

Institut für medizinische Virologie der Universität Gießen

**Untersuchung der Reife und der Stabilität  
intrazellulärer Hepatitis B Virus Nukleocapside**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Justus Liebig Universität Gießen

vorgelegt von  
Andreas Bischof  
aus Mullingar / Irland

Gießen, 1999

Dekan: Prof. Dr. W. Clauß

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Jost

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. H. Gerlich

<b>1</b>	<b>Abkürzungen und Einheiten</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2.1	Struktur des HBV .....	5
2.2	Replikationszyklus des HBV.....	6
2.3	Infektionsschritte bei anderen Viren .....	8
2.3.1	Anlagerung und Penetration.....	8
2.3.2	Kerntransport des Nukleocapsids.....	9
2.3.3	Dissoziation viraler Nukleocapside .....	10
2.3.4	Kernimport des viralen Genoms .....	10
2.4	Problemstellung und experimenteller Ansatz.....	12
2.5	Ziel der Arbeit.....	13
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1	Chemikalien und Enzyme.....	14
3.1.1	Antikörper.....	15
3.1.2	Zellen .....	15
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	15
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Eukaryote Zellkultur .....	17
3.2.2	Präparation von Zellkernen .....	18
3.2.3	Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15-Zellen .....	18
3.2.4	Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15- Zellkulturüberstand....	19
3.2.5	Nachweis und Quantifizierung von Core-Partikeln.....	19
3.2.5.1	ELISA.....	19
3.2.5.2	Nativer Western-Blot .....	20
3.2.5.3	Densitometrische Auswertung des Röntgenfilms .....	20
3.2.6	Markierung und Nachweis von Core-Komponenten .....	21
3.2.6.1	Endogene Polymerase-Reaktion.....	21
3.2.6.2	Endogene Proteinkinase C-Reaktion.....	21
3.2.6.3	Nachweis radioaktiver Core-Proteine und radioaktiver HBV-DNA .....	21
3.2.6.4	Darstellung und Quantifizierung <sup>32</sup> P-markierter Core-Partikel .....	22
3.2.7	Dichtegradientenzentrifugation von Core-Partikeln.....	24
3.2.7.1	Flotation .....	24
3.2.7.2	Dichtegradientensedimentation.....	24
3.2.8	Stabilitätsassay .....	24
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
4.1	Präparation, Markierung und Nachweis von Core-Partikeln .....	25
4.2	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von Core-Partikeln.....	28
4.2.1	Charakterisierung von Core-Partikeln in Nycodenz/TN.....	28
4.2.2	Verteilung der Core-assoziierten Enzymaktivitäten in Nycodenz-Dichtegradienten .....	33
4.2.3	Korrelation zwischen den viralen Enzymaktivitäten .....	40
4.2.4	Abhängigkeit der endogenen Polymeraseaktivität von der endogenen Core-Phosphorylierung .....	42
4.3	Destabilisierung von Core-Partikeln .....	44
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>49</b>
5.1	Verteilung von Core-Partikeln über den Dichtegradienten.....	50
5.2	Endogene Enzymaktivitäten.....	52
5.3	Zeitliche Abfolge von Polymerase-Reaktion und Phosphorylierung.....	56
5.4	Verteilung der verschiedenen endogenen Polymerase-Aktivitäten über den Dichtegradienten.....	57
5.5	Stabilität von Core-Partikeln.....	62
5.6	Modell des HBV-Replikationszyklus´ .....	67
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>68</b>

---

<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>69</b>
7.1	Experimentelle Daten .....	69
7.1.1	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von Core-Partikeln.....	69
7.1.2	Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation intrazellulärer Core-Partikel .....	70
7.1.3	Gleichgewichtsdichte von intrazellulären Core-Partikeln in Nycodenz.....	71
7.1.4	Verteilung extrazellulärer Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	72
7.1.5	Sedimentationsverhalten endogen phosphorylierter Core-Partikel .....	73
7.1.6	Spezifische Proteinkinase C-Aktivität .....	74
7.1.7	Spezifische Endogene Polymerase-Aktivität .....	75
7.1.8	Verteilung der HBV-Erststrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	76
7.1.9	Verteilung der HBV-Zweitstrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	77
7.1.10	Verteilung der HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	78
7.1.11	Korrelation der viralen Enzymaktivitäten .....	79
7.2	Verzeichnis der Abbildungen.....	81
7.3	Verzeichnis der Diagramme .....	82
7.4	Verzeichnis der Literatur .....	83

**1 Abkürzungen und Einheiten**

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
bkg	Background
BSA	Bovines Serum-Albumin
ca.	circa
ccc	covalently closed circular
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DMEM	DULBECCOs Modified EAGLE Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
ECL	Enhanced Chemoluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylenediamintetraaceticacid
EGTA	[Ethylenbis(oxyethylennitrilo)]tetraaceticacid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
endo.	endogene
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FKS	Foetales Kälberserum
G	Glycin
HBc	Hepatitis B Core Protein
HBs	Hepatitis B Surface Protein
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSC 70	Heat Shock Cognate 70 kDa
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
jpg	Image Expert Group
K	Lysin
L	Liter

---

LHBs	Large Hepatitis B Surface Protein
M	Molar
MHBS	Middle Hepatitis B Surface Protein
min	Minute
NP-40	Nonidet P-40
NLS	Nuclear Localization Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
Nr.	Nummer
N-Terminus	Aminoterminus
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PFA	Phosphonoformic Acid
PKC	Proteinkinase C
Pol.	Polymerase(-Reaktion)
PSL	Phosphor Stimulated Luminescence
PVDF	Polyvinylendifluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
rHBc	(rekombinante) in <i>E. coli</i> exprimierte Core-Partikel
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rotations per minute
RRL	Rabbit Reticulocyte Lysate
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHBs	Small Hepatitis B Surface Protein
SV 40	Simian Virus 40
T	Threonin
tif	Tagged Image File Format
TCA	Trichloroacetic Acid
TP	Transportpuffer
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
V	Valin
WGA	Wheat Germ Agglutinin
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight
v/v	volume/volume

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

## 2 Einleitung

Viren infizieren Zellen. Die physiologischen Gegebenheiten der Wirtszelle werden von Viren zu ihrer Replikation genutzt. Ihre Replikationsmechanismen unterscheiden sich unter anderem wegen der Verschiedenartigkeit der infizierten Gewebe und der infizierten Wirtsorganismen, aber auch wegen Eigenheiten der Viren auf Proteinebene und durch die Art und der Struktur der viralen Nukleinsäure. Die im Virus verpackte Nukleinsäure kann entweder aus RNA oder DNA bestehen und hat einen maßgeblichen Einfluß auf den Ort der Genomreplikation in der Zelle. Die meisten DNA-Viren replizieren im Kern der infizierten Zelle, wohingegen die Replikation der meisten RNA-Viren im Cytoplasma abläuft. Für sich im Kern replizierende Viren, die sich-nichtteilende Zellen infizieren, wie zum Beispiel dem Hepatitis B Virus (HBV), ergeben zusätzliche Hindernisse, da das per se nicht nucleophile virale DNA-Genom in den Zellkern der infizierten Zelle gelangen muß. Dazu muß es zunächst die Zellmembran penetrieren, das Cytoplasma durchqueren und anschließend durch die Kernmembran hindurch das Karyoplasma erreichen.

