Gegenwart von 40 µl Proteinase K. Die Reaktion wurde mit 100 µl Isopropanol gestoppt. Um die DNA aus diesen Proben zu extrahieren, wurden diese auf die Säule des Extraktionskits pipettiert. Die Säule enthält Glasfasern, an denen die DNA bindet. Zur Entfernung der zellulären Bestandteile folgte zunächst eine Zentrifugation für 1 min bei 4500 x g (Zentrifuge 5417 C, EPPENDORF, Hamburg). Der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden 500 µl Removal Puffer (5 M Guanidinium-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25°C), Konzentration nach Zugabe von 20 ml Ethanol) hinzugefügt und wie oben zentrifugiert. Danach folgte dieselbe Prozedur zweimal mit Waschpuffer (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C), Konzentration nach Zugabe von 40 ml Ethanol). Nach jeder Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und die Säule auf ein neues Gefäß gesetzt. Um die Puffer vollständig zu entfernen erfolgte eine Zentrifugation für 10 Sekunden bei 11.000 x g. Die Säule wurde nun auf ein silikonisiertes Eppendorf-Gefäß gesetzt und 50 µl Elutionspuffer (Nuclease freies, doppelt destilliertes, reinst H₂O) hinzu gegeben und 1 min bei 4500 x g zentrifugiert, um die virale DNA aus der Säule zu lösen.

Ein typisches Arbeitsprotokoll sah wie folgt aus:

Fast Start Master Mix:	2,4 µl (4 mM)	MgCl ₂
	1 µl (10 pmol/µl)	HBV X2 sense
	1 µl (10 pmol/µl)	HBV X2 antisense
	0,5 µl (4 pmol)	HBV 3,FL
	0,5 µl (4 pmol)	HBV 5,LC
	2 µl	Fast Start Taq
bei 5 µl Probe/15 µl Master Mix	7,6 µl	H ₂ O
bei 10 µl Probe/10 µl Master Mix	2,6 µl	H ₂ O

Der Fast Start Master Mix (LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit, ROCHE, Mannheim), danach die Proben bzw. Standards wurden in die dafür vorgesehenen Glaskapillaren pipettiert und verschlossen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Sekunden bei 2000 x g. Danach wurden die Glaskapillaren in das Lightcycler-Gerät eingesetzt und das Programm (Software LC Run Version 3.39) gestartet. Das Protokoll sah wie folgt aus:

1. Denaturierung Hot Start: 1 Zyklus, Temperatur 95°C für 10 min, Aktivierung der Fast Start Taq
2. Amplifikation Hot Start 45 Zyklen,
Denaturierung: Temperatur 95°C für 10 s
Annealing: Temperatur 64°C für 8 s
Elongation: Temperatur 72°C für 13 s
3. Kühlen: 1 Zyklus, Temperatur 40°C für 20 s

Die Auswertung der Proben erfolgte ebenfalls mit der Lightcycler Software. Die so gewonnenen Informationen über den Gehalt an Genomäquivalenten in den verschiedenen Proben wurde als Grundlage für die Inhibitionsversuche benutzt um möglichst gleiche Mengen an Core-Partikeln einzusetzen.

2.2.11 Nachweis von HBe und HBs Antigen im Zellkulturüberstand mittels ELISA

Zum Nachweis von HBs- und HBe-Antigen wurden die automatischen ELISA's der Firma ABBOTT (Axsym) genutzt.

2.2.12 Isolierung von Hepatitis B Viren aus Plasma

Verwendet wurden zwei HBV haltige Plasmen von 2 verschiedenen Spendern, die beide chronische asymptomatische Hepatitis B Virusträger sind (Genotyp D und C). Durch Gradientendichtezentrifugation wurden aus den HBV haltigen Plasmen Viren isoliert. Die

Isolation der Viren erfolgte durch Dr. Dieter Glebe. Er verwendete eine Weiterentwicklung der Zentrifugationsschritte früherer Methoden (Gerlich and Thomssen, 1975; Glebe and Gerlich, 2004). Die Plasmen waren vor der Verwendung mehrere Jahre bei -70°C gelagert worden.

2.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Größenbestimmung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gele im diskontinuierlichem Puffersystem nach (Laemmli, 1970). Es wurden 15 % ige Trenn- und 5 % ige Sammelgele verwendet. Für die Gelelektrophorese wurde eine "Tall Mighty Small" Apparatur (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS, San Francisco, USA) verwendet. Die Gele hatten eine Größe von 8 x 11 cm und eine Dicke von 1 mm. Die Trenn- und Sammelgele wurden nach folgenden Angaben hergestellt:

Tabelle 3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

	15 % Trenngel:	5 % Sammelgel:
Acrylamidlösung	25 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer 4 x	12,5 ml	
Sammelgelpuffer 4 x		3,8 ml
H ₂ O	12,5 ml	8,7 ml
APS	240 µl	75 µl
TEMED	41 µl	15 µl
1 % Bromphenolblau		15 µl

Sowohl die Trenn- als auch die Sammelgellösung wurden vor der Zugabe der Polymerisationsstarter TEMED und APS entgast, da der Luftsauerstoff die Polymerisation stört. Zum Abschluss vor Luftsauerstoff wurden die Trenngele, nach dem sie gegossen waren, mit 20 % Methanol überschichtet. Dieser wurde nach der Polymerisation wieder entfernt und die Sammelgellösung aufgefüllt. Um die Taschen (Spuren/Slots) zur Einfüllung der Proben zu formen wurden so genannte Spacer eingesetzt, die je nach Dicke ein Probenvolumen von 20-30 µl erlaubten. Die jeweiligen Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer vermischt, für 10 min bei 100°C denaturiert, für 2 min zentrifugiert und dann in die Taschen des Sammelgels eingefüllt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben wurde mit 20-40 mA durchgeführt.

2.2.14 Endogene Proteinkinase Reaktion mit aus Plasma isolierten Hepatitis B Viren

Die wie unter 2.2.12 isolierten Viren des Genotyp C und D wurden für die Versuche eingesetzt. Zunächst erfolgte eine Inkubation der Viren 5 µl ($1-2 \times 10^8$) mit 2,5 µl (25 µCi) [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP in Gegenwart von 10 µl 2 x Proteinkinase C Puffer für mindestens 12 Stunden bei 37°C. Sollte die Phosphorylierung inhibiert werden, wurden den Ansätzen vor der Zugabe von [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP die Inhibitoren zugesetzt und für 1-3 h präinkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Probenpuffer abgestoppt und für 10 Minuten auf 100°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte in einem 15 % SDS Gel. Um die Menge an eingesetztem Virus zu reduzieren und um eine besser quantifizierbare Darstellung der Banden zu erreichen wurde diese Methode optimiert. Um die Virushülle zu entfernen, wurden die Viren (5 µl 5×10^7) mit 1 % NP-40 und 0,3 % β -Mercaptoethanol (modifiziert nach Kaplan et. al., 1973) für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Sollte eine Inhibition der Phosphorylierung erfolgen, wurden die Proben vor der Zugabe von [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP mit dem jeweiligem Proteinkinase C Inhibitor für 1 - 3 Stunden präinkubiert.

Es folgte die Phosphorylierung, indem 4 µl (40 µCi) [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP pro Versuchsansatz zugefügt wurde und in Gegenwart von 15 µl 2 x Proteinkinase C Puffer über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Danach erfolgte eine Immunpräzipitation mit an Dynabeads gekoppeltem Anti-Core Antikörper, welche wie unter 2.2.5 beschrieben hergestellt wurde. Pro Versuchsansatz wurden 10 µl Dynabeads eingesetzt und der Ansatz mit PBS auf 500µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Während allen Inkubationszeiten wurden die Proben geschüttelt. Um Verunreinigungen zu entfernen, folgten nun mehrere Waschschrte. Es erfolgte eine magnetische Kopplung der Dynabeads, welche nun die Core-Partikel gebunden hatten, an die Wand der Eppendorf-Gefäße. Der Überstand wurde in den dafür vorgesehenen Behälter für flüssigen radioaktiven Müll entsorgt und die beads nun im Wechsel mit PBS bzw. PBS/0,1% Tween 20 gewaschen. Nach Abschluss dieses Vorgangs wurden die beads in 10 µl PBS resuspendiert und 10 µl 2 x Probenpuffer hinzugefügt. Das Ganze wurde bei 100°C für 10 min denaturiert, kurz abzentrifugiert und in einem 15 % SDS Page aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben.

2.2.15 Proteinkinase C Inhibition in mit HBV-Wildtyp-Genom transfizierten HuH-7 Zellen

HuH-7 Zellen wurden in DMEM-Medium + 5 % FKS auf runden Deckgläschen (Durchmesser: 12 mm; MAGV, Rabenau-Lohndorf) in einer 24-Well-Zellkulturschale kultiviert. Zuvor waren die Deckgläschen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Kollagen (1 mg/ml in 0,1 % Essigsäure) beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen worden.

Diese Zellen wurden mit in mehreren Ansätzen mit einem Wildtyp-HBV Genom (Isolat 991) transfiziert. Das Genom war zuvor durch einen Restriktionsverdau mit EcoR I linearisiert worden. Von Anderen (Will et al., 1987) war gezeigt worden, dass derartig linearisierte HBV Genome nach Transfektion zirkularisieren und die Expression aller Virusproteine erfolgt.

Parallel wurde ein ebenfalls lineares Genom transfiziert, bei dem die Serinreste 158, 164, 170, 172 und 178 im Coreprotein mutiert worden waren (Stefan Schmehl). Die Austausche waren so gewählt, dass die von dem überlappenden ORF exprimierte Polymerase nicht mutiert worden war. Als Negativ-Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mitgeführt.

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurden den Zellen, welche mit Wildtyp-Genom transfiziert worden waren, die zellpermeablen Proteinkinase C Inhibitoren Peptid 19-27 und Ro-32-0432 in einer der IC₅₀ entsprechenden Konzentration zugefügt und über Nacht inkubiert. Die nicht mit Inhibitor behandelten Zellen wurden ebenfalls eine Nacht weiter inkubiert.

Zur immuncytochemischen Darstellung wurden die Zellen zunächst in 3 % Paraformaldehyd/PBS über Nacht fixiert. Danach wurden die Zellen mit 500 µl PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % Triton-X-100/PBS zur Permeabilisierung der Membranen. Die Zugabe der ersten Antikörper erfolgte in 5 % Ziegen Serum/0,5 % BSA/PBS für den Anti-Core-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 und für den Anti-Kernporen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500. Hierbei wurde die Antikörperlösung auf Parafilm gegeben, die Deckgläschen aufgelegt und die Ansätze in einer feuchten Kammer für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Deckgläschen wurden mit 100 µl PBS aufgespült und in die 24-Well-Zellkulturschale überführt. Diese wurden nun 4 x mit 500 µl PBS gewaschen. Die Inkubation mit den zweiten Antikörpern erfolgte mit einem FITC markiertem Ziege Anti-Kaninchen Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 und mit einem Texas Red markiertem Ziege Anti-Maus-Antikörper 1:100 in 5 % Ziegen Serum/0,5 % BSA/PBS auf Parafilm in einer feuchten Kammer für 40 min bei 37°C. Nach Aufspülung der Deckgläschen in 100 µl PBS, Rücküberführung in die 24-Well-Zellkulturschale und Waschen (4 x mit 500 µl PBS) wurden diese in DABCO (100 mg/ml)/Moviol auf einem Objektträger eingebettet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenzen wurden an einem LEICA DM IRBE Mikroskop (optische Vergrößerung 630-fach), welches mit einer konfokalen Laser-Scan-Einheit (Leica TCS NT, LEICA, Lasertechnik, Heidelberg) ausgestattet ist, ausgewertet (LEICA TCS NT-Software, Version 1.6.551).

3 Ergebnisse

3.1 Proteinkinase-Aktivität in Capsiden von aufgereinigten Viren aus Plasma

3.1.1 Nachweis von rekombinanten *in vitro* phosphorylierten Capsiden und Capsiden aus Plasma

Das Core-Protein enthält im Carboxyterminus sieben Serinreste, welche als potentielle Phosphorylierungsstellen dienen. Die C-Termini können sowohl auf der Außenseite der Capside als auch im Innern des Capsids lokalisiert sein. Letztere sind vor einer enzymatischen Hydrolyse geschützt, wie 1982 von Gerlich et. al. (Gerlich et al., 1982) beschrieben wurde. Zur Phosphorylierung dieser Stellen ist eine Proteinkinase Aktivität notwendig, die im Lumen der Capside verpackt vorliegt. Das Ausmaß der endogenen

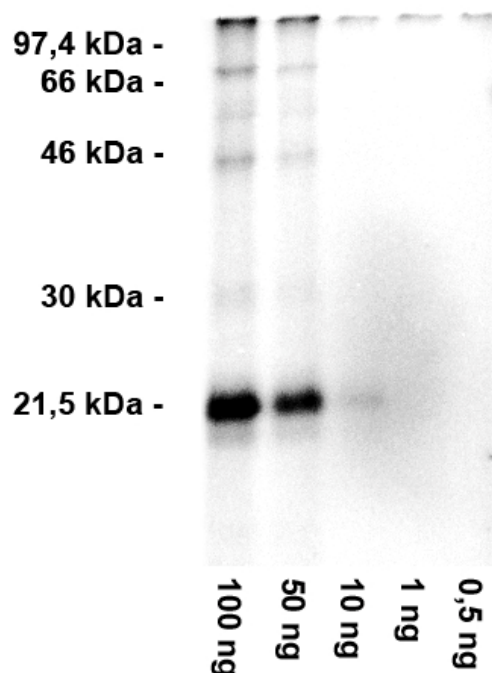


Abbildung 6: Bestimmung der Nachweisgrenze von *in vitro* phosphorylierten in *E. coli* exprimierten Capsiden (Genotyp C)

Phosphoimager Scan einer Verdünnungsreihe mit ^{32}P -markierten Capsiden. Die rekombinanten Core-Proteine (21,5 kDa) wurden auf einem 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Bei einer spezifischen Aktivität von 200 Ci/mmol lag die Nachweisgrenze bei ca. 1 ng.

Bei 21,5 kDa, welche den Core-Proteinen entspricht, zeigt sich bis einschließlich 50 ng eine scharf abgrenzbare radioaktive Bande. Bei einer eingesetzten Menge von 10 ng Core-Protein findet sich eine schwache Bande bei 21,5 kDa, die sich nur schwach vom

Phosphorylierung der Hepatitis B Virus Capside ist, ebenso wie der Zeitpunkt der Phosphorylierung innerhalb des viralen Lebenszyklus, unklar. Um eine Vorstellung der Größenordnung an Core-Proteinen zu bekommen, die zum Nachweis einer endogenen Proteinkinase Aktivität benötigt werden, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit rekombinanten, in *E. coli* exprimierten Capsiden, auf ihre Nachweisgrenze hin untersucht. Die Capside waren mit ca. 0,5 Phosphaten pro Core-Protein *in vitro* mit PKC phosphoryliert worden, wobei ca. 10 ATP Moleküle pro Core-Protein zur Verfügung standen.

Die Proteine der Verdünnungsreihe wurden auf einem 15 % SDS PAGE aufgetrennt, das Gel wurde anschließend getrocknet und die Radioaktivität nach Exposition eines Phosphoimager-Screen für 12 h ausgewertet (Abb. 6).

Hintergrund abgrenzt. In den Spuren mit weniger als 10 ng Core-Protein findet sich keine Bande.

Eine zusätzliche Bande bei ca. 80 kDa stellt die radioaktiv autophosphorylierte PKC (74 kDa) im *in vitro* Phosphorylierungsansatz dar. Schwache radioaktive Banden sind bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 18, 30, 46, sowie bei ca. 50 kDa nachweisbar. Diese Banden lassen sich durch eine unvollständige Reduzierung als Core-Protein-Dimere, bzw. durch eine unvollständige Denaturierung erklären. Zwar sind diesem Ergebnis nach auch Verunreinigungen mit phosphorylierbaren *E. coli*-Proteinen in der Capsid-Präparation nicht auszuschließen, jedoch deutet das Auftreten dieser Banden in den folgenden Experimenten, in denen Capside aus Seren verwendet wurden, eher auf Denaturierungsartefakte hin. Eine vergleichbare Phosphorylierung vorausgesetzt, ergibt sich damit für Versuche mit Capsiden, die aus Viren isoliert werden, dass man zwischen 1 bis 5×10^9 Virionen einsetzen muss.

Um zu überprüfen, ob sich die mit rekombinanten Core-Proteinen gewonnenen Nachweisgrenzen auf aus Plasma aufgereinigte Viren übertragen lassen, wurden Viruspräparationen eines chronisch mit dem Hepatitis B Virus Genotyp C infizierten Patienten verwendet. Da der *in vitro* Phosphorylierung der rekombinanten Capside – um eine hohe Anzahl von eingebauten Phosphatresten zu erreichen – [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP einer geringen spezifischen Aktivität (200 Ci/mmol) zugesetzt worden war, wurde 25 μCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP mit einer höheren spezifischen Aktivität (3000 Ci/mmol) eingesetzt und gleichzeitig weniger Capside, entsprechend $2,25 \times 10^8$ und $4,5 \times 10^7$ Virionen (ca. 2,3 ng bzw. 0,6 ng Core-Protein entsprechend) verwendet. Da das Detergenz NP-40 Bestandteil des Proteinkinase-Puffers ist, wurde die Lipidhülle der Virionen innerhalb der Phosphorylierungsreaktion abgespalten, so dass das zugesetzte ATP durch die 2 nm-messenden Poren der Capside ins Innere eindringen kann.