### 2.1 Struktur des HBV

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört zur Familie der Hepadnaviridae. Es ist ein sphärisches umhülltes DNA-Virus mit einem Durchmesser von ca. 42 nm (Dane, et al. (1970)), das in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.

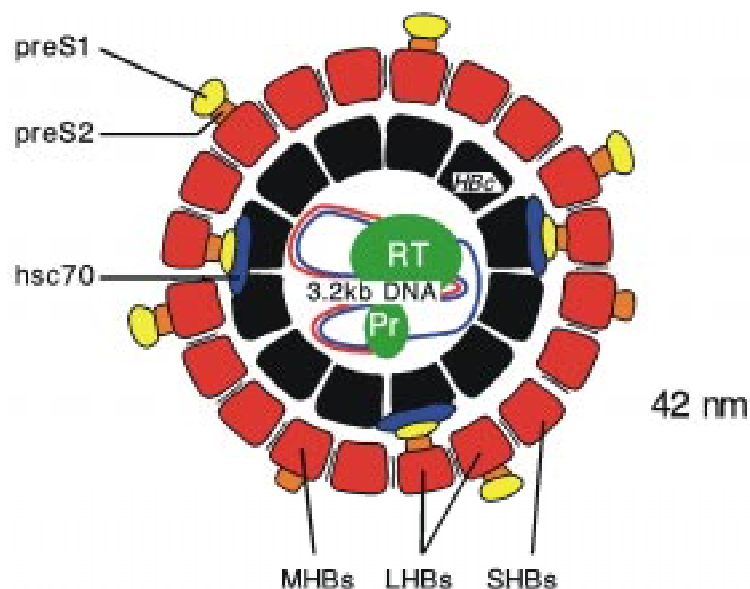


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus, modifiziert aus: Kann and Gerlich (1997)

Die viralen Hüllproteine SHBs (Small Hepatitis B Virus Surface Protein), MHBs (Middle Hepatitis B Virus Surface Protein) und LHBs (Large Hepatitis B Virus Surface Protein)

sind in eine Lipidmembran zellulären Ursprungs eingelagert. Sie sind carboxyterminal identisch, das heißt, das LHBs-Protein beinhaltet die Aminosäuresequenz des MHBs-Proteins und eine zusätzliche N-terminal gelegene preS1-Domäne. Das MHBs-Protein umfaßt die Aminosäuresequenz des SHBs-Proteins und eine zusätzliche preS2-Domäne, während das SHBs-Protein nur aus der S-Domäne besteht. Die äußere Hülle umgibt das 36 nm messende ikosaedrische Nukleocapsid (Crowther, et al. (1994)), das beim HBV auch als Core-Partikel bezeichnet wird. Es ist aus Core-Protein-Untereinheiten (HBc) zusammengesetzt und möglicherweise über HSC70 (Heat Shock Cognate 70) mit invers angeordnetem LHBs mit der äußeren Hülle verbunden. Das Core-Partikel beinhaltet das virale Genom, eine partiell doppelsträngige DNA, deren kodierender (-)-Strang eine Länge von ca. 3200 Nukleotiden aufweist, während der (+)-Strang mit einer Länge von 1000 – 2500 Nukleotiden unvollständig ist (Hruska, et al. (1977), Landers, et al. (1977)). Kovalent am 5'-Ende des vollständigen (-)-DNA-Strangs gebunden befindet sich ein Protein mit DNA-Polymerase-Aktivität (RT) und Primer-Aktivität (Pr, Kaplan, et al. (1973), Gerlich and Robinson (1980)). Weiterhin befindet sich eine Proteinkinase C-Aktivität (in Abbildung 1 nicht eingezeichnet) im Nukleocapsid (Albin and Robinson (1980), Gerlich, et al. (1982), Kann, et al. (1993)), die Serinreste der im Lumen der Core-Partikel gelegenen C-Termini der Core-Proteine phosphoryliert (Gerlich, et al. (1982)).

## **2.2 Replikationszyklus des HBV**

Der Replikations- und Infektionszyklus des HBV beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Oberfläche von Hepatozyten, wobei auf der viralen Seite zwar eine Beteiligung aller drei HBs-Domänen (preS1-, preS2-, S-Domäne) der Oberflächenproteine nachgewiesen werden konnte (Petit, et al. (1992), Budkowska, et al. (1995), Hertogs, et al. (1993)), die Ergebnisse jedoch teilweise einander widersprechen. Auf der zellulären Seite sind mehrere Rezeptoren beschrieben, wie zum Beispiel Endonexin II/Annexin V, die Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase oder der Transferrin-Rezeptor (Hertogs, et al. (1993), Petit, et al. (1992), Budkowska, et al. (1995)). Die Vielfalt der an der Anlagerung des Virus beteiligten Komponenten läßt eine endgültige Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus noch offen. Die nachfolgende Aufnahme des Virus bedarf keines sauren intrazellulären pHs, was eine Beteiligung saurer Lysosomen weitgehend ausschließt, wie Köck, et al. (1996) für das Duck Hepatitis B Virus (DHBV) zeigen konnten. Ungeklärt ist bisher auch, ob und wie das HBV-Nukleocapsid vor seiner Dissoziation an den Kern transportiert wird, sowie die Frage, mit welchen zellulären Mechanismen die Capsid-Dissoziation erfolgt. Kann, et al. (1997) konnten zeigen, daß die virale DNA im Komplex mit der kovalent gebundenen Polymerase in den Zellkern transportiert wird. Im Zellkern erfolgt die Komplettierung der partiell doppelsträngigen HBV-DNA durch zelluläre Enzyme (Köck and Schlicht (1993)), so daß schließlich die ccc-Form (covalently closed circular)



der viralen DNA als Minichromosom mit Nukleosomen assoziiert vorliegt (Bock, et al. (1994)).

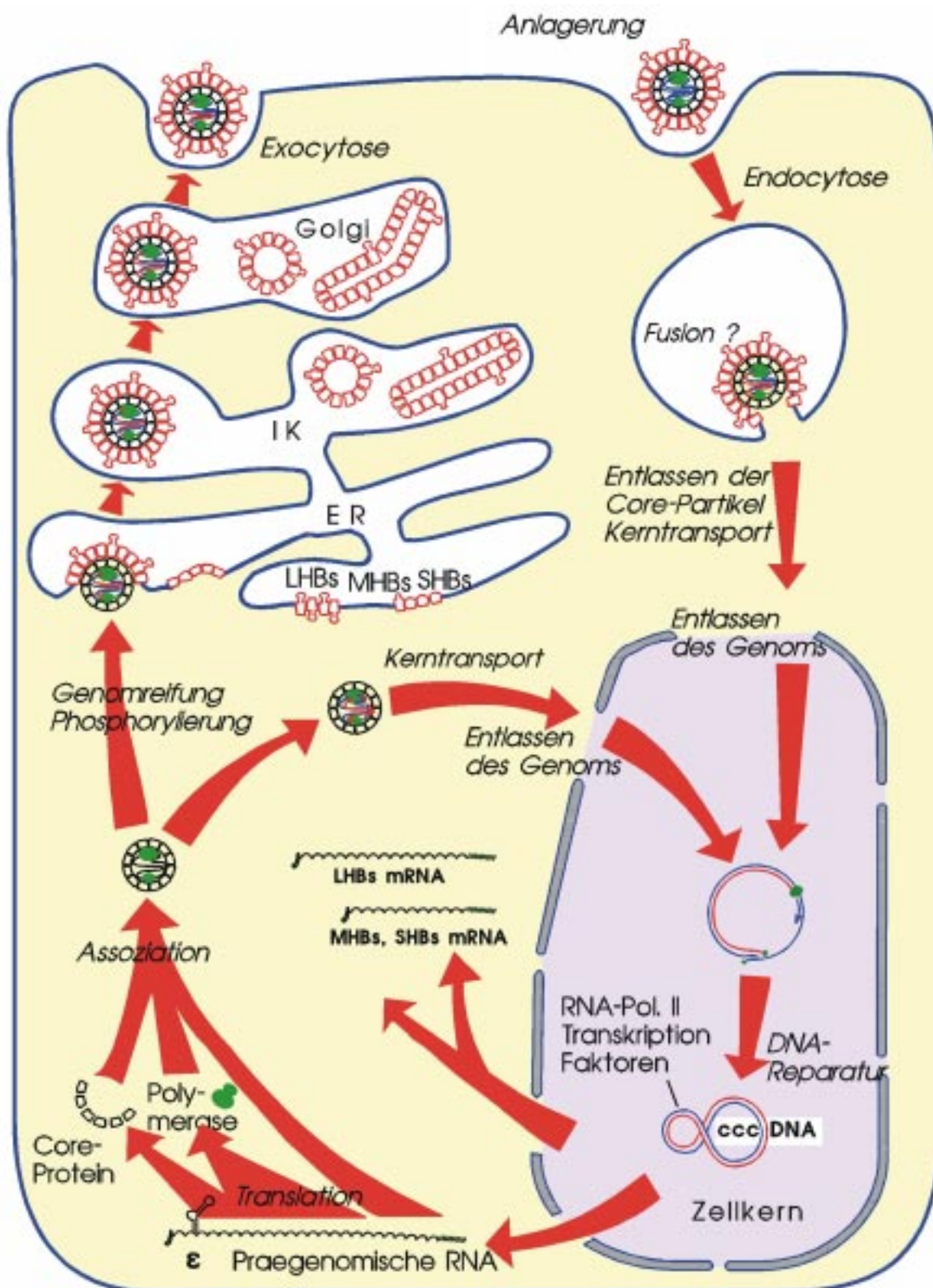


Abbildung 2

Schemazeichnung des HBV-Replikationszyklus, modifiziert aus: Kann and Gerlich (1997)

Diese dient als Ausgangspunkt für die Transkription der viralen mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Die viralen mRNAs werden ins Cytoplasma exportiert und dort translatiert. Eine ebenfalls synthetisierte virale RNA von übergenomischer Länge enthält das  $\varepsilon$ -Verpackungssignal auf RNA-Sekundärstrukturebene (Junker-Niepmann, et al. (1990)), das von der neu synthetisierten viralen Polymerase erkannt und gebunden wird. Im Anschluß an diese Bindung erfolgt die Morphogenese der Core-Partikel durch spontanen Zusammenbau (Seifer, et al. (1993)), währenddessen auch die zelluläre Proteinkinase C ins Nukleocapsid verpackt wird. Die negativ geladene prägenomische RNA bindet an die positiv geladenen Arginincluster der luminal gelegenen Carboxytermini der Core-Untereinheiten und blockiert die ebenfalls in diesem Bereich liegenden Phosphorylierungsstellen. Dennoch werden diese Phosphorylierungsstellen zu einem unbekanntem Zeitpunkt von der encapsidierten Proteinkinase C genutzt. Das verpackte RNA-Prägenom wird von der verpackten viralen Polymerase während der (-)-Strangsynthese, die auch als Erststrangsynthese bezeichnet wird, in einzelsträngige DNA überschrieben, währenddessen die RNaseH-Aktivität desselben Enzyms den RNA-Anteil des entstehenden Duplex-Moleküls degradiert. Der neu synthetisierte (-)-DNA-Strang dient als Matrize für die Synthese des (+)-Strangs während der Zweitstrangsynthese, die ebenfalls von der verpackten viralen Polymerase übernommen wird. Diese Zweitstrangsynthese ist vom Vorhandensein der Core-Proteine abhängig (Nassal (1992)). Da das Nukleocapsid während dieser Nukleinsäuresyntheseschritte mit der viralen Hüllmembran umgeben wird und sich auf dem Weg der Sekretion aus der Zelle befindet, endet die Zweitstrangsynthese vermutlich wegen Verarmung an Nukleotiden an einer nicht genau definierten Stelle. Das Genom fertiger Virionen ist daher nur partiell doppelsträngig und als „reif“ zu bezeichnen, während das ins Capsid verpackte RNA-Prägenom als „unreif“ zu bezeichnen ist. Zwischen diesen beiden Endpunkten „reif“ und „unreif“ befinden sich die Replikationsintermediate, beispielsweise das Duplex-Molekül aus einzelsträngiger (-)-Strang-DNA und dem über einen kurzen Überlappungsbereich daran gebundenen RNA-Prägenom oder die einzelsträngige (-)-Strang-DNA. Ein Teil der neu synthetisierten Core-Partikel wird jedoch nicht mit viralen Hüllproteinen umgeben und sezerniert, sondern in der Zelle durch einen unbekanntem Mechanismus wieder zerlegt, woraufhin die freigesetzte virale DNA in den Zellkern transportiert wird, um dort den Pool nucleärer viraler DNA aufzubauen.