Nach Inkubation und Denaturierung erfolgte, wie zuvor, die Auftrennung der Proben in einem SDS Page, dessen Trocknung, Exposition und deren Auswertung. Wie zu erwarten (Abb. 7), lässt sich lediglich bei der höchsten eingesetzten Konzentration eine Bande bei 21,5 kDa beobachten. In der Verdünnung mit $4,5 \times 10^7$ Viren findet sich kein Signal. Die um den Faktor 5 bis 10 geringere Nachweisgrenze korreliert hierbei in etwa mit der 15 fach höheren spezifischen Aktivität und deutet auf einen vergleichbaren Phosphateinbau hin.

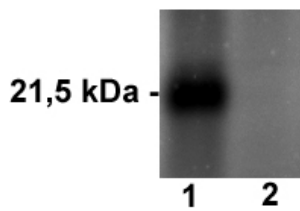


Abbildung 7: Nachweisgrenze von *in vitro* phosphorylierten Capsiden aus Virionen (Genotyp C)

Phosphoimager Scan nach über Nacht Exposition zweier Verdünnungen von Capsiden aus Serum. Hierzu wurden aufgereinigte Viren nach radioaktiver Phosphorylierung und Auftrennung im 15 % SDS PAGE verwendet.

1: $2,25 \times 10^8$ Viren, 2: $4,5 \times 10^7$ Viren, entsprechend 2,3 bzw 0,6 ng Capsiden. Core-Protein bei 21,5 kDa. Der gegenüber den *in vitro*-phosphorylierten Capsiden aus *E. coli* ca. 5 - 10 fach sensiblere Nachweis korreliert mit der 15 fachen spezifischen Aktivität des radioaktiven ATP.

3.1.2 Optimierung des Nachweises der endogenen Proteinkinase Reaktion

Das Hepatitis B Virus ist mit einer Lipid-haltigen Virushülle umgeben, durch die auch kleinere Moleküle wie ATP nicht diffundieren können. Wie zuvor beschrieben, erlaubt das Detergenz NP-40 des Phosphorylierungspuffers, dass die Phosphorylierung im Innern der Capside stattfindet. Das Ausmaß der Hüllproteinpermeabilisierung ist allerdings unklar, so dass untersucht wurde, ob durch eine weitere Präinkubation mit NP-40 mehr Virushülle abgestreift wird und damit die Phosphorylierungsreaktion verbessert wird.

In einem Ansatz mit 1×10^8 Viren wurde eine direkte Phosphorylierung durchgeführt. Ein anderer Ansatz wurde mit dem NP-40-haltigen Phosphorylierungspuffer präinkubiert, bevor die Phosphorylierung durch Zugabe von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gestartet wurde. Nach Ablauf der 6-stündigen Phosphorylierung wurde eine Immunpräzipitation mit Festphasen-gebundenen Anti-HBs-Antikörpern durchgeführt um das Ausmaß des Abstreifens der Virushülle zu verifizieren. Überstände und Präzipitate wurden auf einem SDS-PAGE wie zuvor analysiert.

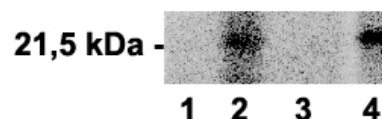


Abbildung 8: Analyse der Hüllproteinabspaltung durch NP-40

Phosphoimager Scan von Capsiden nach Immunpräzipitationen mit Anti-HBs. Hierzu wurden aufgereinigte Viren (Genotyp D) nach radioaktiver Phosphorylierung und Immunpräzipitation bzw. deren Überstand im 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. 1: Präinkubation mit NP40, Überstand, 2: Präinkubation mit NP40, Präzipitat, 3: direkte Phosphorylierung, Überstand, 4: direkte Phosphorylierung, Präzipitat. Die Präzipitationen zeigen, dass alle Capside noch mit Hüllproteinen besetzt sind; eine zusätzlich NP-40-Präinkubation der Viren keine verbesserte endogene Proteinkinase-Reaktion bewirkt.

Abbildung 8 zeigt, dass in beiden Ansätzen die Core-Proteine vollständig durch Anti-HBs präzipitiert wurden. Dies zeigt, dass ungeachtet der Detergenzzugabe und der Präinkubation noch Hüllproteine mit dem Capsid assoziiert waren. Der Vergleich beider Präzipitate zeigte keine geänderte Phosphorylierungsrate, was anzeigt, dass das ATP in beiden Ansätzen mit gleicher Effizienz in die Capside eindringen konnte.

Die Hülle des Hepatitis B Virus wird durch Disulfidbrücken der Hüllproteine stabilisiert. Da die vorangegangenen Präzipitationen gezeigt hatten, dass die Capside in Gegenwart von NP-40 nach wie vor mit dem HBsAg assoziiert waren, wurden in einem folgenden Ansatz die Disulfidbrücken durch Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert und erneut Immunpräzipitationen nach der Phosphorylierung durchgeführt. Es erfolgten Immunpräzipitationen mit dem Anti-HBs Antikörper und mit einem Anti-Capsid-Antikörper, der ein nicht lineares Epitop auf dem Capsid erkennt. Die Analyse erfolgte auf einem SDS-PAGE. Als Kontrolle wurden Capside eines nicht präzipitierten phosphorylierten Ansatzes aufgetragen.

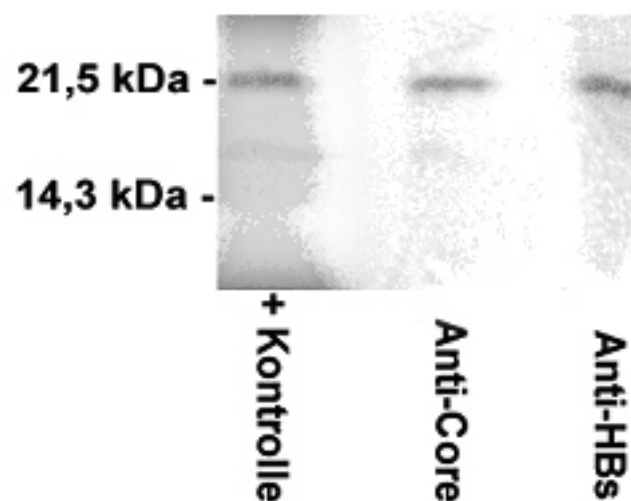


Abbildung 9: Einfluss von β -Mercaptoethanol auf die Abspaltung der Hüllproteine und die Freilegung von Capsidepitopen

Phosphoimager Scan von Capsiden aus HBsAg- und HBcAg-Immunpräzipitationen. Hierzu wurden aufgereinigte Viren (Genotyp D) nach radioaktiver Phosphorylierung und Immunpräzipitation bzw. deren Überstand im 15 % SDS PAGE aufgetrennt. + Kontrolle: 5×10^7 Viren (= 0,5 ng Core-Protein), nicht immunpräzipitiert, Anti-Core: 5×10^7 Viren nach radioaktiver Markierung und folgender Präzipitation mit Anti-Capsid Antikörpern, Anti-HBs : 5×10^7 Viren nach radioaktiver Markierung und folgender Präzipitation mit Anti-HBs Antikörpern. Die Präzipitationen zeigen, dass auch in Gegenwart von β -Mercaptoethanol keine vollständige Abspaltung der Hüllproteine erfolgt, obwohl Capsidepitope freigelegt wurden.

Wie in Abbildung 9 zu sehen, findet man in allen drei Versuchsanordnungen die Bande der Core-Proteine bei 21,5 kDa. Zusätzlich ist - wie schon bei den *in vitro* phosphorylierten Capsiden aus *E. coli* - eine weitere Bande bei ca. 16 kDa zu beobachten. Da der verwendete Antikörper keine einzelnen Core-Proteine erkennt, ist zudem davon auszugehen, dass dieses Protein keine Kontamination der Proben, sondern einen Bestandteil der Capside – am ehesten inkomplett denaturiertes Core-Protein darstellt.

Beide Immunpräzipitationen zeigten eine, der nicht präzipitierten Kontrolle quantitativ gleich phosphorylierte, Core-Protein Bande, was eine vollständige Immunpräzipitation anzeigt. Da beide Antikörper die Capside direkt bzw. indirekt präzipitierten, kann man davon ausgehen, dass alle Capside teilumhüllt vorlagen, aber Epitope der Capside exponierten. Die methodische Verbesserung zeigt sich in dem deutlich geringeren Hintergrund, der eine präzisere Bestimmung der Core-Phosphorylierung, sowie die Reduktion der eingesetzten Virus- bzw. Capsidzahl auf 5×10^7 ermöglichte.

In den vorherigen Ansätzen wurde die radioaktive Phosphorylierung vor der Immunpräzipitation durchgeführt. Um zu untersuchen, ob eine Phosphorylierung nach der Präzipitation – also in reinerem Zustand – bessere Ergebnisse liefert, wurden in einem Teil der Ansätze die Phosphorylierung vor Präzipitation, in einem Teil im Präzipitat durchgeführt. Die folgende Tabelle stellt die Versuchsanordnungen dar.

Tabelle 4: Versuchsanordnung der Phosphorylierungen und Immunpräzipitationen. IP: Immunpräzipitation; β -MSH: β -Mercaptoethanol; Phos.: Phosphorylierung

1	2	3	4	5	6
Anti-HBs-IP	Anti-HBs-IP	NP-40/ β -MSH	NP-40/ β -MSH	Anti-HBs-IP	NP-40/ β -MSH
NP-40/ β -MSH	NP-40/ β -MSH	Anti-HBc-IP	Phos	NP-40/ β -MSH	Phos
	Anti-HBc-IP		Anti-HBc-IP	Phos	
Phos	Phos	Phos		Anti-HBc-IP	
Gel	Gel	Gel	Gel	Gel	Gel

Abb. 10 zeigt, dass in allen Ansätzen (1, 2, 3 und 5), in denen die Phosphorylierung nach der Präzipitation durchgeführt worden war, nur eine schwache bis nicht erkennbare radioaktive Markierung der Core-Proteine erfolgt ist. Dies gilt unabhängig von der Inkubation des Präzipitats mit NP-40 und β -Mercaptoethanol. Im Einklang mit den vorherigen Versuchen ist davon auszugehen, dass diese Behandlung keine zusätzliche Freisetzung der Capside bewirkt, so dass die teilumhüllten Viren in einem Komplex vorliegen, der durch Antikörpern vernetzt ist, was die Diffusion des ATP behindern könnte.

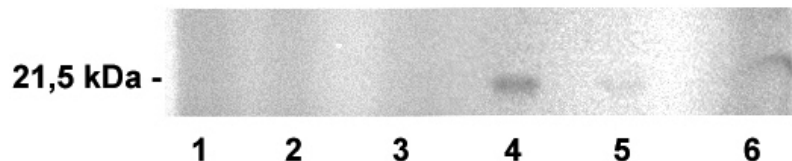


Abbildung 10: Effizienz der endogenen Proteinkinase-reaktion vor und nach Immunpräzipitation

Phosphoimager Scan der radioaktiven Core-Proteine (Genotyp D) nach Auftrennung im 15 % SDS-PAGE. Spuren 1 bis 6 s. Tab. 4. Das Gel zeigt, dass zu einer effizienten Markierung die Capside vor der Immunpräzipitation markiert werden müssen.

3.1.3 Phosphorylierungskinetik in aus Plasma aufgereinigten Capsiden

Nachdem die Methodik zur best möglichen Darstellung erarbeitet worden war, sollte die Phosphorylierungsreaktion optimiert werden. Dazu wurde die Kinetik der Reaktion untersucht. Hierbei wurden Viruspräparationen eines chronisch mit dem Hepatitis B Virus Genotyp C-infizierten Trägers verwendet. Die Aufreinigung der Viren erfolgte - wie unter Material und Methoden beschrieben - durch isopyknische Gradientendichtezentrifugation. Verwendet wurden 1×10^8 Viren pro Ansatz, welche für unterschiedliche Zeiten mit $25 \mu\text{Ci}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ im Proteinkinase C Puffer inkubiert wurden.

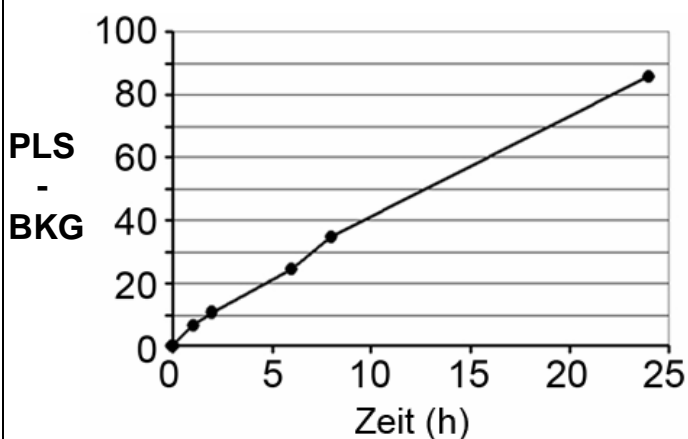
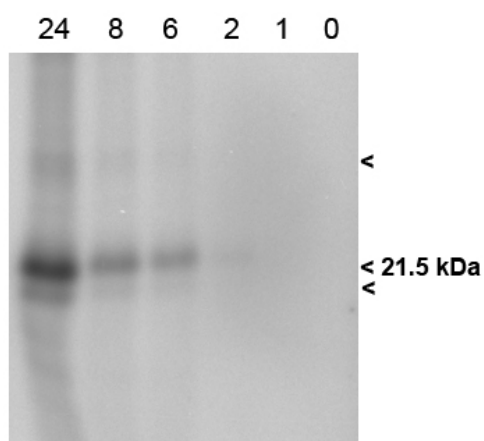


Abbildung 11:

A: Phosphorylierungskinetik der Capside aus Viren (Genotyp C)

Die Core-Proteine wurden auf einem 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und im Phosphoimager Scan dargestellt.

B: Quantitative Auswertung der Banden aus A

Der Hintergrund wurde subtrahiert. Die Quantifizierung erfolgte in den relativen Einheiten der phosphorstimulierten Lumineszenz und Abzug des Hintergrundes (PSL-BKG). Die Reaktion zeigt einen linearen Verlauf über 24 h.

Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe von SDS-haltigem Probenbuffer und Denaturierung bei 100°C gestoppt. Der Nachweis der übertragenen Phosphatreste auf die Core-Proteine erfolgte durch Auswertung der 21,5 kDa-Bande (Abb. 11A). Wie in einer zusätzlichen Auswertung analysiert (nicht dargestellt), folgen die schwachen Zusatzbanden bei 46 und 18 kDa (s. Pfeile) der gleichen Kinetik, wie sie für die 21,5 kDa Hauptbande in Abb. 11B dargestellt ist.

Über die gesamte Zeitspanne zeigt sich ein linearer Phosphateinbau. Auch nach 24 h ist kein Plateau erreicht, so dass Inhibitionen über den gesamten Zeitraum beobachtbar wären. Auffällig ist jedoch die sehr langsame Kinetik, obwohl in der Reaktion ein Überschuss an ATP vorliegt (5×10^{12} ATP Moleküle/ $2,4 \times 10^{10}$ Core-Proteine). Dieses scheint jedoch der Proteinkinase nur verzögert zur Verfügung zu stehen, was am ehesten durch die ins Capsid verpackte Kinase erklärt werden kann, da diesem Model zu Folge das ATP zunächst ins Innere der Capside diffundieren muss.

3.1.4 Exogene versus endogene Phosphorylierung von Capsiden

Um zu analysieren, ob die beobachtete Kinetik auf einer endogenen Proteinkinase und nicht auf einer exogenen Phosphorylierung beruht, wurde die Reaktion in Gegenwart eines exogenen Substrats wiederholt, welches einer freien Proteinkinase sofort zugänglich ist. Es wurde ein äquimolares Gemisch der Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 (Kalbthymus, BOEHRINGER, Mannheim) verwendet, da diese ähnliche Phosphorylierungsstellen wie die Core-Proteine aufweisen. 1×10^8 aus Viren isolierter Capside (entsprechend 1 ng Core-Protein) wurden 100 ng Histongemisch zugesetzt und mit $25 \mu\text{Ci } [\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wie zuvor inkubiert. Ein Kontrollansatz wurde ohne Histonzusatz phosphoryliert. Die Phosphorylierungsbedingungen wurden so gewählt, dass ATP und Histone gegenüber den Core-Proteinen im Überschuss vorliegen (5×10^{12} ATP Moleküle/ 4×10^{12} Histonmoleküle/ $2,4 \times 10^{10}$ Core-Proteine).