## **2.3      *Infektionsschritte bei anderen Viren***

### **2.3.1    *Anlagerung und Penetration***

Die Infektion einer Zelle beginnt immer mit der Anlagerung des Virus an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wobei die Anlagerung aus einem oder mehreren Schritten unter Einbeziehung eines oder mehrerer Rezeptoren bestehen kann. Für die nichtumhüllten Adenoviren ist die Anlagerung an die Zelle relativ genau bekannt. Es beginnt mit einer initia-

len Bindung seiner Fibern an das CAR-Protein (Coxsackie B Virus and Adenovirus Receptor, Bergelson, et al. (1997)) und führt unter Beteiligung der Fibronectin-bindenden alpha-v-beta-3/5-Integrine als sekundären Rezeptor zur Endocytose des Virus, wobei eine mögliche Beteiligung anderer Integrine nicht ausgeschlossen ist (Goldman and Wilson (1995), Huang, et al. (1995)). Papovaviridae scheinen verschiedene zelluläre Oberflächenproteine zu benutzen: Polyomaviren binden an Sialinsäure (Stehle, et al. (1994), Stehle and S.C. (1996)), die als Proteinmodifikation häufig auf der Zelloberfläche anzutreffen ist. Im Gegensatz dazu benutzt das Simian Virus 40 (SV40) den Major Histocompatibility Complex I (MHC I) zur Anlagerung (Breau, et al. (1992)), wird im Anschluß daran über Clathrin-freie, glatte Vesikel (Caveolae) internalisiert und meist in vesikulären Kompartimenten wie dem ER, den Endosomen oder sogar im Lumen der Kern-Doppelmembran wiedergefunden (Maul, et al. (1978), Kartenbeck, et al. (1989), Yamada and Kasamatsu (1993)). Für die umhüllten Herpesviren beispielsweise ist die Beteiligung sowohl von Heparansulfat (Spear (1993), Seck, et al. (1994)), des Mannose-6-phosphat-Rezeptors (Brunetti, et al. (1995)), als auch eines Herpesvirus entry mediator Proteins (HVEM) der Tumor Necrosis Faktor-Genfamilie beschrieben (Montgomery, et al. (1996), Whitbeck, et al. (1997)). Nach der Anlagerung der Herpesviren erfolgt die Fusion der viralen Membran mit der zellulären Membran vermutlich an der Zelloberfläche (Roizman and Sears (1996)). Baculoviren binden unter Beteiligung des viralen Glycoproteins gp64 an der Zelloberfläche und werden durch Rezeptor-vermittelte Endocytose aufgenommen (Volkman and Goldsmith (1985), Volkman and Goldsmith (1988)).

### **2.3.2 Kerntransport des Nukleocapsids**

Ungeachtet des Weges, den ein umhülltes Virus in die Zelle nimmt, wird dessen Nukleocapsid ins Cytoplasma entlassen. Die vergleichsweise großen Nukleocapside von Viren mit einer Kernphase müssen zum Zellkern gelangen, wobei eine passive Diffusion von Strukturen mit einem Durchmesser größer als 40 – 50 nm eine passive Diffusion aus sterischen Gründen und aus Gründen der Viskosität des Cytoplasmas ausgeschlossen werden kann (Luby-Phelps (1994)). Über die Mechanismen, wie die ins Cytoplasma entlassenen Nukleocapside zum Zellkern gelangen, ist noch weniger bekannt als über die Anlagerung von Viren an die Zellmembran. Beim Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) werden die Nukleocapside entlang der Mikrotubuli zum Kern transportiert (Lycke, et al. (1984), Kristensson, et al. (1986), Bosem, et al. (1990), Topp, et al. (1994)). Ebenso vermutet man bei Adenoviren eine Beteiligung der Mikrotubuli (Dales and Chardonnet (1973), Miles, et al. (1980)). Bei einem Baculovirus, dem Nuclear polyhedrosis virus (NPV), scheint der Eintritt des Capsids Actinfilamente zu induzieren (Charlton and Volkman (1993)). Es scheint möglich, daß sich die NPV-Capside ähnlich wie Shigellen und Listerien durch die Polymerisation der Actinfilamente fortbewegen (Pollard (1995)), zumal

zwei virale Proteine die Actin-Polymerisation und Depolymerisation zu beeinflussen scheinen (Lanier, et al. (1996)). In keinem Fall aber ist der Transport der viralen Nukleocapside an den Zellkern ausreichend für einen Import des viralen Genoms in den Zellkern, da deren Durchmesser fast immer oberhalb des maximalen funktionalen Durchmessers der Kernporen liegt. Dazu muß das Nukleocapsid zunächst dissoziieren, das Virusgenom freigesetzt und durch die Kernporen transloziert werden.

### **2.3.3 Dissoziation viraler Nukleocapside**

Die Dissoziation von Nukleocapsiden ist bisher nur bei wenigen umhüllten DNA-Viren genauer studiert. Beim Poliovirus führt die Phosphorylierung des Nukleocapsidproteine zu einer Destabilisierung des Capsids (Scharli and Koch (1984)). Daher ist es naheliegend, auch bei HBV die zu unbekanntem Zeitpunkt im Replikationszyklus auftretende endogene Phosphorylierung der Capsidproteine zu untersuchen. Dabei phosphoryliert die während der Virusmorphogenese ins Nukleocapsid verpackte zelluläre Proteinkinase C Serinreste des im Lumen des Capsids gelegenen Carboxyterminus der Nukleocapsidproteine (Albin and Robinson (1980) , Gerlich, et al. (1982), Machida, et al. (1991), Kann, et al. (1993)). Bei den nichtumhüllten Adenoviren ist die Capsid-Dissoziation ein mehrstufiger Prozeß, dessen Beginn mit der Freisetzung des viralen Proteins IX zusammenfällt. Weiterhin ist die Aktivität der virusresidenten Cysteinprotease p23 notwendig, durch welche das Protein VI, ein internes Capsidprotein, degradiert und die daran gebundene DNA abgelöst wird. Dies resultiert in einer Destabilisierung des adenoviralen Capsids. Weiterhin ist die Bindung des so destabilisierten Capsids an den Nuclear Pore Complex (NPC) notwendig, um die Dissoziation und die Translokation der viralen DNA in den Zellkern auszulösen (Greber, et al. (1997)).

Ungeachtet des Weges, auf dem die Dissoziation erfolgt, kann eine Infektion nur etabliert werden, wenn die Virus-DNA in den Zellkern importiert wird.

### **2.3.4 Kernimport des viralen Genoms**

Alle bisher untersuchten aktiven Importwege für nucleophile Proteine treffen sich am Kernporenkomplex (Nuclear Pore Complex, NPC). Ein Kernporenkomplex ist ein Multiproteinkomplex mit 8facher Symmetrie (Davis (1995)) und einem Molekulargewicht von ca. 124 MDa (Reichelt, et al. (1990)), der in HeLa-Zellen in ca. 3.000 Exemplaren auf einer Fläche von  $300 \mu\text{m}^2$  vorkommt (Maul (1977)). In der Mitte des NPCs befindet sich ein Zentralgranulum ebenso wie eine käfigartige Struktur auf der nucleären Seite sowie Filamente auf der cytoplasmatischen Seite (Davis (1995)). Letzterem wird eine Funktion bei der Bindung des „Cargos“, also der zu importierenden Fracht, zugeschrieben. Der

maximale funktionelle Durchmesser des NPCs beträgt - wie mit Goldpartikeln gezeigt wurde - in exponentiell wachsenden Zellen 27 nm (Dworetzky and Feldherr (1988)) und ist somit zu gering für die Passage des 36 nm im Durchmesser messenden intakten HBV-Core-Partikels (Crowther, et al. (1994)). Daher ergibt sich die Notwendigkeit einer Capsid-Dissoziation. Der Kernimport von Proteinen ist von der Anwesenheit von Kerntransportsignalen (Nuclear Localization Signal, NLS) auf dem zu importierenden Protein abhängig. Diese bestehen klassischerweise aus der zuerst beim SV40 Large T-Antigen gefundenen Aminosäuresequenz PKKKRKV oder einem zweigeteilten Motiv, wie bei Nucleoplasmin (KRPAATKKAGQAKKK (Kalderon, et al. (1984), Dingwall and Laskey (1991))). Diese Signalsequenz wird im Cytoplasma von Importin  $\alpha$  erkannt, das nach Bindung an Importin  $\beta$  als trimerer Komplex an die cytoplasmatischen Filamente des NPC bindet. Diese Bindung an den Kernporenkomplex ist von Glycoproteinen des NPC abhängig, und kann durch Lectine, wie zum Beispiel Weizenkeim-Agglutinin (Wheat Germ Agglutinin, WGA), inhibiert werden (Adam and Adam (1994)). Anschließend erfolgt die Energie-abhängige Translokation des NLS-tragenden Proteins durch die Kernpore. In *E. coli* exprimierte HBV-Core-Partikel werden nach Phosphorylierung *in vitro* auf dem oben beschriebenen klassischen Weg über Importin  $\alpha/\beta$  an den Zellkern transportiert, wie von Kann, et al. (1999) gezeigt werden konnte. Gängigen Modellen zufolge befinden sich zwei klassische NLS (Eckhardt, et al. (1991)) auf dem im Lumen des Partikels gelegenen C-Terminus (Zlotnick, et al. (1997)) des Core-Proteins, die daher für Importin  $\alpha$  nicht zugänglich sind. Wenigstens ein NLS scheint jedoch nach Phosphorylierung - wahrscheinlich durch konformationelle Umlagerungen - zugänglich zu werden, wie Daten von Kann, et al. (1999) nahelegen. Kann, et al. (1997) konnten zeigen, daß die HBV-DNA als kovalent gebundener Komplex mit der viralen DNA-Polymerase in den Zellkern gelangt, wobei die virale Polymerase jedoch kein klassisches NLS auf Sequenzebene enthält. Möglicherweise sind bei diesem Import eventuell lose am Polymerase-DNA-Komplex gebundene Core-Proteine, die im Carboxyterminus ein klassisches NLS tragen, oder ein NLS auf Sekundär- oder Tertiärstrukturebene beteiligt. Der **Kernimport** über Importin  $\alpha/\beta$  widerspricht nicht zwangsläufig der zuvor erwähnten Möglichkeit eines **Transports** des HBV-Nukleocapsids **an den Zellkern** über cytoskeletale Strukturen, da es sich um zwei voneinander unabhängige Mechanismen handelt. Hinzu kommt, daß die Daten zum Kernimport der HBV-DNA deutliche Parallelen zum Kernimport des Genoms eines anderen DNA-Virus, dem Adenovirus, aufweisen. Dort findet man, wie bereits erwähnt, eine Assoziation der Capside an die Mikrotubuli (Miles, et al. (1980)), die einen Transport über diese Strukturen an den Zellkern wahrscheinlich macht. Nach einer schrittweisen Proteolyse und teilweisen Abspaltung der Capsidproteine stellt die Bindung des Capsids an den NPC den Auslöser für die Freisetzung der viralen DNA aus dem Capsid dar (Greber, et al. (1997)). Ähnlich wie bei HBV ist bei Adenoviren ein terminales Protein (p55) kovalent an die virale DNA gebunden, das in diesem Fall jedoch ein klassisches Kerntransportsignal trägt (Zhao and Padmanabhan (1988)). Es wurde aber noch

nicht gezeigt, daß es tatsächlich den Transport des Komplexes aus kovalent gebundenem p55 und adenoviraler DNA gewährleistet.

## **2.4 Problemstellung und experimenteller Ansatz**

Das HBV-Nukleocapsid mit einem Durchmesser von 36 nm (Crowther, et al. (1994)) kann die Kernporen gemäß den Studien von Goldfarb, et al. (1986) nicht passieren. Daher ist die Capsid-Dissoziation an zwei Stellen im HBV-Replikationszyklus notwendig: Zum einen muß das Capsid zerlegt werden, damit das virale Genom bei der Neuinfektion einer Zelle in den Zellkern transportiert werden und dort eine produktive Infektion etablieren kann. Zum anderen ist eine Capsid-Dissoziation beim Kernimport der neu synthetisierten viralen DNA zur Aufrechterhaltung einer bereits etablierten Infektion nötig. Es ist zu postulieren, daß die Capsid-Dissoziation einem Regulationsmechanismus unterliegt, da die (+)-Strangsynthese an das Vorhandensein der Core-Untereinheiten gekoppelt ist (Nassal (1992)). Eine zufällig zum „richtigen Zeitpunkt“ erfolgenden Freisetzung des reifen Virusgenoms ist unwahrscheinlich, da der Infektions- und Replikationsmechanismus von HBV sehr effizient arbeitet. Ein Inokulum von nur 1 – 10 Virionen genügt zur Etablierung einer hepadnaviralen Infektion (Shikata, et al. (1977), Ulrich, et al. (1989)). Um diesen Regulationsmechanismus zu untersuchen, ist es notwendig, in Nukleocapsiden unterschiedlicher Reife die zunehmende Genomreife, die zunehmende Phosphorylierung und Veränderungen der Stabilität zu zeigen.