In beiden Ansätzen (Abb. 12) zeigt sich eine Bande bei 21,5 kDa, die den Core-Proteinen entspricht. Die radioaktive Markierung dieser Bande war in beiden Ansätzen - mit und ohne Histone - gleich stark. Bei Zugabe der Histone zeigt sich zusätzlich eine 3 fach stärker radioaktiv markierte Bande bei 14,3 kDa, welche den Histonen H2A, H2B und/oder H3 entspricht. Es wurde keine Phosphorylierung der Histone H1 und H4 (21,5 kDa und 11,3 kDa groß) beobachtet.

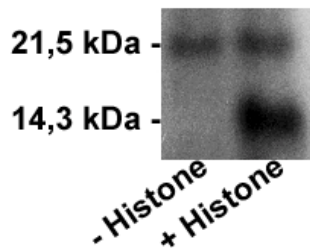


Abbildung 12: Analyse einer exogenen Proteinkinase-Aktivität

Phosphorylierung von Histonen in den endogenen Proteinkinase-Ansätzen. 15 % SDS-PAGE, Phosphoimager-Scan. 21,5 kDa Core-Protein; 14,3 kDa Histon. Die Phosphorylierung zeigt das Vorhandensein einer exogenen Aktivität an.

Die Phosphorylierung der Histone deutet auf eine Proteinkinaseaktivität hin, die nicht vollständig in die Capside verpackt vorliegt. Die unveränderte Core-Phosphorylierung zeigt, dass Core- und Histon-Phosphorylierung nicht kompetieren, die exogene Kinase also nur wenig an der Capsid-Phosphorylierung beteiligt ist. Die nur dreifach stärkere Phosphorylierung der Histone – bei annähernd 100 fachem Überschuss – zeigt, dass die exogene Proteinkinaseaktivität im Vergleich zur Endogenen nur extrem gering ist. Die Präzipitationen reflektierten also mutmaßlich die Phosphorylierung durch die endogene Proteinkinase in der Ausgangsreaktion. Die exogene Aktivität deutet jedoch nicht unbedingt auf einen Zerfall der Capside während der Aufarbeitung hin, da die HBV Capsiduntereinheiten einer Assoziations-Dissoziationsreaktion unterliegen, die auch als Capsid-Breathing bezeichnet wird.

3.1.5 Charakterisierung der Proteinkinase in Capsiden aus Plasma

In den folgenden Arbeiten sollte die verpackte Proteinkinase mit Hilfe von Inhibitoren untersucht werden. Die zuvor beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass selbst ein relativ kleines Molekül wie ATP mit einer Masse von 360 Da nur verzögert in die Capside eindringt. Da die verwendeten Inhibitoren alle eine höhere Masse aufweisen (s. Tabelle 5) wurde davon ausgegangen, dass sie langsamer als ATP in das Capsid gelangen. Aus diesem Grund wurden die Capside mit den verwendeten Inhibitoren für eine bzw. drei Stunden präinkubiert, bevor die Phosphorylierung durch Zugabe von ATP gestartet wurde.

Inhibitionen in Gegenwart einer einfachen IC_{50} waren nur in geringem Maß zu erwarten, so dass inhibitorische Effekte nur begrenzt quantifizierbar sind. Daher wurde mit einer Konzentration von $10 \times IC_{50}$ gearbeitet.

Studien anderer (Kann and Gerlich, 1994; Kann et al., 1993) hatten mit Antikörpern gezeigt, dass die endogene Proteinkinase in Capsiden aus der Leber eines HBV-Infizierten eine Proteinkinase C der Isoformen α , β oder γ ist, wobei die γ -Isoform auszuschließen ist, da sie nur in Nervenzellen vorkommt. Daher wurden verschiedene Inhibitoren der Proteinkinase C verwendet. Deren Spezifitäten sind in Tabelle 5 aufgeführt. Pro Versuchsansatz wurden 5×10^7 Viren (Genotyp D), ca. 0,5 ng Core-Protein entsprechend, sowie 40 μ Ci [γ^{32} P]ATP eingesetzt.

Tabelle 5: Spezifitäten der Proteinkinase C-Inhibitoren

Inhibitor	Masse [Da]	Spezifität
Ro 32-0432	489	Proteinkinase C Isotypen α und β I
Peptid 19-27	1256	Pseudosubstratsequenz der Isotypen α und β
Gö-6976	378	Ca ²⁺ abhängige Proteinkinase C Isotypen
Calphostin C	791	kompetetiver Inhibitor der regulatorischen Untereinheit (DAG-bindende Domäne)
Chelerythrine Chlorid	384	Inhibitor der katalytischen Untereinheit

In allen Ansätzen zeigen sich Banden bei 21,5 kDa, welche sich in Ihrer Aktivität unterscheiden (Abb. 13A und 13B). Die quantitative Auswertung ist in der Abb. 13C dargestellt.

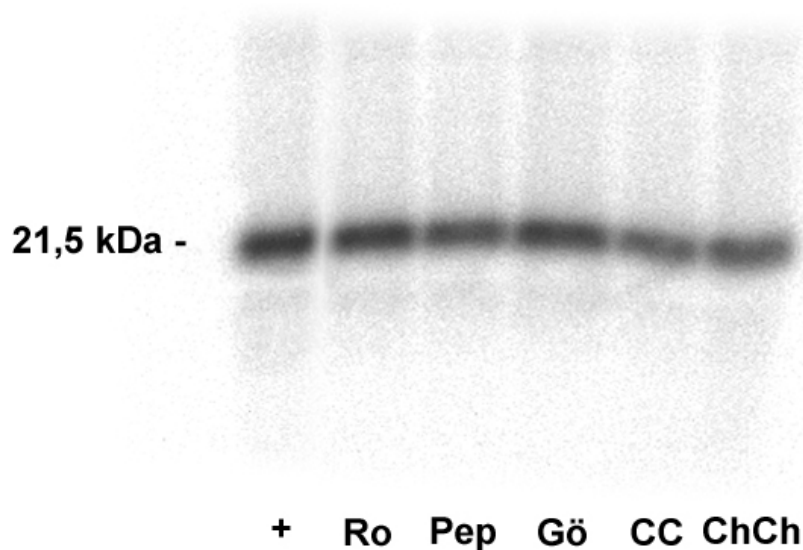


Abbildung 13A:

Hemmung der endogenen Proteinkinase durch PKC-Inhibitoren in Capsiden aus Virionen des Plasmas (Genotyp D)

1 h Präinkubation der verschiedenen Inhibitoren bei 10xIC₅₀, danach Phosphorylierung, Immunpräzipitation mit Anti-HBc, Auftrennung im 15 % SDS-PAGE und Phosphoimager-Scan.

+: kein Inhibitor, Ro: Ro 32-0432, Pep: Peptid 19-27, Gö: Gö 6976, CC: Calphostin C, ChCh: Chelerythrine Chlorid

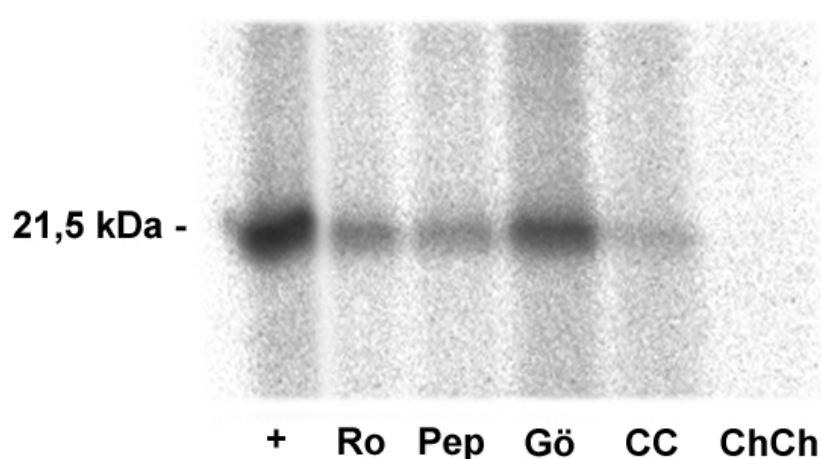


Abbildung 13B:

Hemmung der endogenen Proteinkinase durch PKC-Inhibitoren in Capsiden aus Virionen des Plasmas (Genotyp D)

3 h Präinkubation der verschiedenen Inhibitoren bei 10xIC₅₀. Sonstige Beschreibung s. Abb. 13A.

In den Ansätzen, welche 1 Stunde mit den Inhibitoren präinkubiert wurden, zeigte sich eine Minderung der Aktivität durch das Peptid 19-27 auf ca. 80 % und durch Calphostin C sowie Chelerythrine Chlorid ebenfalls auf ca 80 %. Für den Inhibitor Ro 32-0432 findet sich keine und für Gö-6976 findet sich eine Aktivitätsminderung auf ca 90 %. Nach einer 3-stündigen Präinkubation fanden sich deutlich reduzierte Aktivitäten (unter 40 %) für Ro 32-0432, Peptid 19-27, Calphostin C und Chelerythrine Chlorid. Eine Aktivitätsminderung auf ca. 80 % zeigte Gö-6976. Es zeigt sich also eine Abhängigkeit der Inhibition von der Präinkubationszeit, welches ein verzögertes Eindringen der Inhibitoren ins Capsidinnere anzeigt.

Die relativ geringe Inhibition der Phosphorylierung durch Gö-6976 lässt keine sichere Eingrenzung auf Calcium-abhängige PKC-Isotypen zu, wobei zu berücksichtigen ist, dass keinerlei Aussage über die intraluminale InhibitorKonzentration möglich ist, da diese nicht nur vom Molekulargewicht, sondern auch von der Oberflächenladung des Inhibitors abhängt. Demzufolge spricht dieser Befund nicht gegen eine Calcium-Abhängigkeit, da die anderen eingesetzten Inhibitoren möglicherweise schneller durch die Poren des Capsids diffundieren. In der Tat zeigt die Wirksamkeit von Ro 32-0432, welches in dieser Konzentration die Isotypen α , β und μ hemmt – ebenso wie die Inhibition durch das mit der DAG wechselwirkenden PKC-Domäne Calphostin C - das Vorhandensein einer Proteinkinase C der Isoformen α , β und γ an. Diese Annahme wird durch die Inhibition mit dem Peptid 19-27 bestätigt, welche ausschließlich die Isotypen α und β hemmt. Die fast vollständige Inhibition zeigt zudem, dass keine nennenswerte Menge an anderen Proteinkinasen zur endogenen Phosphorylierung in Capsiden von Viren beiträgt.

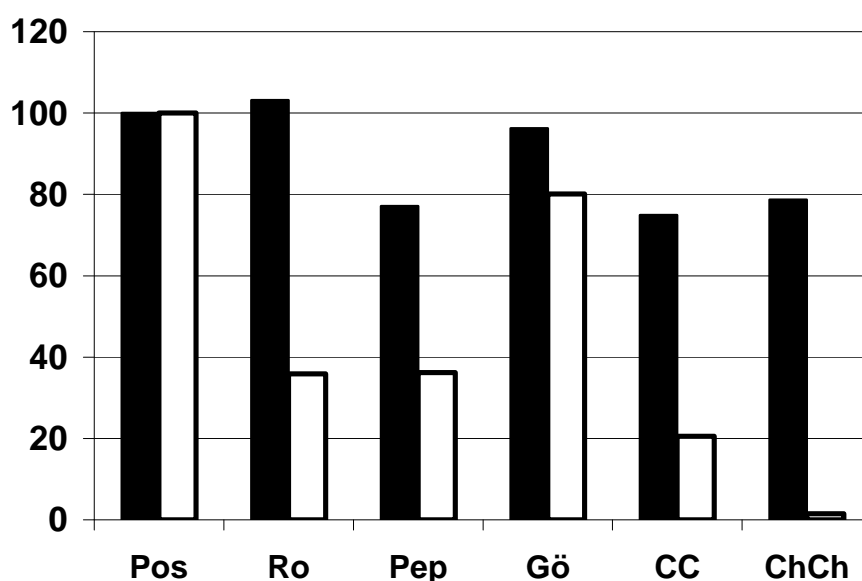


Abbildung 13C:

Quantitative Auswertung der Inhibitionen aus den Abb. 13A und B

x-Achse: eingesetzter Inhibitor, y-Achse: Aktivität in Prozent, Schwarz: 1h Präinkubation, Weiß: 3h Präinkubation.

Die Abkürzungen der Inhibitoren sind in Abb. 13A angegeben.

3.1.6 Kontrollphosphorylierungen zur Inhibitorspezifität

Bei hohen Konzentrationen an Inhibitoren zeigen diese häufig unspezifischen Inhibitionen. Als Beispiel mag Ro 32-0432 dienen, was bei einfacher IC_{50} nur die α -Isoform der PKC inhibiert, bei 10facher IC_{50} neben der β -Isoform auch die atypische PKC μ inhibiert. Daher wurden die Versuche mit Konzentrationen wiederholt, die der einfachen IC_{50} entsprachen. Um weitere unspezifische Effekte der Inhibitoren auszuschließen, wie etwa Modifikationen des Substrats, die einen Capsidzerfall begünstigen, wurde in diesen Experimenten auf eine Immunpräzipitation verzichtet und der Phosphorylierungsansatz direkt auf dem Gel analysiert (Abb. 14A). Das Wissen um die inhibitorischen Eigenschaften der einzelnen Inhibitoren sollte auch bei den geringeren zu erwartenden Effekten die zutreffende Interpretation erlauben.

Wie in anderen Experimenten auch ist bei ca. 18 kDa eine Bande erkennbar. In der quantitativen Auswertung der 21,5 kDa Bande (Abb. 14B) zeigte sich wieder eine deutliche Aktivitätsabnahme auf 60 % in Gegenwart des PKC Inhibitors 19-27. Für den Inhibitor Gö-6976 zeigt sich eine Aktivitätsminderung auf 90 %. Keine Abnahme findet sich für Ro 32-0432, Chelerythrine Chlorid und Calphostin C. Diese Befunde sind im Einklang mit der geringen Inhibition, wie sie schon mit aus Plasma isolierten Capsiden bei gleicher Präinkubationszeit beobachtet wurden (Abb. 13C). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass hier Capside des Genotyps C (Genotyp D im Vorversuch) verwendet wurden.

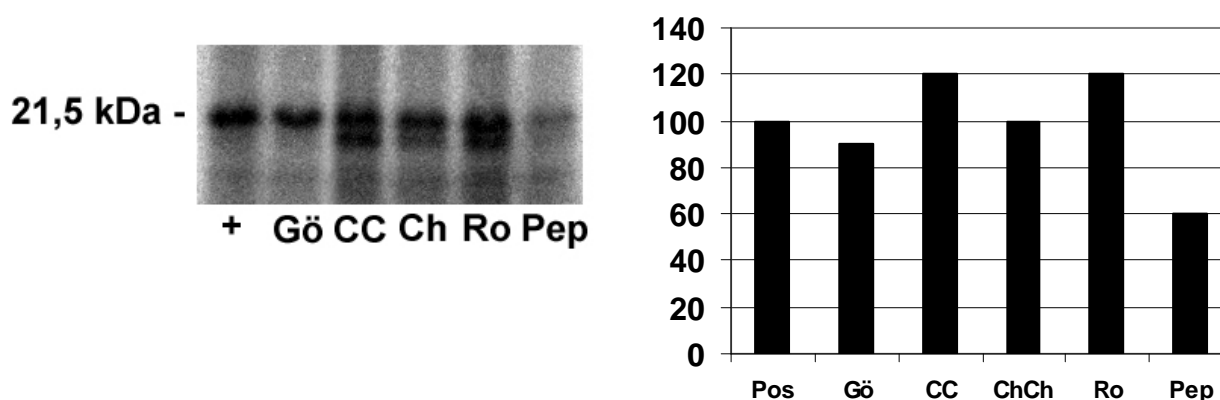


Abbildung 14A: Hemmung der endogenen Proteinkinase durch PKC-Inhibitoren in Capsiden aus Virionen des Plasmas (Genotyp C)

1 h Präinkubation der verschiedenen Inhibitoren bei $1 \times IC_{50}$, danach Phosphorylierung, Auftrennung im 15 % SDS-PAGE und Phosphoimager-Scan. Die Abkürzungen der Inhibitoren sind in Abb. 13A angegeben.

Abbildung 14B: Quantitative Auswertung der Inhibitionen aus Abb 14A

x-Achse: eingesetzter Inhibitor, y-Achse: Aktivität in Prozent

(Ch=ChCh)

3.1.7 Inhibition der exogenen gegenüber der endogene Phosphorylierung

Die vorherigen Experimente implizieren, dass die endogene Proteinkinase zu einem geringen Anteil frei vorliegt und exogene Substrate phosphorylieren kann. Dies würde bedeuten, dass beide Kinasen – Endogene und Exogene – die gleichen sind. Daher wurde den Versuchsansätzen mit 2,3 ng Capsiden ($= 2,25 \times 10^8$) ein 1900 facher molarer Überschuss eines jeden Histons (Gesamtmenge 10 μg) zugefügt und die Phosphorylierung beider Substrate unter Inhibitorzugabe analysiert.