Zur Gewinnung der Core-Partikel wurden Core-Partikel aus HepG2.2.15-Zellen verwendet, einer stabil mit dem HBV-Genom transfizierten immortalisierten Leberzelllinie (Sells, et al. (1987)), da ausreichenden Mengen infizierter Leber humanen Ursprungs nur schwer erhältlich sind. Dabei wurden sowohl der Zellkulturüberstand mit den sezernierten Virionen als auch die virusproduzierenden Zellen benutzt. In beiden Fällen werden anhaftende virale Hüllproteine durch Detergenzbehandlung abgelöst (Hruska and Robinson (1977)), so daß Core-Partikel intra- und extrazellulärer Herkunft verwendet werden können. Die aus Zellkulturmedium isolierten Core-Partikel müssen im Gegensatz zu ihren intrazellulären Pendanten „reif“ sein, da sie Virionen entstammen, die erfolgreich in Infektionsexperimente eingesetzt wurden (Sells, et al. (1988)). Dabei ist bisher nur bekannt, daß sich die „Reife“ der Core-Partikel auf Nukleinsäureebene durch das Vorhandensein des partiell doppelsträngigen HBV-Genoms manifestiert. Unklar ist, ob es weitere biochemische Charakteristika der „Reife“ gibt, wie diese geartet sind, und wann und wie sie im HBV-Replikationszyklus wirken. Ferner ist unbekannt, ob und wie sich unreife und reife Core-Partikel im Sedimentationsverhalten im Dichtegradienten auftrennen lassen. Weiterhin ist zu untersuchen, wie der zu fordernde Regulationsmechanismus der Capsiddestabilisierung geartet ist. Die experimentelle Darstellung unreifer und reifer Core-Partikel ist in der Literatur bislang nicht beschrieben.

## **2.5 Ziel der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der endogenen Phosphorylierung und der endogenen Polymerase-Aktivität in intrazellulären Hepatitis B Virus-Nukleocapsiden. Dabei soll ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen Enzymaktivitäten untersucht werden. Hierzu sollen zunächst Nukleocapside aus der Zellkultur aufgearbeitet werden und deren endogene Aktivitäten auf eine unterschiedliche Verteilung über den Dichtegradienten hin untersucht werden. Weiterhin soll die Stabilität von Capsiden analysiert werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Chemikalien und Enzyme**

Actinomycin D	SIGMA, Deisenhofen
Adenosintriphosphat	BOEHRINGER, Mannheim
Agarose (SEAKEM)	BIOZYM, Oldendorf
β-Mercaptoethanol	ROTH, Karlsruhe
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin	ROTH, Karlsruhe
DNase I	BOEHRINGER, Mannheim
Dithiothreitol	SIGMA, Deisenhofen
EDTA	SIGMA, Deisenhofen
EGTA	SIGMA, Deisenhofen
Ethidiumbromid	SERVA, Heidelberg
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Glykogen	BOEHRINGER, Mannheim
<i>HEPES</i>	<i>ROTH, Karlsruhe</i>
Magermilchpulver	UELZENA, Uelzen
Nonidet P-40	FLUKA, Buchs
Nukleotide	PHARMACIA, Schweden
Nycodenz	GIBCO, Karlsruhe
Phenol	ROTH, Karlsruhe
Proteinase K	BOEHRINGER, Mannheim
Rabbit Reticulocyte Lysate	PROMEGA, Madison, U.S.A.
Radiochemikalien	AMERSHAM, Braunschweig
RNase A	BOEHRINGER, Mannheim
Saccharose	SIGMA, Deisenhofen
S7-Nuklease	BOEHRINGER, Mannheim
TEMED	SERVA, Heidelberg
Trichloressigsäure	ROTH, Karlsruhe
Tris-Base	ROTH, Karlsruhe
Trypsin	GIBCO, Karlsruhe

Soweit im Text nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien, Salze und organischen Lösungsmittel in der Qualität "reinst" oder "pro analysi" von MERCK, Darmstadt bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE, Eschborn.



### 3.1.1 Antikörper

Kaninchen-anti-HBc-Ak	DAKO, Hamburg
Esel-anti-Kaninchen-Ak, Peroxidase-konjugiert	SIGMA, Deisenhofen
Schaf-anti-Hepatitis-B-Core-Ak	U. Goldmann, Hygieneinstitut der Universität Göttingen

### 3.1.2 Zellen

Verwendet wurden die humane Hepatomzelllinie Huh7 und HepG.2.2.15-Zellen, eine stabil mit dem Hepatitis-B-Virus transfizierte, immortalisierte Hepatoblastomzelllinie (Sells, et al. (1987)). Die Zellen waren unterschiedlich häufig passagiert worden.

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

ECL-Substratlösung: Zur Verdrängung des Luftsauerstoffs wird 225 ml H<sub>2</sub>O mit 25 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5 unter ständigem Rühren mehrfach mit flüssigem Stickstoff versetzt und 1.250 µl 500 mM 3-Aminophtalhydrazid (ad 25 mM, SIGMA, Deisenhofen)/DMSO (frische Lösung mit Stickstoff begasen und aliquotiert bei -20°C lagern) sowie 555 µl 180 mM 4-Hydroxymzimtsäure (ad 3,7 mM, SIGMA, Deisenhofen)/DMSO tropfenweise hinzugeben. 30 min vor Gebrauch wird 1:10.000 18,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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)
10 x PAGE-Laufpuffer	250 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	1920 mM	Glycin
	1 %	SDS

2 x PAGE-Probenpuffer	125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	6 %	SDS
	6 %	Glycerin
	1 %	Bromphenolblau
	vor Gebrauch zusetzen: 10 %	β-Mercaptoethanol
10 x SSC	1500 mM	NaCl
	150 mM	Trinatriumcitrat
TAE-Puffer (pH 7,8)	40 mM	Tris-Acetat (pH 7,8)
	1 mM	EDTA pH 8,0
TN-Puffer (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100 mM	NaCl
TNE-Puffer (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
PBS	136 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Transport-Puffer	20 mM	HEPES (pH 7,3)
	110 mM	Kaliumacetat
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EGTA
2 x endogene Polymerase-Puffer	100 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	100 mM	NaCl
	14 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,2 %	NP-40
	0,02 mM	dGTP
	0,02 mM	dATP
	0,02 mM	dTTP

2 x Proteinase K-Puffer	200 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	25 mM	EDTA (pH 8,0)
	300 mM	NaCl
	2 %	SDS
2 x Proteinkinase C-Puffer	20 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,4 mM	CaCl <sub>2</sub>
6 x Agarose-Probenpuffer	50 % (w/v)	Saccharose
	0.25 % (w/v)	Bromphenolblau
	6 x	TAE
	1 % (w/v)	SDS
DMEM High Glucose	in Pulverform	GIBCO, Karlsruhe
Zusatz von	3,7 g/L	NaHCO <sub>3</sub>
Filtration durch	0,22 µm	Sterilfilter, MILLIPORE, Eschborn
10 x Trypsin	25 g/L	Trypsin
	5 mM	EDTA
	15 mM	NaCl
		bezogen von GIBCO, Karlsruhe
Einfriermedium	0,6 x	DMEM High Glucose
	20 %	FKS, PANSYSTEMS, Aidenbach
	20 %	DMSO

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Eukaryonte Zellkultur**

Alle Arbeiten werden an einer Laminar Flow-Arbeitsbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen werden auf Zellkulturschalen (Durchmesser: 15 cm, GREINER, Nürtingen) in DULBECCOs Modified EAGLE Medium „High Glucose“ (DMEM) mit Zusatz von fötalem Kälberserum (FKS, ad 10 %, PANSYSTEMS, Aidenbach) in einem Inkubatorschrank bei 37 °C, 90 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei Konfluenz werden die Zellen in Trypsin/PBS 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, von der Zellkulturschale mit Medium abgelöst, die entsprechende Anzahl auf zwei Zellkulturschalen verteilt und mit DMEM/10 % FKS versetzt. Zum Lagern werden die Zellen einer konfluenten 15 cm-Zellkulturschale (ca. 1 x 10<sup>7</sup> Zellen) in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und bei – 175 °C eingefroren. Zur Inkulturnahme der Zellen werden diese auf Eis aufgetaut, auf

5 °C eingefroren. Zur Inkulturnahme der Zellen werden diese auf Eis aufgetaut, auf eine 15 cm-Zellkulturschale ausgebracht und mit DMEM/10 % FKS versetzt, wobei nach 6 h der erste Mediumwechsel erfolgt, um das zelltoxische DMSO zu entfernen.

### **3.2.2 Präparation von Zellkernen**

Huh7-Zellen werden bis zur Konfluenz herangezogen, mit einem Gummischaber von der 15 cm-Zellkulturschale abgelöst und 3 min bei 4.000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Das Zellpellet wird in 1 ml eiskaltem PBS gewaschen, wie oben pelletiert und erneut gewaschen. Das Zellpellet wird in 1 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und zur Lyse der Zellen 2 min bei 70 % der max. Leistung Ultraschall (Ultraschall-Steuergerät HD 70, Sonotrode UW70, BANDELIN, Berlin) ausgesetzt (auf Eis). Die Zellyse wird mikroskopisch kontrolliert, das Lysat 10 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl PBS resuspendiert und bei -70°C gelagert.

### **3.2.3 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15-Zellen**

HepG2.2.15-Zellen werden in 10 % FKS/DMEM-Medium bis zur Konfluenz herangezogen und anschließend 5 Tage bei 1 % FKS/DMEM kultiviert. Die Zellen werden mit einem Gummischaber von den Zellkulturschalen abgelöst, in 1,5 ml-EPPENDORFF-Reagiergefäße überführt, und 3 min bei 3.000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und erneut wie oben pelletiert. Dieser Waschvorgang wird wiederholt. Das Pellet wird in 900 µl 0,1 % NP-40/PBS resuspendiert und zur Lyse der Zellen 6 x 15 s bei 70 % der max. Leistung Ultraschall ausgesetzt (auf Eis). Die Nukleinsäuren werden 15 Minuten durch 20 U/ml DNase I sowie 20 µg/ml RNase A (beide BOEHRINGER, Mannheim) bei 37 °C in 15 mM MgCl<sub>2</sub> degradiert. Zellulärer Detritus wird partiell durch Zentrifugation (BIOFUGE (HERAEUS, Hanau), 20 min, 12.000 rpm, 4 °C) pelletiert, der Überstand in ein anderes EPPENDORFF-Reagiergefäß überführt und auf eine Endkonzentration von 0,75 % (v/v) NP-40 eingestellt. Es folgt eine 15-minütige Degradation verbliebener Nukleinsäuren bei 37 °C durch 20 U/ml S7-Nuklease (BOEHRINGER, Mannheim) in 5 mM CaCl<sub>2</sub>, die durch die Zugabe von EDTA ad 15 mM beendet wird. Der Überstand der sich anschließenden Zentrifugation (BIOFUGE, 10 min, 15.000 rpm, 4 °C) wird auf ein 1 ml-Kissen aus 25 % (w/v) Sucrose/0,75 % (v/v) NP-40/TNE aufgetragen und im TLA100.3-Festwinkelrotor (k-Faktor = 12 bei rpm = 100.000) in einer TL-100-Ultrazentrifuge (BECKMAN, München) 120 min bei 100.000 rpm (120.000 x g) und 10 °C pelletiert. Das Pellet wird in 600 µl PBS gründlich resuspendiert. Zum Abtrennen nicht-löslicher Anteile wird das resuspendierte Pellet einer

5minütigen Zentrifugation in der BIOFUGE bei 15.000 rpm und 4 °C unterzogen. Der Core-Partikel-haltige Überstand wird bei –20 °C gelagert.

### **3.2.4 Isolierung von HBV-Core-Partikeln aus HepG2.2.15-Zellkulturüberstand**

Der Überstand der 5tägigen Zellkultur in 1 % FKS/DMEM wird durch eine 10minütige Zentrifugation bei 4.500 rpm und 4 °C in einer Zentrifuge (JOUAN, Unterhaching) vorgeklärt. Der Überstand dieser Zentrifugation wird im SW 28-Rotor 16 h bei 10 °C und 28.000 rpm in einer Ultrazentrifuge (L5-50, BECKMAN, München) durch ein 3 ml 25 % (w/v) Sucrose/TNE-Kissen zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation wird in 1 ml PBS resuspendiert, auf eine Konzentration von 0,75 % NP-40 eingestellt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird 120 min in der TL-100-Ultrazentrifuge bei 100.000 rpm und 10 °C über ein 1 ml 25 % (w/v) Sucrose/0,75 % (v/v) NP-40/TNE-Kissen zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl PBS resuspendiert und zum Abtrennen der nichtlöslichen Bestandteile zentrifugiert (BIOFUGE, 5 min, 15.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wird bei –20 °C aufbewahrt.