Wie bei den oben beschriebenen Versuchen finden sich Banden bei 21,5 kDa und 14,3 kDa (Abb. 15A). Für die verschiedenen Inhibitoren findet sich ein unterschiedliches Maß der Inhibition (Abb. 15B), wobei eine abgeschwächte radioaktive Markierung bei 21,5 kDa immer mit einer reduzierten Phosphorylierung der Histon-Bande einhergeht, was anzeigt, dass endogene und exogene Proteinkinase identischer Natur sind.

Setzt man die Aktivität der radioaktiven Markierung bei 21,5 kDa mit der bei 14,3 kDa in Relation, so findet sich für die 14,3 kDa Bande ein lediglich 6-fach stärkeres Signal. Da die Histone jedoch mit sehr hohem Überschuss zugesetzt waren, bestätigt dies die vorherigen Versuche, indem lediglich ein geringer Anteil der Proteinkinasen exogen vorliegt.

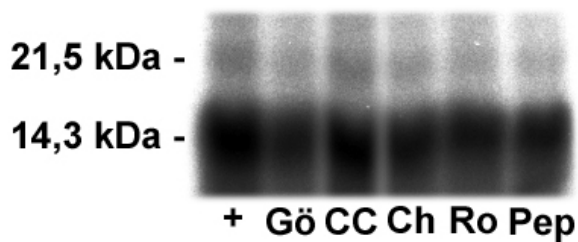


Abbildung 15A: Hemmung der endogenen und der freien Proteinkinase durch PKC-Inhibitoren in Capsiden aus Virionen des Plasmas (Genotyp C)

1 h Präinkubation der verschiedenen Inhibitoren bei $1 \times I_{C_{50}}$, danach Phosphorylierung, Auftrennung im 15 % SDS-PAGE und Phosphoimager-Scan. Capsid bei 21,5 kDa; Histone bei 14,3 kDa abgebildet. Die Abkürzungen der Inhibitoren sind in Abb. 13A angegeben.

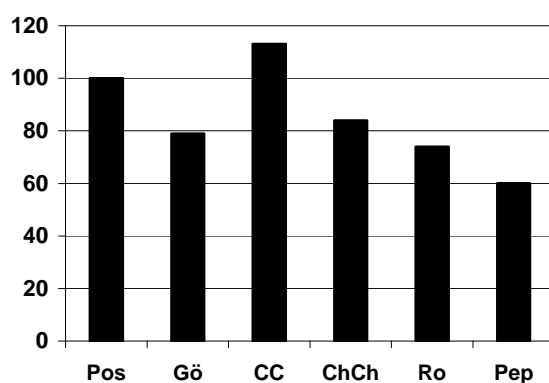


Abbildung 15B: Quantitative Auswertung der Inhibitionen aus Abb. 15A der 21,5 kDa Core-Protein-Bande

x-Achse: eingesetzter Inhibitor, y-Achse: Aktivität in %.

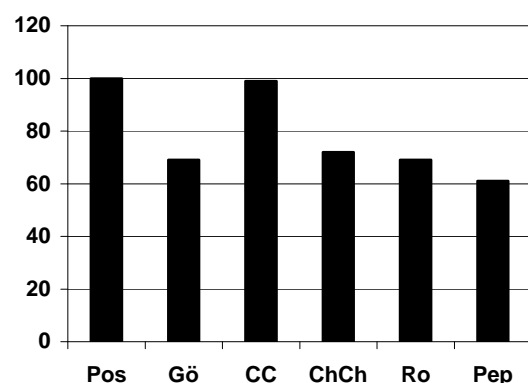


Abbildung 15C: Quantitative Auswertung der Inhibitionen aus Abb. 15A der 14,3 kDa Histone-Bande

x-Achse: eingesetzter Inhibitor, y-Achse: Aktivität in %. Die Inhibition der Histone-Phosphorylierung ist identisch zur Inhibition der Core-Protein-Phosphorylierung.

Betrachtet man die Effekte der einzelnen Inhibitoren so zeigt sich, dass das Isotypen α und β -spezifische Pseudosubstrat (Peptid 19-27) eine Aktivitätsminderung der Core-Protein-Phosphorylierung auf 60 % ergab. Das in dieser Konzentration Isotyp- α spezifische Ro 32-0432 zeigte eine Aktivitätsminderung auf 75 %. Die geringe Inhibition lässt kaum eine Differenzierung zwischen PKC α und β zu. Eine Aktivitätsminderung auf ca. 80 % wurde in Gegenwart von Chelerythrine Chlorid und Gö-6976, die die katalytische bzw. Ca^{2+} -bindende Untereinheit entsprechender Proteinkinase C Isoformen binden, beobachtet. Einzig Calphostin C, ein kompetitiver Inhibitor der regulatorischen Untereinheit, zeigte keine Inhibition. Wie sich jedoch an den Unterschieden zur Phosphorylierung der Core-Proteine im Vorversuch zeigt, können Reduktionen um 20 % schon durch Pipettierungenauigkeiten hervorgerufen sein.

3.1.8 Charakterisierung der Proteinkinase in Capsiden von Viren aus HepG2.2.15 Zellkulturüberstand

Die potentiellen Phosphorylierungsstellen verschiedener HBV Genotypen sind gut konserviert. Übereinstimmend wurden ähnliche Inhibitionsmuster für die untersuchten Capside aus Plasmen mit Hepatitis B Viren der Genotypen C und D gefunden. Unterschiedliche verpackte Proteinkinasen können jedoch auch durch deren unterschiedliche Expression in Leberzellen hervorgerufen werden. Daher wurde das Inhibitionsmuster in Capsiden untersucht, die aus Viren im Überstand von HepG2.2.15 Zellen isoliert worden waren. Diese stabil mit einem HBV Genom des Genotyps D transfizierte Zelllinie, die infektiöse Viren sekretiert, ist immortalisiert, teilt sich also im Unterschied zu normalen Hepatozyten im Menschen permanent.

Nach dem Entfernen der Virushülle erfolgte eine Präinkubation mit Inhibitoren in der 10fachen IC_{50} Konzentration für 1,5 h, gefolgt von der Phosphorylierung, Immunpräzipitation und Auftrennung im 15 % SDS Page.

Bei allen Proben zeigt sich wieder eine Bande bei 21,5 kDa, welche sich in ihrer Aktivität unterscheiden, aber ein Inhibitionsmuster ähnlich dem der zuvor untersuchten Capside aus Seren zeigte (Abb. 16A und B). Im Einklang mit der Dauer der Präinkubationszeit fanden sich für Ro 32-0432, Calphostin C und Chelerythrine Chlorid sich eine Aktivitätsminderung auf 80 %. Das Peptid 19-27 senkte die Aktivität der verpackten Proteinkinase auf 65 %. Wie auch bei den Versuchen mit aus Serum aufgereinigten Viren lässt sich eine Eingrenzung auf die Proteinkinase C der Isotypen α und β treffen.

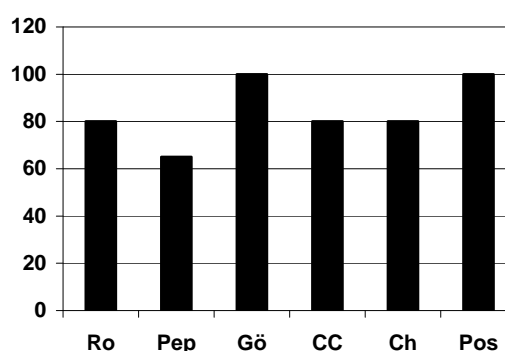
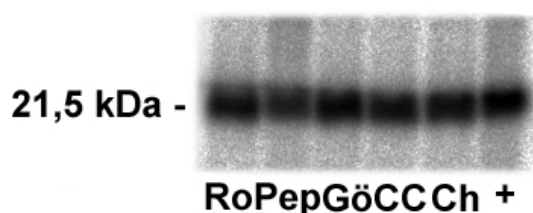


Abbildung 16A: Hemmung der endogenen Proteinkinase durch PKC-Inhibitoren in Capsiden aus Viren (Genotyp D) im Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen

1,5 h Präinkubation der verschiedenen Inhibitoren bei $10 \times IC_{50}$, danach Phosphorylierung, Auftrennung im 15 % SDS-PAGE und Phosphoimager-Scan. Die Abkürzungen der Inhibitoren sind in Abb. 13A angegeben.

16B: Quantitative Auswertung der Inhibitionen aus Abb. 16A

y-Achse: Aktivität in Prozent, x-Achse: eingesetzter Inhibitor

3.2 Intrazelluläre Effekte der PKC-Inhibitoren

3.2.1 Einfluss der PKC-Inhibition auf die intrazelluläre Capsidverteilung

Über den Effekt von Proteinkinase-Inhibitoren auf den viralen Lebenszyklus ist nur wenig bekannt. Wie von anderen gezeigt, hat die Phosphorylierung der Core-Proteine einen Effekt auf die Struktur der Capside. So erlaubt die Phosphorylierung im C-Terminus der Core-Proteine, dass das Kerntransportsignal auf der Oberfläche der Capside exponiert wird. Auf der anderen Seite bewirkt eine Phosphorylierung direkt innerhalb des Kerntransportsignals, welches die Aminosäuren 158-168 umfasst, dass dieses nicht mehr funktionell ist. (Vlachou, 1999).

Capside weisen innerhalb von Hepatomzelllinien eine Halbwertszeit von > 24 h auf (Deres et al., 2003), so dass in permanent exprimierenden HepG2.2.15-Zellen kein Effekt innerhalb kürzerer Behandlungszeiträume zu erwarten war. Daher wurde die Hepatomzelllinie HuH-7 transient mit einem HBV Wildtyp Genom transfiziert und danach mit den zellpermeablen Proteinkinase Inhibitoren Peptid 19-27 und Ro 32-0432 mit der doppelten IC_{50} über Nacht inkubiert. Das verwendete HBV Genom war vom Genotyp A, welches sich aber in seinen Phosphorylierungsstellen nicht von denen der anderen zuvor in dieser Arbeit untersuchten Genotypen unterscheidet.

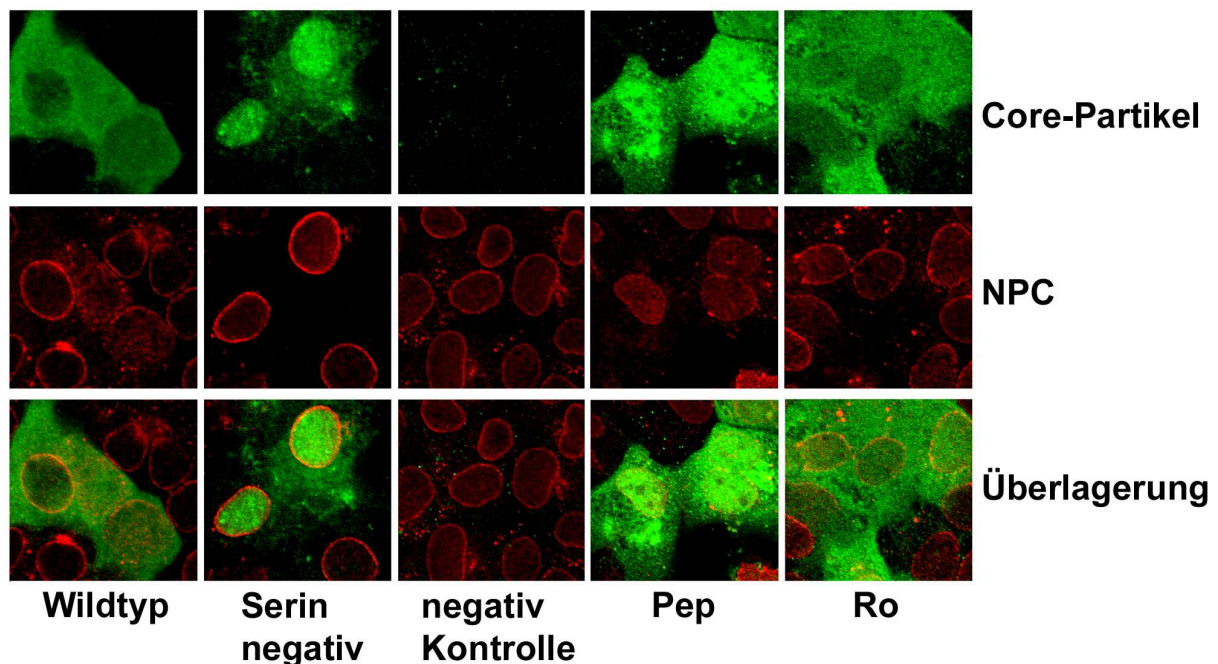


Abbildung 17: Indirekte Immunfluoreszenz von HBV Capsiden (Genotyp A) in transient HBV-transfizierten HuH-7 Zellen in Gegenwart von PKC-Inhibitoren

Obere Reihe: FITC markierte Core-Partikel in Grün, mittlere Reihe: Texas-Red markierte Kernporen-Komplexe in Rot (NPC, nuclear pore complex), untere Reihe: Überlagerung beider Fluoreszenzen

Zum Vergleich wurden als Negativ-Kontrolle nicht transfizierte Zellen mitgeführt. Als weitere Kontrollen dienten Zellen die mit einer Serin-negative Mutante transfiziert worden waren, sowie mit dem Wildtyp transfizierte Zellen.

Die in der oberen Bildreihe der Abb. 17 zu sehenden grünen Fluoreszenzen entsprechen den Core-Partikel, welche immunzytochemisch durch den zuvor verwendeten Anti-Capsid-Antikörper und einem zweiten FITC markierten Anti-Kaninchen-Antikörper sichtbar gemacht wurden. Der Kernporen Komplex (NPC, nuclear pore complex) wurde mit einem monoklonalen Anti-Kernporen-Antikörper und einem zweiten Texas-Red markierten Anti-Maus-Antikörper dargestellt, wie in der zweiten Reihe in Rot zu sehen ist. Die untere Reihe stellt eine Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle dar.

Für den Wildtyp zeigt sich, dass die meisten Core-Partikel im Zytoplasma lokalisieren, während sich nur ein geringer Teil im Nukleus befindet. Demgegenüber finden sich die Serin-negativen Core-Partikel hauptsächlich im Nukleus. In der Negativ-Kontrolle, also den nicht transfizierten Zellen, ist keine Capsid-Fluoreszenz zu beobachten.

In den Peptid 19-27-behandelten Zellen findet sich ein ähnliches Bild wie für die Serin-negativen Mutanten. Dies lässt auf eine Inhibition der Phosphorylierung schließen, die verhindert, dass das Kerntransportsignal inaktiviert wird. Im Gegensatz dazu findet sich eine gegenüber den unbehandelten Zellen unveränderte Capsid-Verteilung in den Ro 32-0432 behandelten HuH-7 Zellen, wobei offen bleibt, ob der Inhibitor keinen Effekt auf die Lokalisation hatte, oder nur unzureichend in die Zellen eingedrungen war.

3.2.2 Einfluss der PKC-Inhibition auf die Virussekretion

Capsid-Proteine können zu verschiedenen Zeiten phosphoryliert werden: Zum einen innerhalb der Zelle vor ihrer Assemblierung zu Capsiden, zum andern – wie anhand der Versuche offensichtlich ist – auch nachher. Wie aus den Experimenten von Gazina et al. hervorgeht, ist in der Tat eine Phosphorylierung – zumindest eines Teils der Core-Proteine – am Serinrest 162 essentiell für die Verpackung des RNA-Prägenoms. Offen bleibt, ob der nachfolgenden Phosphorylierung durch die verpackte Proteinkinase überhaupt eine Funktion bei der Verpackung der Capside in die Hüllproteine zukommt. Daher wurde untersucht, in wie weit eine Inhibition mit PKC-Inhibitoren eine Auswirkung auf die Virussekretion hat.

Dazu wurden die zellgängigen PKC-Inhibitoren Peptid 19-27 und Ro 32-0432 dem Zellkulturmedium von HepG2.2.15-Zellen zugesetzt. Eingesetzt wurden die Inhibitoren mit der doppelten IC_{50} . Die Zellen wurden 5 Tage mit Inhibitoren behandelt. Als Positivkontrolle wurden HepG2.2.15 Zellen ohne Inhibitor im Zellkulturmedium kultiviert.

Um mögliche Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen zu verfolgen, da durch die Inhibitoren auch zelluläre Proteinkinasen beeinflusst werden, wurden die Zellen jeden Tag morphologisch unter dem Mikroskop überprüft und fotografiert (Abb. 18).

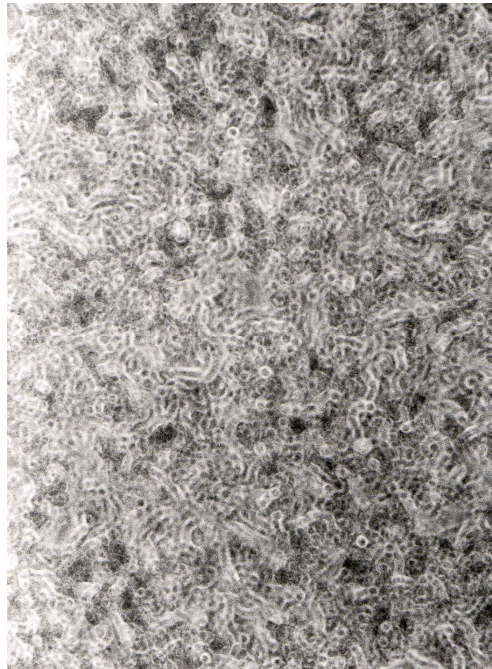


Abbildung 18: Mikroskopische Aufnahme von HepG2215 Zellen

Bei der morphologischen Beurteilung konnte kein Unterschied zu den nicht behandelten Zellen festgestellt werden, was gegen eine nennenswerte Toxizität spricht.

3.2.2.1 Endogene Proteinkinase Reaktion mit intrazellulärem Capsiden

Obwohl zellpermeabel war zunächst zu untersuchen, ob die Proteinkinase-Inhibitoren die intrazelluläre Phosphorylierung – insbesondere der Core-Proteine beeinflusst hatten. Dazu musste zunächst die Menge an intrazellulären Capsiden im Westernblot nach nativer Agarosegel-Elektrophorese bestimmt werden.

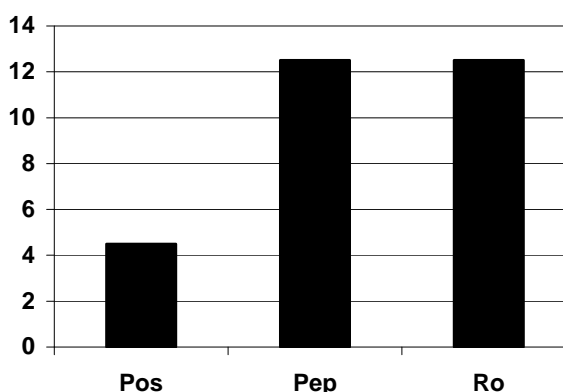
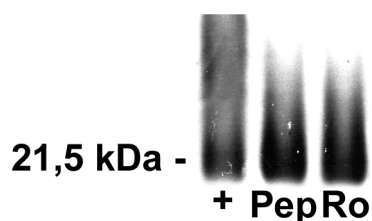


Abbildung 19A: Westernblot intrazellulärer Capside (Genotyp D) aus mit Inhibitor behandelten Zellen nach nativer Agarosegel-Elektrophorese

Verdünnungsreihe mit rekombinantem Core, 1. Antikörper Anti-Core, 2. Antikörper Anti-Kaninchen-POD. Die Abkürzungen der Inhibitoren sind in Abb. 13A angegeben. +: Positiv-Kontrolle ohne Inhibitor.

Abbildung 19B: Quantitative Auswertung aus Abb. 19A der intrazellulären Caspsidmenge nach Inhibition

x-Achse: eingesetzter Inhibitor, y-Achse: Angabe in pg

Abb. 19 zeigt, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die Capside innerhalb der Zellen um den Faktor drei akkumuliert waren. Zur Bestimmung der endogenen Proteinkinaseaktivität wurden 2×10^7 Core-Partikel (entsprechend 200 pg Core-Protein) verwendet. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle wurde bei allen Inhibitor-Ansätzen eine Aktivitätsminderung auf ca. 40 % gezeigt (s. Abb. 20A und B), welches eine erfolgreiche Aufnahme beider Inhibitoren in die Zellen mit nachfolgender Inhibition anzeigt.

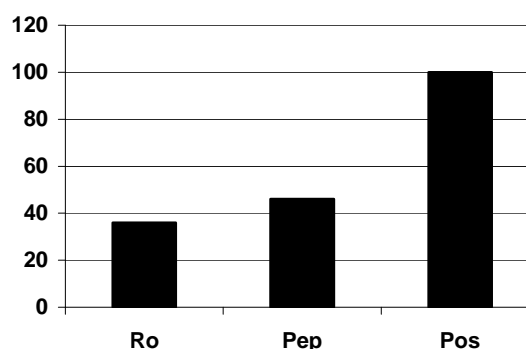
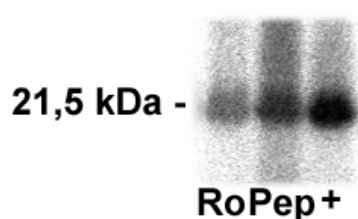


Abbildung 20A: Endogene Proteinkinase in intrazellulären Capsiden (Genotyp D) aus HepG2.2.15-Zellen

Die Zellen wurden mit verschiedenen PKC-Inhibitoren vorbehandelt. Nach der Phosphorylierung erfolgte die Auftrennung im 15 % SDS-PAGE und Phosphoimager-Scan. Die Abkürzungen der Inhibitoren sind in Abb. 13A angegeben

Abbildung 20B: Quantitative Auswertung der Phosphorylierung von 20A

y-Achse: Aktivität in Prozent, x-Achse: eingesetzter Inhibitor

+: Positiv-Kontrolle ohne Inhibitor.

3.2.2.2 Bestimmungen von HBs-Antigen und HBe-Antigen im Zellkulturüberstand.

Die intrazelluläre Akkumulation der Capside könnte entweder auf eine erhöhte Stabilität der unphosphorylierten Capside zurückzuführen sein, wie sie von Köck et al. beobachtet wurde, oder aber auf einer fehlenden Sekretion in Form von Viren basieren. Um zu kontrollieren, ob die Inhibitoren einen Einfluss auf den Sekretionspfad der Viren haben, wurde die Konzentration an HBs- und HBe-Antigen im Zellkulturüberstand durch ELISA bestimmt.

Hierbei zeigte sich (s. Abb. 21A und B), dass die Sekretion sowohl von HBe- als auch von HBs-Antigen in Gegenwart der Inhibitoren nicht nennenswert supprimiert wird. Dies lässt darauf schließen, dass die Inhibition zellulärer PKCs zum einen keinen Einfluss auf die Sekretion der Hüllproteine und des HBeAg hat, zum anderen anscheinend auch die Synthese dieser viralen Proteine nicht verändert ist. Da HBeAg- und Capsid-mRNA vom selben Promoter transkribiert werden, ist davon auszugehen, dass auch die Core-Protein-Synthese unbeeinträchtigt abläuft. Die Akkumulation intranukleärer Capside war also am ehesten auf eine fehlende Ausschleusung der Core-Proteine zurück zu führen.

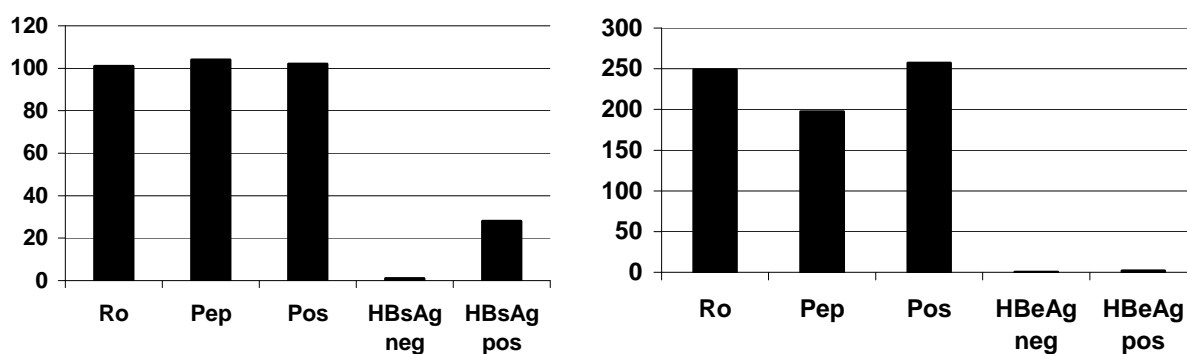


Abbildung 21: Sekretion von HBsAg und HBeAg in das Zellkulturmedium PKC-inhibierter HepG2.2.15-Zellen

21A: HBsAg-Sekretion. y-Achse: Menge in S/N (Signal/Noise).

21B: HBeAg-Sekretion. y-Achse: Menge in S/CO (Signal/ Cut-Off). Die Quantifizierungen erfolgten im HBsAg bzw. HBeAg-ELISA. Auf der x-Achse sind die Ansätze dargestellt. HBsAg neg: Standard Negativprobe, HBsAg pos: Standard Positivprobe. Die weiteren Abkürzungen sind in Abb. 13A beschrieben.

3.2.2.3 Bestimmung der Virusmenge im Zellkulturüberstand

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der Phosphorylierung einen Einfluss auf die Virussekretion der Zellen hat, wurden die DNA-Virusgenome der Zellkulturüberstände in einer quantitativen real-time PCR im Lightcycler untersucht. Die Bestimmung erfolgte in Triplets. Der Variationskoeffizient zwischen den Einzelansätzen war kleiner 14 %.

Es zeigte sich eine auf ca. 60 % verminderte Virussekretion im Zellkulturüberstand der mit Peptid 19-27 behandelten Zelle (Abb. 22). Für Ro 32-0432 hingegen zeigte sich die Virussekretion unverändert gegenüber den Positivkontrollen.

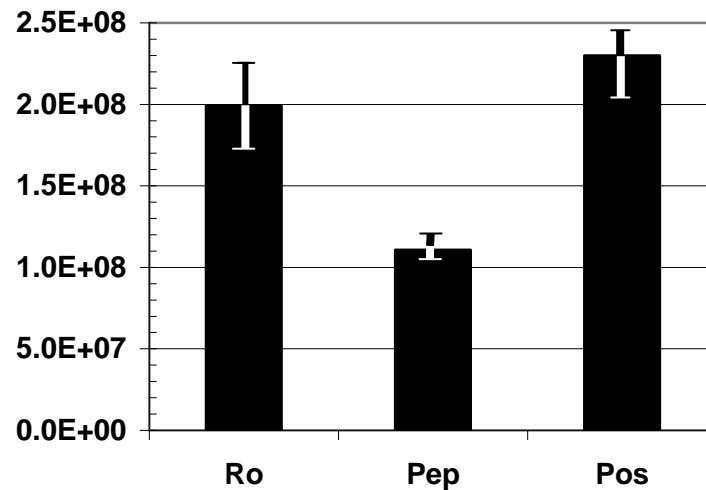


Abbildung 22: Quantitative real-time PCR von Viren (Genotyp D) aus Zellkulturüberstand von Inhibitor behandelten HepG2.2.15 Zellen

Für die Positiv Kontrolle wurde Zellkulturüberstand von HepG2.2.15 Zellen verwendet, welche nicht mit Inhibitor behandelt wurden. Die Balken stellen die Variationsbreite der Ergebnisse dar.

3.2.2.4 Endogene Proteinkinase-Aktivität in Viren aus Proteinkinase C Inhibitor-behandelten Hep G2.2.15 Zellen

Um zu untersuchen, ob die Inhibitoren-Behandlung zu einer Reduktion der Phosphorylierbarkeit der Capside in den sekretierten Viren geführt hatte, wurden die Capside in einer endogenen Phosphorylierungsreaktion analysiert. Die zeitnahe Analyse ermöglichte es, die eingesetzte Virusmenge auf $1,5 \times 10^7$ - entsprechend 150 pg Core-Protein - zu reduzieren. Dies ist im Einklang mit Vorversuchen in denen sich gezeigt hatte, dass die Lagerung die endogene Proteinkinase beeinträchtigt.

Abb. 23A und B zeigen, dass sich tatsächlich unterschiedliche Proteinkinase-Aktivitäten in den verschiedenen Ansätzen befinden. Für Capside aus Viren der mit Peptid 19-27 behandelten Zellen findet sich eine deutliche Aktivitätsminderung auf 50 %, während die Behandlung mit Ro 32-0432 keinen Effekt hat.

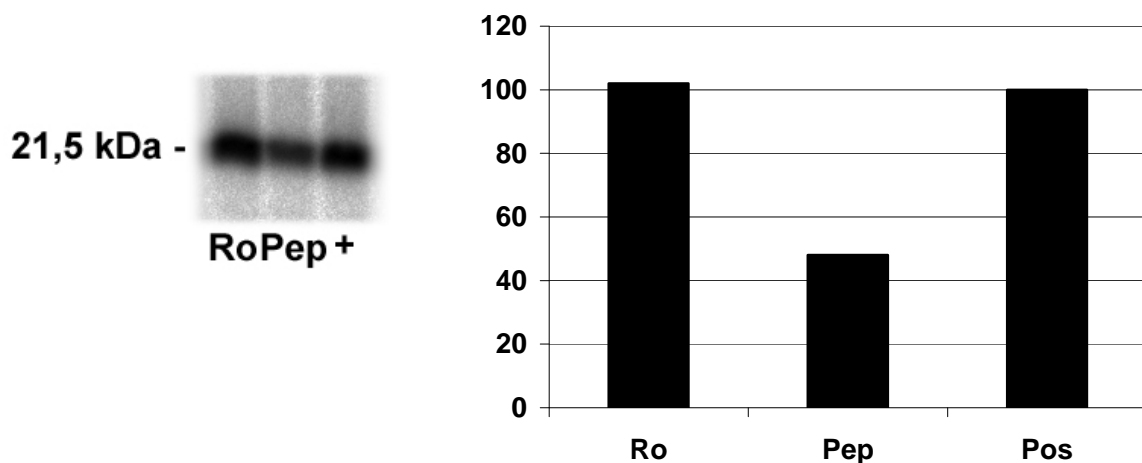


Abbildung 23A: Endogene Proteinkinaseaktivität in Capsiden aus Virionen (Genotyp D) im Überstand von Inhibitor behandelten HepG2.2.15-Zellen

Nach der Phosphorylierung erfolgte die Auftrennung im 15% SDS-PAGE und Phosphoimager-Scan. +: Positiv-Kontrolle ohne Inhibitor. Die restlichen Abkürzungen der Inhibitoren sind in Abb. 13A angegeben.

Abbildung 23B: Quantitative Auswertung des Phosphoimager-Scans von Abb. 23A

y-Achse: Aktivität in Prozent, x-Achse: eingesetzter Inhibitor

Diese Beobachtungen zeigen, dass anscheinend eine geringere Capsid-Phosphorylierung mit einer verminderten Sekretion von Viren einhergeht, sie aber immer noch erlaubt.

Eine Blockierung der intrazellulären PKC könnte dadurch ausgeglichen werden, dass eine andere Proteinkinase, oder andere nicht-inhibierte Isotypen der PKC, deren Funktion in der Capsid-Phosphorylierung übernehmen. Daher wurden die Capsid-Phosphorylierungen unter Zugabe des gleichen Inhibitors analysiert. Da anscheinend nur für das Peptid eine verminderte Virussekretion zu sehen war, wurde nur dieser weiter eingesetzt. Der Inhibitor wurde in der zehnfachen IC_{50} eingesetzt.

Abb. 24A und B zeigen, dass die Zugabe von Peptid 19-27 die endogene Phosphorylierung um 95 % gegenüber der nicht-inhibierten Kontrolle aus unbehandelten Zellen reduziert. Hier scheint also keine andere Proteinkinase verpackt worden zu sein.

Die reduzierte Aktivität in aus Viren isolierten Capsiden, die aus den Peptid-Inhibitor-behandelten Zellen stammten, bedeutet also, dass weniger aktive PKC verpackt worden war. Unter der Annahme, dass jedoch nur ein PKC-Molekül pro Capsid verpackt werden kann, müssten also Capside umhüllt worden sein, die keine Proteinkinase verpackt hatten. Da jedoch die Phosphorylierung durch PKC eine Voraussetzung für die Virussekretion zu sein

scheint, bedeutet dies, dass anscheinend auch eine Phosphorylierung der Core-Proteine durch eine PKC vor der Capsidbildung für eine Sekretion ausreichend sein kann.

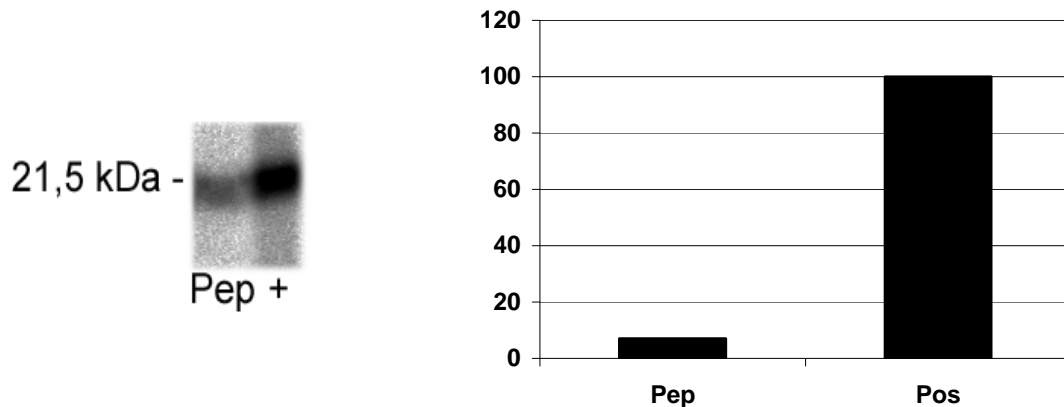


Abbildung 24A: Hemmung der endogenen Proteinkinase durch PKC-Inhibitor Pep in Capsiden aus Virionen (Genotyp D) im Überstand von mit Inhibitor behandelten HepG2.2.15-Zellen

1 h Präinkubation des Inhibitor bei $10 \times IC_{50}$, danach Phosphorylierung, Auftrennung im 15% SDS-PAGE und Phosphoimager-Scan. +: Positiv-Kontrolle ohne Inhibitor; Pep: Peptid 19-27

Abbildung 24B: Quantitative Auswertung des Phosphoimager-Scans von Abb. 24A

y-Achse: Aktivität in Prozent, x-Achse: eingesetzter Inhibitor

Diese Ergebnisse korrelieren mit der veränderten Lokalisation der Capside im vorherigen Experiment. Wird die Phosphorylierung durch das Peptid 19-27 gehemmt, verändert sich sowohl die Verpackung in die Hüllproteine als auch deren intrazelluläre Verteilung.

4 Diskussion

4.1 Potentielle Phosphorylierungsstellen und Proteinkinasen des HBV Capsid

Das Hepatitis B Virus Capsid besitzt am Carboxyterminus 7 Serinreste, welche als potentielle Phosphorylierungsstellen genutzt werden können.

Mit Hilfe des Programms Motif Scan (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml, zuletzt kontaktiert Januar 2007, 63 Proteinkinasen werden berücksichtigt) wurde nach möglichen Zielsequenzen für Phosphorylierungen in den Core-Proteinen der Genotypen A-H gesucht. So findet man folgende Proteinkinasen als potentielle Kandidaten:

Tabelle 6: Potentielle Proteinkinasen für die Hepatitis B Virus Genotypen A-H

Gruppe	Proteinkinasentyp
Src homology 3 group (SH3)	Abl SH3
Basophile Serin/Threonin-Kinasen	Proteinkinase A Proteinkinase C α, β, γ Clk-2
Prolin abhängige Serin/Threonin-Kinasen	cdk-5, cdk-2

Abkürzungen der Kinasen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

Vergleicht man die Genotypen untereinander, so finden sich bei allen Zielsequenzen für die oben aufgelisteten Proteinkinasen. Ausnahmen stellen eine zusätzliche Erk-1 Kinase für Subtypen des Genotyp A und eine zusätzliche PDK1-Binding-Site bei einem Subtyp des Genotyp B dar.

Betrachtet man nun die Phosphorylierungsstellen so findet das Programm 6 potentielle Phosphorylierungssequenzen; bei den betrachteten Sequenzen des Genotypen H nur 5 Stellen. Vergleicht man diese Stellen so werden hauptsächlich Serine in Position 155, 162, 170 und 176 bei den Genotypen B, C, D, E, F und H phosphoryliert. (Ausnahme bildet die Stelle S155, welche bei Genotyp H nicht vorgesehen ist). Für den Genotyp A finden sich die Phosphorylierungsstellen um 2 Aminosäuren in Richtung Carboxyterminus verschoben (Serin 157, 164, 172, 178). Für den Genotyp G sind die Stellen ebenfalls in Richtung des Carboxyterminus verschoben (Serin 167, 174, 182, 188). Als weitere Stelle findet sich ein Threonin in Position 160, Ausnahme bilden Genotyp A und G, hier Position 162.

Neben den Serin/Threonin Kinasen wurde für Prolin 135 die Proteinkinase Abl SH3 Proteinkinase als Kandidat gefunden. Die einzige Ausnahme stellt der Genotyp G dar, bei dem sich diese Zielsequenz bei Prolin 147 findet. Trotz der Ausnahmen kann man zusammenfassend sagen, dass die Phosphorylierungsstellen - selbst bei WHV - hoch konserviert sind und nur geringen Schwankungen unterlegen sind, was auf eine große Bedeutung für den viralen Lebenszyklus hinweist.

Tabelle 7: Phosphorylierungsstellen der verschiedenen HBV Genotypen

Obere Zeile: Genotypen des HB Virus. Erste Kolonne: Hauptphosphorylierungsstellen. In Grau: Übereinstimmende Phosphorylierungsstellen mit den in der ersten Kolonne aufgeführten Phosphorylierungsstellen. In Weiß: Im Feld findet sich die jeweilige Phosphorylierungsstelle. x: Phosphorylierungsstelle fehlt. Zur Vereinfachung wurden die vereinzelt gefundenen sonstigen Phosphorylierungsstellen nicht mit aufgeführt.

	A	B	C	D	E	F	G	H
P135							P147	
S155	S157						S167	x
S162	S164						S174	
S170	S172						S182	
S176	S178						S188	
T160	T162						T162	

4.2 Phosphorylierung und Genomreifung

4.2.1 Proteinkinasen und HBV

Eine Proteinkinaseaktivität wurde für Hepatitis B das erste Mal im Jahre 1980 von Albin und Robinson beschrieben (Albin and Robinson, 1980). Gerlich et al. (Gerlich et al., 1982) beschrieb eine derartige Aktivität in Capsiden, die aus HBV-infizierter Leber aufgearbeitet worden war und die zu einer Phosphorylierung von Serinresten führte. In der Literatur wurden folgende Proteinkinasen, welche für die Capsid-Phosphorylierung eine Rolle spielen sollen, beschrieben. Zum einen ist dies eine GAPD-Proteinkinase, welche Core-Partikel, die aus HBV infizierter menschlicher Leber gewonnen wurden, phosphorylierte (Duclos Vallee et al., 1998). Eine weitere sogenannte Core-assoziierte-Serin-Kinase (CAK) mit einem Molekulargewicht von 46 kDa wurde in intrazellulären Core-Partikeln und extrazellulären Virionen beschrieben (Kau and Ting, 1998). Die Capside bzw. Viren in diesen Untersuchungen wurden aus HuH-7 Zellen (bzw. deren Überstand) isoliert, die mit dem HBV Genom-tragenden Plasmid pHBV3.6 transfiziert worden waren.

Eine Verpackung einer Proteinkinase C wurde in Core-Partikeln aus HBV infizierter menschlicher Leber nachgewiesen (Kann and Gerlich, 1994; Kann et al., 1993). Des Weiteren wurden eine SRPK-1 und SRPK-2 Kinase für eine intrazelluläre Phosphorylierung der Core-Proteine beschrieben (Daub et al., 2002).

4.2.2 Lokalisation der Proteinkinase

Die Phosphorylierung ist eng mit der Genomreifung verknüpft, denn die Phosphorylierung an Serin 162, zumindest einiger Coreproteine, ist essentiell für die Verpackung der prägenomischen RNA (Gazina et al., 2000). Die Phosphorylierung am Serin 170 scheint essentiell für die DNA Synthese zu sein (Gazina et al., 2000; Lan et al., 1999; Le Pogam et

al., 2005), während die Wirkung der Phosphorylierung an Serin 155 für die DNA Synthese kontroverse Ergebnisse lieferte (essentiell: (Melegari et al., 2005), nicht essentiell: (Lan et al., 1999)). Die Phosphorylierung der Coreproteine bewirkt zudem Strukturveränderungen des Capsids, die zu einer Exposition eines Kerntransportsignals auf der Capsidoberfläche führt (Kann et al., 1999), was den Transport von Capsid und Genom in den Zellkern nach sich zieht (Rabe et al., 2003), sowie eine Destabilisierung der Capside, wie von Köck et al. sowohl für das HBV Capsid, wie auch das DHBV Capsid gezeigt wurde (Köck et al., 2004).

Die Phosphorylierung der Coreproteine kann zu verschiedenen Zeitpunkten stattfinden, d.h. sowohl vor der Bildung als auch nach der Bildung der Capside. Auch die verschiedenen Phosphorylierungsstellen können zu unterschiedlichen Zeiten phosphoryliert werden. Berücksichtigen muss man auch, dass vor dem Assembly der Coreproteine intrazellulär potentiell viele verschieden Proteinkinasen zur Verfügung stehen. Nach dem Assembly ist es wahrscheinlich, dass aufgrund des begrenzten Platzes innerhalb des Capsides (26 nm bei T4 Symmetrie) nur ein Proteinkinase-Molekül (geschätzt 8 nm und zusätzlich 8 nm für die Polymerase) verpackt wird.

In den vorbereitenden Versuchen wurde die Versuchsabfolge für den Nachweis der Proteinkinaseaktivität optimiert. Hierbei zeigte sich, dass die Phosphorylierung langsam abläuft. Dies erscheint plausibel, da die Proteinkinase im Inneren der Capside lokalisiert ist (Gerlich et al., 1982), das zugesetzte ATP also erst durch die 2 nm-messenden Poren der Capsidhülle ins Lumen der Capside diffundieren muss.

Da auch die Proteinkinaseinhibitoren zunächst ins Innere der Partikel gelangen müssen, wurden die Capside mit den Inhibitoren präinkubiert. Die Bedeutung dieser Zeitspanne wurde im Vergleich zwischen der 1 und der 3 stündigen Präinkubation deutlich, wie sie in Tabelle 8 dargestellt ist. Dieser Befund erklärt auch die fehlende Inhibition durch PKC-Inhibitoren, wie sie von Duclos Vallee et al. (Duclos Vallee et al., 1998), beobachtet wurden, die eine G3PDH als Capsid-verpackte Proteinkinase beschrieben.

Inkubiert man aus Plasma aufgereinigte Viren des Genotyps C mit verschiedenen Inhibitoren der Proteinkinase C in einer der IC_{50} entsprechenden Konzentration, so zeigt sich bestenfalls eine Inhibition der Aktivität auf 60 %; wobei – der Konzentration entsprechend – eine maximale Inhibition von 50% zu erwarten gewesen wäre. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass zumindest in einem Teil der Capside eine Proteinkinase C verpackt wird.

Tabelle 8: Inhibition in aus Plasma aufgereinigten Viren

GT C: Genotyp C; Prä: Präinkubation; Angaben in %; Ro: Ro-32-0432; Pep: Peptid 19-27; Gö: Gö 6976; Cal: Calphostin C; Chel: Chelerythrine Chloride (Zusammenfassung Abb.14A-B)

GT C	Ro	Pep	Gö	Cal	Chel
1 x IC₅₀ 1h Prä	120	60	90	120	100

Dass nicht alle Inhibitoren zu einer Aktivitätsminderung führten, konnte zum einen durch eine nicht ausreichende Endkonzentration der Inhibitoren in den Capsiden erklärt sein und zum anderen war nicht auszuschließen, dass auch andere Proteinkinasen verpackt sind. Um dies zu überprüfen, wurde eine höhere Konzentration der Inhibitoren in den Versuchsansätzen gewählt.

Tabelle 9: Inhibition in aus Plasma aufgereinigten Viren

GT D: Genotyp D; Prä: Präinkubation; Angaben in %; Abkürzungen der Inhibitoren s. Tab. 8 beschrieben. (Zusammenfassung Abb. 13A-C)

GT D	Ro	Pep	Gö	Cal	Chel
10 x IC₅₀ 1h Prä	100	80	90	80	80
10 x IC₅₀ 3h Prä	40	40	80	20	<5

Es zeigt sich, dass durch eine höhere Konzentration bessere Inhibitionen erreicht wurden, wobei weniger die Inhibitorkonzentration, als die Präinkubation entscheidend ist.

man davon ausgehen, dass eine Proteinkinase C verpackt wird, die nicht der μ -Isoform entspricht.

Die Inhibition durch Gö 6976 grenzt auf Ca^{++} -abhängigen PKC der Isoformen α , β und γ ein. Ro-32-0432, das an die ATP-Bindungsstellen der PKCs angreift, weist eine konzentrationsabhängige Spezifität für die Isotypen α und β auf, wobei bei einer einfachen IC_{50} nur PKC α inhibiert wird. Der Vergleich zwischen den Inhibitionsraten bei einfacher und zehnfacher IC_{50} deutet also auf eine verpackte PKC β hin. Übereinstimmend zeigt das Peptid 19-27, eine myristylierte Pseudosubstratsequenz der Isotypen α und β , eine deutliche Inhibition auch schon bei der IC_{50} . Die Inhibitionsraten von über 95% zeigen damit, dass mehr oder minder ausschließlich diese PKC an der Phosphorylierung beteiligt ist, die nach Capsidaufreinigung aktiv ist.

Zum Vergleich mit Viren aus Zellkultur, wurden Viren aus dem Zellkulturüberstand von HepG2.2.15 Zellen mit der 10 fachen IC_{50} inkubiert. Da Viren aus Zellkultur instabiler sind, wurde dies auch für die Capside nicht ausgeschlossen. Daher wurde - um einen Zerfall der Capside zu verhindern - nur 1,5 h mit dem jeweiligen Inhibitor präinkubiert.

Tabelle 10: Inhibition in Viren aus Zellkulturüberstand

GT D: Genotyp D; Prä: Präinkubation; Angaben in %; Abkürzungen der Inhibitoren s. Tab 8 beschrieben. (Zusammenfassung Abb.16A-B)

GT D Zell	Ro	Pep	Gö	Cal	Chel
10 x IC_{50} 1,5 h Prä	80	60	100	80	80

Das Inhibitionsmuster bestätigte, dass in Capsiden aus Zellkultur ebenfalls eine Proteinkinase C vorliegt; die Verpackung also unabhängig vom Genotyp und von der Ursprungszelle ist.

4.2.4 Funktion der Proteinkinase

Wie oben erwähnt kann die Phosphorylierung der Coreproteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden (Abb. 26). Betrachtet man die Coreproteine vor ihrem Assembly zu Capsiden, so liegen diese meist als Dimere vor. Auch schon zu diesem Zeitpunkt kann es zu einer Phosphorylierung durch eine zelluläre Proteinkinase kommen. Nun kann es zu einem Assembly von unphosphorylierten oder nur teilphosphorylierten Core-Proteinen kommen, die entweder eine Proteinkinase verpacken oder auch nicht. Zumindest in Capsiden mit teilphosphorylierten Core-Proteinen ist weiterhin denkbar, dass ein Teil der Carboxytermini durch die 2 nm Poren der Capside nach außen transloziert vorliegt und wiederum durch eine externe/zelluläre Proteinkinase phosphoryliert wird.

Außerdem können sich auch schon phosphorylierte Coreproteine zu einem Capsid zusammenschließen. Ebenso ist es dann denkbar, dass ausschließlich RNA verpackt wird bzw. RNA und eine Proteinkinase. Liegt eine Proteinkinase verpackt vor, so kann diese die Carboxytermini von intern phosphorylieren.

Betrachtet man nun die Reifung der Capside bzw. der Virionen, so ist es auch hier denkbar, dass eine prägenomischer RNA-POL Komplex ohne Proteinkinase verpackt wird, da die für diese Verpackung notwendige Phosphorylierung von einer zelluläre Proteinkinase übernommen wurde. Wird eine Proteinkinase mit verpackt, so kann diese wiederum weitere Carboxytermini intern phosphorylieren bevor es zu einer Genomreifung kommt, dies muss jedoch nicht geschehen. Wenn die Carboxytermini nicht ausreichend phosphoryliert werden, ist es denkbar, dass es zu einer Topologieänderung kommt und sich die Carboxytermini durch die Poren nach außen stülpen und somit wieder für eine externe also zelluläre Proteinkinase zugänglich wären (siehe Abbildung 26).

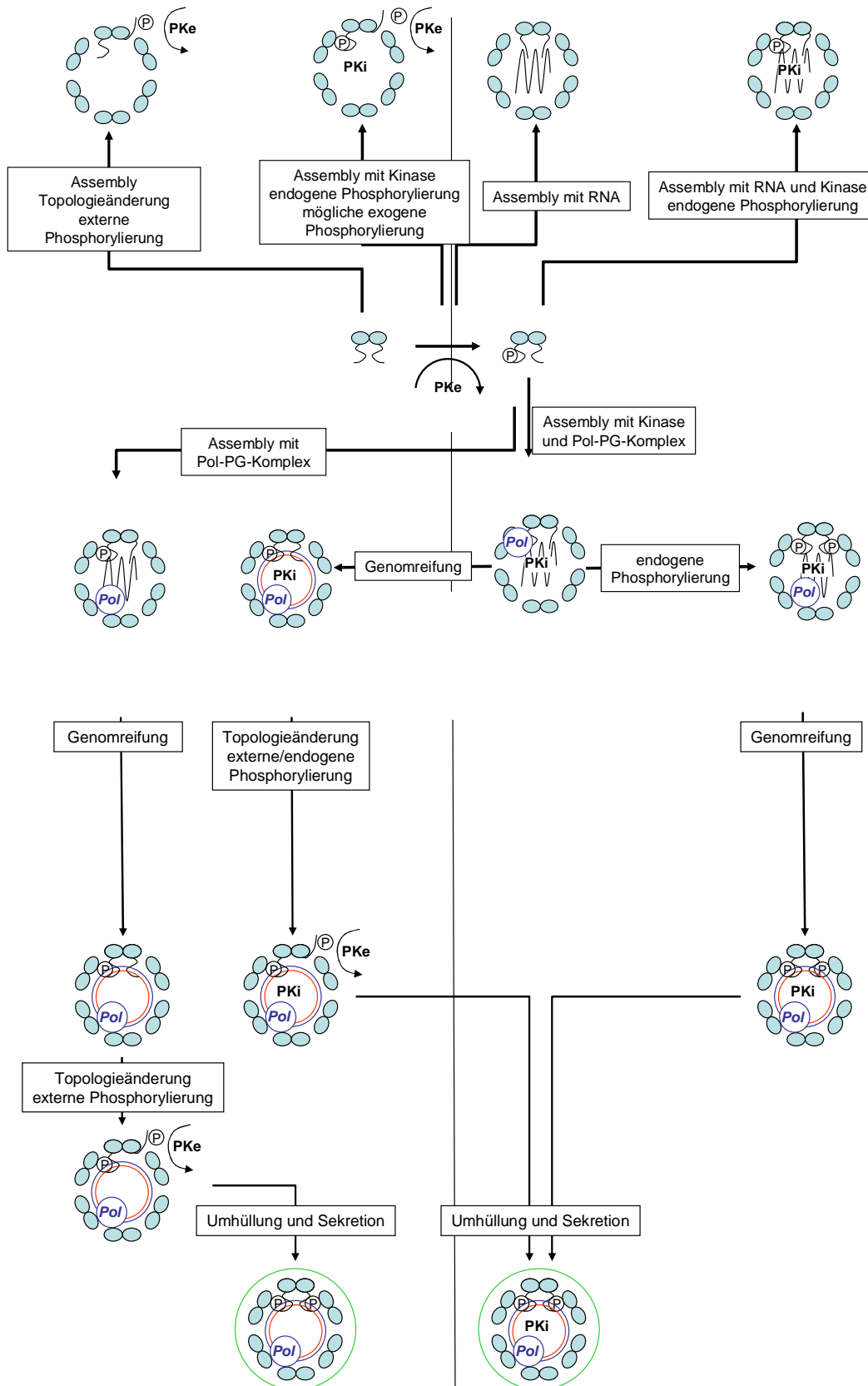



Abbildung 26: Phosphorylierungsmöglichkeiten der Core-Proteine

POL: Polymerase; PKi: interne Proteinkinase; PKe: externe Proteinkinase; P: Phosphatrest ;  : Core-Protein-Dimer mit Carboxyterminus

Die Vielzahl der möglichen Phosphorylierungsereignisse lässt also keinesfalls den Schluss zu, dass die Proteinkinase, die in den isolierten Capsiden bzw. Virionen anzutreffen ist, tatsächlich eine Rolle im Lebenszyklus der HBV zukommt. Weiterhin bieten diese theoretischen Erwägungen auch eine Erklärung für die unterschiedlichen Proteinkinasen, die in der Literatur beschrieben sind. So könnten die GAPD-Proteinkinase (Duclos Vallee et al., 1998) und SRPK-1/2 Kinase (Daub et al., 2002) an der intrazellulären Phosphorylierung beteiligt sein, ohne in Virionen zu erscheinen. Die 46 kDa Core-assoziierte-Serin-Kinase (Kau and Ting, 1998), die in intrazellulären Capsiden und Capsiden aus Virionen beschrieben wurde, könnte ein enzymatisch aktives Degradationsprodukt der PKC – die so genannte Proteinkinase M - sein, wie sie auch von Kann et al. für Capside aus humaner HBV-infizierter Leber beschrieben wurde (Kann et al., 1993). Der eigene Befund einer Virionen-assoziierten Proteinkinase C steht also nicht im Widerspruch zu den heterogen erscheinenden publizierten Ergebnissen, sondern lässt nur die Frage nach deren Bedeutung im Rahmen des viralen Lebenszyklus offen.

Daher wurden Proteinkinase C Inhibitoren HepG2.2.15-Zellkulturen – die stabil infektiöses HBV produzieren – zugesetzt und der Effekt auf die Virusproduktion untersucht. Da zum Zeitpunkt der experimentellen Untersuchungen lediglich Daten über die Zellpermeabilität von dem Inhibitor Peptid 19-27 und Ro-32-0432 vorlagen, wurden nur diese verwendet. Da Proteinkinase C Inhibitoren Apoptose induzieren, wurde als höchste Inhibitorkonzentration die doppelte IC_{50} gewählt und für eine Inkubationszeit von 5 Tagen eingesetzt, zu der morphologisch noch keine Toxizität beobachtet wurde.

Betrachtet man die Phosphorylierbarkeit der intrazellulären Core-Partikel, so zeigt sich sowohl für Ro als auch für das Peptid eine Reduktion der Phosphorylierung auf 40%. Diese Beobachtung belegte, dass eine inhibitorische intrazelluläre Konzentration der Inhibitoren vorlag, die in etwa der Konzentration im Medium entsprach. Die Bestimmung von HBsAg im Überstand war gegenüber unbehandelten Zellen unverändert, was anzeigte, dass der HBV-Sekretionspfad nicht signifikant inhibiert war. Diese Beobachtung bedeutete weiter, dass der PreS1-Phosphorylierung, wie sie von (Grgacic et al., 1998) beschrieben wurde, entweder keine signifikante Bedeutung bei der Hüllproteinsekretion zukommt, oder aber dass diese von einer anderen Proteinkinase vermittelt wird. Die unveränderte Menge von HBeAg im Überstand bestätigte, dass der Sekretionspfad unbeeinträchtigt war, zeigte aber auch ferner, dass wahrscheinlich keine Inhibition des Core/Präcore-Promotors vorlag. Dessen ungeachtet war intrazellulär jedoch eine 3 fache Anreicherung von Core-Partikeln in den mit Inhibitor behandelten Zellen zu beobachten.

Als Interpretationen dieses Befundes bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Zum einen könnte die inhibierte Phosphorylierung die Stabilität der Capside erhöhen, wie es von Köck et al. beschrieben wurde (Köck et al., 2004). Da Capside gegenüber den Core-Proteinen

eine wesentlich längere Halbwertszeit aufweisen (> 24 h gegenüber 3 h, (Deres et al., 2003)) würde daraus eine Capsidamplifikation folgen. Zum anderen könnte dieser Befund aber auch anzeigen, dass die Capsidmenge innerhalb der Zellen durch die Sekretion von Capsiden reguliert ist. In der Tat wurde für DHBV gezeigt, dass eine Verhinderung der Capsidverpackung durch Mutagenese der Hüllproteine eine intrazelluläre Akkumulation der viralen cccDNA verursachte (Summers et al., 1990), was impliziert, dass die intrazelluläre Menge genomhaltiger-Capside durch Virussekretion reguliert ist.

Um diesen möglichen Mechanismus näher zu untersuchen, wurde die Menge genomhaltiger Viren im Überstand bestimmt. Zwar zeigte sich eine auf 60% reduzierte Virussekretion in den mit dem inhibitorischen Peptid behandelten Zellen, jedoch zeigte sich die Sekretion in den Ro-32-0432 behandelten Ansätzen unverändert. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass Ro-32-0432 unter den gewählten Inhibitorkonzentrationen PKC α inhibiert, nicht aber PKC β , während das Peptid beide Isoformen gleichermaßen blockiert. Daher ist wahrscheinlich, dass selektiv PKC β einen Einfluss auf die Umhüllung der Capside hat. Übereinstimmend damit zeigte die Inhibition der verpackten PKC in Capsiden aus Viren unbehandelter Zellen unter der einfachen IC₅₀ (s.o.) zwar eine 40 %ige Reduktion durch das Peptid, jedoch keinerlei Effekt durch Ro-32-0432.

Diesen Annahmen zufolge würden also verschiedene PKC-Isoformen intrazellulär die Core-Proteine phosphorylieren können, aber nur die PKC β würde eine Phosphorylierung bewirken, die essentiell für die Verpackung der Capside in die Hüllproteine ist. Dies würde jedoch bedeuten, dass in den trotz Peptidzugabe sekretierten Viren nach wie vor PKC β vorhanden sein müsste.

Um dies zu überprüfen wurden Capside aus dem Zellkulturüberstand der mit Peptid behandelten Zellen einer Phosphorylierung unterworfen und die Proteinkinaseaktivität in Gegenwart des Peptid-Inhibitors untersucht. Tatsächlich zeigte sich eine Reduktion der Phosphorylierung im selben Maße wie in unbehandelten Viruscapsiden. Die Capside waren also in der Menge reduziert, wiesen aber die gleiche Phosphorylierungscharakteristik wie Capside aus unbehandelten Zellen auf. Unter der Annahme, dass nur ein Proteinkinasemolekül pro Capsid verpackt wird, war diese Beobachtung zu erwarten. Die inkomplette intrazelluläre Inhibition durch das Pseudosubstrat erlaubte weniger Proteinkinasemolekülen verpackt zu werden, was zu einer Reduktion der Virussynthese führte. Offen bleibt hierbei, ob die Zugabe des Pseudosubstrats die Verpackung einer inhibierten PKC β erlaubt, oder aber ob keine PKC verpackt wird, z. B. weil die Core-PKC β -Interaktion über die enzymatisch aktive PKC-Domäne vermittelt wird, oder ob die Verpackung über die Pseudosubstratdomäne erfolgt, die dann mit dem Pseudosubstrat um die korrespondierende Bindungsstelle auf den Core-Proteinen konkurrieren würde.

Weiterhin zeigte diese Beobachtung, dass der "Wegfall" der offensichtlich essentiellen PKC β nicht durch die Verpackung einer anderen Proteinkinase kompensiert werden konnte.

Mutageneseexperimente Anderer zeigten, dass ein Austausch jedes einzelnen Serins der Positionen 157, 164, 172 und 178 (Genotyp A HBV991) die Genomreifung um mindestens den Faktor 10 reduzierten und auch diese Mutanten keine Virussekretion aus transfizierten Zellen erlaubten (Stefan Schmehl, pers. Mitteilung). Zusätzlich zeigten Gerelsaikhan und Bruss (Gerelsaikhan et al., 1996), dass die Genomreifung eine Voraussetzung für die Virussekretion darstellt. Daher lassen die hier dargestellten Experimente offen, ob die Inhibition der Phosphorylierung eventuell indirekt über die Inhibition der Genomreifung die Verpackung der Capside in die Hüllproteine verhindert hat.

Dessen ungeachtet erweitern die dargestellten Experimente die bisherigen Erkenntnisse: Intrazellulär findet eine zumindest teilweise ablaufende Phosphorylierung der Core-Proteine vor dem Assembly der Capside statt. Diese Phosphorylierung – zumindest an Serin 162 - ist essentiell für die Verpackung des Polymerase-Prägenom Komplexes in das Lumen der Capside (Gazina et al., 2000). Die vermutlich durch eingeschränkte Degradation hervorgerufene Akkumulation der intrazellulären Capside nach Inhibitorgabe deutet jedoch an, dass es sich nicht nur um die Phosphorylierung einiger weniger Untereinheiten handelt. Wie die Inhibitionsexperimente zeigten, sind hieran mehrere verschiedene Proteinkinasen beteiligt, nicht nur die PKC β . Ausschließlich diese PKC-Isoform ist jedoch essentiell für das weitere Schicksal der genomhaltigen Capside. In Analogie zum DHBV Capsid, welches zunächst an Serin 245 unphosphoryliert sein muss, um stabile Capside zu bilden, später dann aber phosphoryliert werden muss, um die Infektion neuer Zellen zu erlauben, dürfte der PKC β diese Rolle für das HBV Capsid zukommen. Dafür spricht auch, dass PKC β die einzige Proteinkinase ist, die in isolierten Capsiden noch aktiv ist. Deren Bedeutung wird auch dadurch unterstrichen, dass sie in allen untersuchten Capsiden vorkommt, unabhängig von Genotyp, infizierter Person oder Herkunft aus Zellkultur.

5 Literaturverzeichnis

- Acs, G., Sells, M.A., Purcell, R.H., Price, P., Engle, R., Shapiro, M. and Popper, H. (1987) Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 4641-4644.
- Albin, C. and Robinson, W.S. (1980) Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol*, **34**, 297-302.
- Bartenschlager, R. and Schaller, H. (1992) Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *Embo J*, **11**, 3413-3420.
- Beasley, R.P., Hwang, L.Y., Lin, C.C. and Chien, C.S. (1981) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*, **2**, 1129-1133.
- Beck, J. and Nassal, M. (2003) Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J Biol Chem*, **278**, 36128-36138.
- Bell, R.M. and Burns, D.J. (1991) Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem*, **266**, 4661-4664.
- Berting, A., Fischer, C., Schaefer, S., Garten, W., Klenk, H.D. and Gerlich, W.H. (2000) Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res*, **68**, 35-49.
- Bock, C.T., Schranz, P., Schroder, C.H. and Zentgraf, H. (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes*, **8**, 215-229.
- 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**, 9350-9357.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R. and Gerlich, W.H. (1994) Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *Embo J*, **13**, 2273-2279.

-
- Budkowska, A., Bedossa, P., Groh, F., Louise, A. and Pillot, J. (1995) Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain. *J Virol*, **69**, 840-848.
- Chang, F.S., Netter, H.J., Bruns, M., Fröhlich, K. and Will, H. (1998) Identification and Characterization of a new avian Hepadnavirus derived from Snow Goose. *Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*, San Diego, CA, USA.
- Charnay, P., Pourcel, C., Louise, A., Fritsch, A. and Tiollais, P. (1979) Cloning in *Escherichia coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2222-2226.
- Cherrington, J., Russnak, R. and Ganem, D. (1992) Upstream sequences and cap proximity in the regulation of polyadenylation in ground squirrel hepatitis virus. *J Virol*, **66**, 7589-7596.
- Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U. and Ullrich, A. (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*, **233**, 859-866.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V. and Pumpens, P. (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, **77**, 943-950.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. and Briggs, M. (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, **1**, 695-698.
- Daub, H., Blencke, S., Habenberger, P., Kurtenbach, A., Dennenmoser, J., Wissing, J., Ullrich, A. and Cotten, M. (2002) Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol*, **76**, 8124-8137.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. and Messing, R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**, L429-438.

-
- Deres, K., Schroder, C.H., Paessens, A., Goldmann, S., Hacker, H.J., Weber, O., Kramer, T., Niewohner, U., Pleiss, U., Stoltefuss, J., Graef, E., Koletzki, D., Masantschek, R.N., Reimann, A., Jaeger, R., Gross, R., Beckermann, B., Schlemmer, K.H., Haebich, D. and Rubsamen-Waigmann, H. (2003) Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science*, **299**, 893-896.
- Disatnik, M.H., Buraggi, G. and Mochly-Rosen, D. (1994) Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res*, **210**, 287-297.
- Donello, J.E., Beeche, A.A., Smith, G.J.r., Lucero, G.R. and Hope, T.J. (1996) The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements. *J Virol*, **70**, 4345-4351.
- Duclos Vallee, J.C., Capel, F., Mabit, H. and Petit, M.A. (1998) Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol*, **79**, 1665-1670.
- Dutil, E.M., Keranen, L.M., DePaoli-Roach, A.A. and Newton, A.C. (1994) In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. *J Biol Chem*, **269**, 29359-29362.
- Fernholz, D., Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. and Will, H. (1993) Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology*, **194**, 137-148.
- Fischer, E.H. and Krebs, E.G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem*, **216**, 121-132.
- Franco, A., Paroli, M., Testa, U., Benvenuto, R., Peschle, C., Balsano, F. and Barnaba, V. (1992) Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J Exp Med*, **175**, 1195-1205.
- Gazina, E.V., Fielding, J.E., Lin, B. and Anderson, D.A. (2000) Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol*, **74**, 4721-4728.

-
- Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E. and Bruss, V. (1996) Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol*, **70**, 4269-4274.
- Gerlich, W. and Thomssen, R. (1975) Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume. *Dev Biol Stand.*, **30**, 78-87.
- Gerlich, W.H., Goldmann, U., Muller, R., Stibbe, W. and Wolff, W. (1982) Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J Virol*, **42**, 761-766.
- Gerlich, W.H. and Robinson, W.S. (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*, **21**, 801-809.
- Glebe, D., Aliakbari, M., Krass, P., Knoop, E.V., Valerius, K.P. and Gerlich, W.H. (2003) Pre-S1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol*, **77**, 9511-9521.
- Glebe, D. and Gerlich, W.H. (2004) Study of the endocytosis and intracellular localization of subviral particles of hepatitis B virus in primary hepatocytes. *Methods Mol Med*, **96**, 143-151.
- Glebe, D., Urban, S., Knoop, E.V., Cag, N., Krass, P., Grun, S., Bulavaite, A., Sasnauskas, K. and Gerlich, W.H. (2005) Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*, **129**, 234-245.
- Gong, S.S., Jensen, A.D., Chang, C.J. and Rogler, C.E. (1999) Double-stranded linear duck hepatitis B virus (DHBV) stably integrates at a higher frequency than wild-type DHBV in LMH chicken hepatoma cells. *J Virol*, **73**, 1492-1502.
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P. and Helenius, A. (1993) Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, **75**, 477-486.
- Grethe, S., Heckel, J.O., Rietschel, W. and Hufert, F.T. (2000) Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol*, **74**, 5377-5381.

-
- Grgacic, E.V., Lin, B., Gazina, E.V., Snooks, M.J. and Anderson, D.A. (1998) Normal phosphorylation of duck hepatitis B virus L protein is dispensable for infectivity. *J Gen Virol*, **79**, 2743-2751.
- Gripon, P., Canine, I. and Urban, S. (2005) Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol*, **79**, 1613-1622.
- Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S. and Saito, T. (1999) PKC ν , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . *Biochim Biophys Acta*, **1450**, 99-106.
- Hertogs, K., Leenders, W.P., Depla, E., De Bruin, W.C., Meheus, L., Raymackers, J., Moshage, H. and Yap, S.H. (1993) Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology*, **197**, 549-557.
- House, C. and Kemp, B.E. (1987) Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*, **238**, 1726-1728.
- Hu, J. and Anselmo, D. (2000) In vitro reconstitution of a functional duck hepatitis B virus reverse transcriptase: posttranslational activation by Hsp90. *J Virol*, **74**, 11447-11455.
- Huang, J. and Liang, T.J. (1993) A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol*, **13**, 7476-7486.
- Huang, Z.M. and Yen, T.S. (1995) Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol*, **15**, 3864-3869.
- Huang, Z.M., Zang, W.Q. and Yen, T.S. (1996) Cellular proteins that bind to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element. *Virology*, **217**, 573-581.
- Hunter, T., Lindberg, R.A., Middlemas, D.S., Tracy, S. and van der Geer, P. (1992) Receptor protein tyrosine kinases and phosphatases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **57**, 25-41.

-
- Junker Niepmann, M., Bartenschlager, R. and Schaller, H. (1990) A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *Embo J*, **9**, 3389-3396.
- Kann, M. and Gerlich, W.H. (1994) Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol*, **68**, 7993-8000.
- Kann, M. and Gerlich, W.H. (2005) Hepatitis B. In Mahy, B.W.J., Collier, L., Balows, A. and Sussman, M. (eds.), *Microbiology and Microbial Infections*. Arnold, London, Sydney, Auckland, Vol. 1.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H. and Helenius, A. (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **145**, 45-55.
- Kann, M., Thomssen, R., Kochel, H.G. and Gerlich, W.H. (1993) Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus. *Arch Virol Suppl*, **8**, 53-62.
- Kaplan, P.M., Ford, E.C., Purcell, R.H. and Gerin, J.L. (1976) Demonstration of subpopulations of Dane particles. *J Virol*, **17**, 885-893.
- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. and Robinson, W.S. (1973) DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol*, **12**, 995-1005.
- Kau, J.H. and Ting, L.P. (1998) Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol*, **72**, 3796-3803.
- Kenney, J.M., von Bonsdorff, C.H., Nassal, M. and Fuller, S.D. (1995) Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure*, **3**, 1009-1019.
- Köck, J., Borst, E.M. and Schlicht, H.J. (1996) Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol*, **70**, 5827-5831.

-
- Köck, J., Kann, M., Putz, G., Blum, H.E. and von Weizsacker, F. (2003) Central role of a serine phosphorylation site within duck hepatitis B virus core protein for capsid trafficking and genome release. *J Biol Chem*, **278**, 28123-28129.
- Köck, J., Nassal, M., Deres, K., Blum, H.E. and von Weizsacker, F. (2004) Hepatitis B virus nucleocapsids formed by carboxy-terminally mutated core proteins contain spliced viral genomes but lack full-size DNA. *J Virol*, **78**, 13812-13818.
- Köck, J. and Schlicht, H.J. (1993) Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol*, **67**, 4867-4874.
- Krebs, E.G., Graves, D.J. and Fischer, E.H. (1959) Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J Biol Chem*, **234**, 2867-2873.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambert, C. and Prange, R. (2003) Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5199-5204.
- Lan, Y.T., Li, J., Liao, W. and Ou, J. (1999) Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology*, **259**, 342-348.
- Landers, T.A., Greenberg, H.B. and Robinson, W.S. (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol*, **23**, 368-376.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns, R.B., 3rd and Rico-Hesse, R. (1998) Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5757-5761.
- Le Pogam, S., Chua, P.K., Newman, M. and Shih, C. (eds.). (2005) *Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173)*.

-
- Leventhal, P.S. and Bertics, P.J. (1993) Activation of protein kinase C by selective binding of arginine-rich polypeptides. *J Biol Chem*, **268**, 13906-13913.
- Li, L., Dixon, R.J., Gu, X. and Newbold, J.E. (1998) Comparison of the DNA sequence of the grey teal, manded duck and duck hepatitis B virus. *Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*, San Diego, CA, USA.
- Lin, D.B., Tsai, T.P. and Chen, W.K. (2003) Seroprevalence of hepatitis C virus infection and its association with natural infection of hepatitis B virus among preschool children in Taiwan. *Eur J Epidemiol*, **18**, 245-249.
- Liu, N., Tian, R. and Loeb, D.D. (2003) Base pairing among three cis-acting sequences contributes to template switching during hepadnavirus reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1984-1989.
- Maeng, C.Y., Ryu, C.J., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C. and Hong, H.J. (2000) Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus PreS1. *Virology*, **270**, 9-16.
- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H. and Robinson, W.S. (1980) A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 2941-2945.
- Mason, W.S., Seal, G. and Summers, J. (1980) Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*, **36**, 829-836.
- Mehdi, H., Kaplan, M.J., Anlar, F.Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K. and Peeples, M.E. (1994) Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol*, **68**, 2415-2424.
- Melegari, M., Wolf, S.K. and Schneider, R.J. (2005) Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol*, **79**, 9810-9820.
- Mochly-Rosen, D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, **268**, 247-251.

-
- Mochly-Rosen, D., Henrich, C.J., Cheever, L., Khaner, H. and Simpson, P.C. (1990) A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul*, **1**, 693-706.
- Mochly-Rosen, D. and Kauvar, L.M. (2000) Pharmacological regulation of network kinetics by protein kinase C localization. *Semin Immunol*, **12**, 55-61.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J. (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, **42**, 3858-3863.
- Nassal, M. and Rieger, A. (1993) An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J Virol*, **67**, 4307-4315.
- Neurath, A.R., Kent, S.B., Parker, K., Prince, A.M., Strick, N., Brotman, B. and Sproul, P. (1986) Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine*, **4**, 35-37.
- Neurath, A.R., Strick, N. and Sproul, P. (1992) Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med*, **175**, 461-469.
- Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, **270**, 28495-28498.
- Norder, H., Ebert, J.W., Fields, H.A., Mushahwar, I.K. and Magnus, L.O. (1996) Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology*, **218**, 214-223.
- Orr, J.W. and Newton, A.C. (1994) Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J Biol Chem*, **269**, 27715-27718.
- Pante, N. and Kann, M. (2002) Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Mol Biol Cell*, **13**, 425-434.

-
- Parekh, D.B., Ziegler, W. and Parker, P.J. (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *Embo J*, **19**, 496-503.
- Ponsel, D. and Bruss, V. (2003) Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol*, **77**, 416-422.
- Pontisso, P., Ruvoletto, M.G., Gerlich, W.H., Heermann, K.H., Bardini, R. and Alberti, A. (1989) Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology*, **173**, 522-530.
- Prassolov, A., Hohenberg, H., Kalinina, T., Schneider, C., Cova, L., Krone, O., Frolich, K., Will, H. and Sirma, H. (2003) New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J Virol*, **77**, 1964-1976.
- Pult, I., Netter, H.J., Fröhlich, K., Kaleta, E.F. and Will, H. (1998) Identification, structural and functional analysis of a new avian hepadnavirus from storks (STHBV). *Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*, San Diego, CA, USA.
- Rabe, B., Glebe, D. and Kann, M. (2006) Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol*, **80**, 5465-5473.
- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A. and Kann, M. (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9849-9854.
- Robinson, W.S., Clayton, D.A. and Greenman, R.L. (1974) DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, **14**, 384-391.
- Seeger, C., Ganem, D. and Varmus, H.E. (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, **232**, 477-484.
- Seifer, M. and Standring, D.N. (1995) Assembly and antigenicity of hepatitis B virus core particles. *Intervirology*, **38**, 47-62.

-
- Seifer, M., Zhou, S. and Standing, D.N. (1993) A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* oocytes. *J Virol*, **67**, 249-257.
- Sells, M.A., Chen, M.L. and Acs, G. (1987) Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1005-1009.
- Sossin, W.S. and Schwartz, J.H. (1993) Ca(2+)-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem Sci*, **18**, 207-208.
- Spitaler, M. and Cantrell, D.A. (2004) Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol*, **5**, 785-790.
- Sprengel, R., Kaleta, E.F. and Will, H. (1988) Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol*, **62**, 3832-3839.
- Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M. and Vuento, M. (2003) Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology*, **316**, 267-280.
- Summers, J. and Mason, W.S. (1982) Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, **29**, 403-415.
- Summers, J., Smith, P.M. and Horwich, A.L. (1990) Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol*, **64**, 2819-2824.
- Summers, J., Smolec, J.M. and Snyder, R. (1978) A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 4533-4537.
- Sutherland, E.W., Jr. and Wosilait, W.D. (1955) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature*, **175**, 169-170.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979) Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem*, **254**, 3692-3695.

-
- Tavis, J.E. and Ganem, D. (1993) Expression of functional hepatitis B virus polymerase in yeast reveals it to be the sole viral protein required for correct initiation of reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4107-4111.
- Taylor, S.S. and Radzio-Andzelm, E. (1994) Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*, **2**, 345-355.
- Testut, P., Renard, C.A., Terradillos, O., Vitvitski Trepo, L., Tekaia, F., Degott, C., Blake, J., Boyer, B. and Buendia, M.A. (1996) A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol*, **70**, 4210-4219.
- Tiollais, P., Pourcel, C. and Dejean, A. (1985) The hepatitis B virus. *Nature*, **317**, 489-495.
- Toh, H., Hayashida, H. and Miyata, T. (1983) Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. *Nature*, **305**, 827-829.
- Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Stockert, R.J., Poralla, T. and Gerken, G. (1994) The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol*, **75 (Pt 11)**, 3021-3029.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A.J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J. and Harrison, T.J. (1988) The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*, **69 (Pt 6)**, 1383-1389.
- Vlachou, A. (1999) Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Hepatitis B Virus Nukleocapsiden und dem Zellkern. *Biologie*. Giessen, Giessen.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*, **243**, 3763-3765.
- Warren, K.S., Niphuis, H., Heriyanto, Verschoor, E.J., Swan, R.A. and Heeney, J.L. (1998) Seroprevalence of specific viral infections in confiscated orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Med Primatol*, **27**, 33-37.

- Webb, B.L., Hirst, S.J. and Giembycz, M.A. (2000) Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol*, **130**, 1433-1452.
- Weber, M., Bronsema, V., Bartos, H., Bosserhoff, A., Bartenschlager, R. and Schaller, H. (1994) Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol*, **68**, 2994-2999.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Buscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. and Schaller, H. (1987) Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*, **61**, 904-911.
- Zhou, S. and Strandberg, D.N. (1992) Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10046-10050.
- Zlotnick, A., Cheng, N., Stahl, S.J., Conway, J.F., Steven, A.C. and Wingfield, P.T. (1997) Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9556-9561.
- Zoulim, F. and Seeger, C. (1994) Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol*, **68**, 6-13.

Zusammenfassung

Für das Hepatitis B Virus wurden neben der Proteinkinase C noch vier andere potentielle Proteinkinasen (GAPD, CAK, SRPK-1, SRPK-2) beschrieben, die das Capsidprotein phosphorylieren können. Der Zeitpunkt der Phosphorylierungen – vor oder nach der Capsidbildung – ist jedoch unbekannt. Um die Natur und Funktion der Proteinkinasen zu untersuchen, wurden Versuche mit Isotyp-spezifischen Proteinkinase C Inhibitoren in assemblierten Capsiden durchgeführt. Um eine allgemeine Übertragbarkeit der Ergebnisse zu untersuchen, wurden verschiedene Genotypen des HBV, sowohl aus Patientenplasmen als auch aus Zellkultur, für die Experimente verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass unabhängig vom HBV-Genotyp und dem Ursprung der Capside eine Proteinkinase C des Isotyp α oder β verpackt worden war. Inhibitionen dieser PKC Isoformen in der stabil das HBV exprimierenden Zelllinie HepG2.2.15 belegten, dass die PKC-Phosphorylierung essentiell für die Verpackung der Capside in die Hüllproteine ist. Die Analyse der Proteinkinase in Virus-extrahierten Capsiden, die trotz PKC-Inhibition sekretiert worden waren belegte, dass auch diese PKC beinhalteten, also kein Ersetzen von PKC durch eine andere zelluläre Proteinkinase erfolgt. Korrespondierend zur herabgesetzten Virussekretion zeigte sich eine intrazelluläre Akkumulation von Capsiden, die allerdings auch durch eine erhöhte Stabilität der Capside bedingt gewesen sein könnte. Zusammengefasst zeigen die Befunde, dass das HBV Capsidprotein nach dem Capsidassembly spezifisch durch Proteinkinase C wahrscheinlich des Isotyps β phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung essentiell für den hepadnaviralen Lebenszyklus ist. Dessen ungeachtet erscheint es jedoch wahrscheinlich, dass der Capsidprotein-Phosphorylierung durch eine weitere Proteinkinase vor dem Assembly eine wesentliche Bedeutung zukommt, z.B. im Rahmen der Prägenom-Verpackung.

Abstract

Beside protein kinase C four other potential protein kinases (GAPD, CAK, SRPK-1, SRPK-2) were described for phosphorylation of the hepatitis B virus capsid protein. Whether phosphorylation takes place prior or after the capsid assembly is unknown. For characterization and function of the protein kinase within assembled capsids experiments with isotyp specific protein kinase C inhibitors were performed. Capsids from different HBV genotypes derived from patient plasma or from cell culture were used in order to allow general conclusion. It could be demonstrated that an isotyp α or β protein kinase C was present inside of the capsids. This finding was independent upon genotyp or origin of the capsids. Inhibition of these two isoforms in the stably HBV expressing cell line HepG2.2.15 showed that phosphorylation with protein kinase C was essentiell for capsid envelopment into the surface proteins. Analysis of the protein kinase in capsids of viruses, which were secreted despite the presence of the PKC inhibitor, demonstrated that these capsids still contained PKC. Hence, protein kinase C could not be replaced by another cellular protein kinase. Coherently to lower virus secretion an intracellular capsid accumulation was observed although increased capsid stability could not be excluded. In summary these results show that the HBV capsid protein after assembly becomes phosphorylated from a protein kinase C likely of the isotyp β . This phosphorylation is essential for the hepadnaviral life cycle. Despite of these findings a phosphorylation of the capsid protein before the assembly is likely. Presumably this modification is performed by another protein kinase and is essential e.g. in pregenome packaging.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zu Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. W.H. Gerlich für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Dieter Glebe für seine Betreuung und Unterstützung bei der theoretischen und praktischen Arbeit, sowie für die Bereitstellung der aus Plasma aufgereinigten Hepatitis B Viren.

Frau Dr. Tanja Tolle für anfängliche praktische Einarbeitung.

Frau Siegfried Broehl für die Anleitung bei den praktischen Arbeiten, insbesondere für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Zellkultur.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Virologie, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und immer für Fragen ein offenes Ohr hatten.

Meinen Freunden, die mich während der ganzen Zeit begleitet haben und mir während dieser Zeit zur Seite standen.

Meinen Eltern Elsbeth und Klaus Wittkop, sowie meinem Bruder Benjamin Wittkop, die immer für mich da waren und sind. Die mich immer unterstützt und gefördert haben.

Meinem Mann Michael Kann für seinen Optimismus und dass er immer an mich glaubt.

Curriculum vitae

Name : Wittkop
 Vorname : Linda
 Geburtsdatum : 19.09.1976
 Geburtsort : Lich
 Nationalität : deutsch

Ausbildung

10/2006-6/2007	Master Recherche Epidémiologie et Biostatistique am Institut de Santé publique d'Epidémiologie et Développement, Universität Bordeaux 2, Frankreich
9/2005-6/2006	Master Santé publique am Institut de Santé publique d'Epidémiologie et Développement, Universität Bordeaux 2, Frankreich
10/2004	Approbation
4/1997-5/2003	Studium der Humanmedizin, Justus Liebig Universität Giessen
6/1996	Abitur, Gymnasium Philippinum Weilburg

Praktika und Berufserfahrung

10/2004-08/2005	Assistenzärztin in der medizinischen Klinik 1, Klinikum Wetzlar-Braunfels
06/2003-09/2004	Ärztin im Praktikum in der medizinischen Klinik 1, Klinikum Wetzlar-Braunfels
12/2002-04/2003	Tertial Chirurgie des praktischen Jahres im Krankenhaus de la Princesa, Madrid, Spanien
08/2002-11/2003	Tertial Innere Medizin des praktischen Jahres in der medizinischen Klinik 1, Klinikum Wetzlar-Braunfels
04/2002-07/2002	Tertial Anästhesiologie (Wahlfach) des praktischen Jahres in der anästhesiologischen Abteilung, Klinikum Wetzlar-Braunfels

Sonstige Aktivitäten

8/1996-12/1996	Ausbildung an der Iwanson-Schule für zeitgenössischen Tanz, München
Seit 1997	Freiberufliche Tänzerin und Tanzlehrerin (u.a. Ballettschule Rausch Wetzlar-Braunfels-Weilburg, Tanzstudio A Giessen, Staatstheater Wiesbaden, Co-Leitung des Cross-Dance Projekt in 2004/2005)