### **3.2.5 Nachweis und Quantifizierung von Core-Partikeln**

#### **3.2.5.1 ELISA**

Der Core-ELISA erfolgte nach Seifer, et al. (1993). Dazu werden Mikrotiterplatten (MAXISORP, NUNC, Wiesbaden) über Nacht bei 4 °C mit 100 µl/Vertiefung 0,5 µg Schaf-anti-HBc-Ak/ml ELISA-Beschichtungspuffer beschichtet, 6 x mit 300 µl (0,1 % (v/v) Tween-20/PBS)/Vertiefung in einem Mikrotiterplattenwaschgerät (Modell Columbus, SLT Labinstruments, Crailsheim) gewaschen und 1 h bei 37 °C mit 10 % (v/v) FKS/TNE abgesättigt. Die Platte wird wie oben gewaschen, mit 100 µl Probe/Vertiefung (in 1 % (v/v) BSA/PBS) beschickt und eine geometrische Standardreihe aus in *E. coli* exprimierten und gereinigten Core-Partikeln (rHBc) von 50 ng/Vertiefung bis 0,4 – 0,013 ng/Vertiefung aufgetragen. Die Proben inkubieren bei 4 °C über Nacht, die Platte wird w.o. gewaschen, mit 100 µl/Vertiefung des Kaninchen-anti-Core-Antikörpers (1:2000 in 10 % (v/v) FKS/TNE) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird erneut wie oben gewaschen, jede Vertiefung mit 100 µl des Esel-anti-Kaninchen-POD-Konjugats (1:5000 in 10 % (v/v) FKS/TNE) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platte wird erneut wie oben gewaschen, mit 100 µl/Vertiefung Substratlösung versetzt und bis zu Entwicklung einer deutlichen, aber nicht zu kräftigen Farbreaktion (15 bis 60 min) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Vertiefung gestoppt und die Extinktion (Messwellenlänge: 420 nm, Referenzwellenlänge: 620 nm) im Mikrotiterplattenphotometer (PASTEUR Diagnostics, bezogen über ANTHOS Labinstruments,

Salzburg, Österreich) gemessen. Anhand der aufgetragenen Standardreihe wird eine Eichkurve (Extinktion versus eingesetzte rHBc-Menge) erstellt, und die Core-Menge in den zu quantifizierenden Proben abgelesen.

### **3.2.5.2 Nativer Western-Blot**

Zur Darstellung der Core-Partikel werden diese im 1 % Agarose (SEAKEM, BIOZYM, Oldenburg)/TAE-Gel unter nichtdenaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Herstellung des Gels und der Auftrag der Proben erfolgte wie bei Kann and Gerlich (1994) beschrieben, jedoch wurde ein Agarose Loading Buffer ohne SDS verwendet. Die Agarosegelelektrophorese wurde in TAE-Puffer bei 8 V/cm ausgeführt. Falls notwendig, wurde das Agarosegel nach der Gelelektrophorese 15 min bei 4 °C in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) inkubiert und anschließend mit einer elektronischen Gelkamera (CS-1, CYBER-TEC, Berlin) im UV-Licht ( $\lambda=260$  nm, TFX-20M, VILBER-LOURMAT, Torcy, Frankreich) fotografiert und über einen Thermodrucker (MITSUBISHI, Paderborn) ausgegeben. Die Proben wurden in einem von Southern (1975) beschriebenen Aufbau in 10 x SSC über Nacht vom Agarosegel auf eine PVDF-Membran (MILLIPORE, Nürnberg) transferiert. Die Membran wird zuvor 5 min bei Raumtemperatur in Methanol inkubiert und anschließend 2 min bei Raumtemperatur in 10 x SSC äquilibriert. Nach dem Probentransfer wird die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 5 % (w/v) Magermilch (UELZENA, Uelzen)/PBS abgesättigt und anschließend schüttelnd 3 h mit Kaninchen-anti-HBV-Core-Ak inkubiert (1:5.000 in 5 % (w/v) Magermilch/PBS). Die Membran wird 3 x 10 min in 0,1 % (v/v) Tween-20 /0,5 % (w/v) Magermilch/PBS gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit Esel-anti-Kaninchen-POD-Konjugat (1:5.000) in 5 % (w/v) Magermilch/PBS inkubiert. Die Membran wird 3 x in 0,1 % (v/v) Tween-20/0,5 % (w/v) Magermilch/PBS und 1 x 10 min in PBS gewaschen, in Kunststoffolie eingeschweißt und mit der ECL-Substratlösung 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Substratlösung und Wiederverschluß der Kunststofftasche folgt die Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP, AMERSHAM, Braunschweig) 15 s - 120 s und die Entwicklung des Films im Röntgenfilmentwickler.

### **3.2.5.3 Densitometrische Auswertung des Röntgenfilms**

Die durch die ECL-Darstellung auf dem Röntgenfilm erzeugten Banden werden eingescannt (Scanner: Studio ScanIISI [AGFA, Mortsel, Belgien], Scanner-Software FOTO-LOOK PS 2.07.2 mit folgenden Einstellungen: [Modus: Graustufen], [Vorlage: Durchsicht], [Auflösung: 600ppi], [Skalierung: 100%], [Dichte: Automatisch], [Tonkurve: Keine], [Entrastern: Kein], [Schärfe: Mittel 300%], [Optimieren: Qualität]), als jpg-Datei mit maximaler Qualität gespeichert, in der Bildverarbeitungssoftware ADOBE-PHOTOSHOP (Version D1-4.0) eingelesen und als tif-Datei gespeichert, da die densitometrische Software

WINCAM (Version 2.2, CYBERTECH, Berlin) nur tif-Dateien entgegennimmt. Die Banden werden in WINCAM rechteckig eingegrenzt (Einstellungen der Software: [Peaks: Dark], [Integration: Absolute], [Background Substraction: Off]), die aufgetragenen Mengen Core-Partikel der Standardreihe unter der Programmoption „Enter Standard“ den entsprechenden Banden zugeordnet. Anhand dieser Standardreihe erstellt die Software eine logarithmische Regressionskurve - mit der die tatsächlich aufgetragenen Mengen an Core-Partikeln in der Standardreihe neu ermittelt werden - und errechnet so einen Korrelationskoeffizienten zur Beurteilung der Güte der Quantifizierung. Die aufgetragenen Proben werden mittels dieser Regressionskurve von der Software quantifiziert. Die Verwendung der logarithmischen Regressionskurve erfolgte aufgrund der nichtlinearen Speicherung der Intensitäten durch die Scanner-Software.

### **3.2.6 Markierung und Nachweis von Core-Komponenten**

#### **3.2.6.1 Endogene Polymerase-Reaktion**

Zur Markierung der viralen DNA durch die verpackte virale Polymerase werden 5 µl Core-Partikel 12 h bzw. 24 h bei 37 °C in endogene-Polymerase-Puffer nach Zusatz von 1 µl 10 µCi/µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol) inkubiert. Die Probe wird mit PBS auf 500 µl aufgefüllt und in NANOSEP-Konzentratoren (Ausschlußgrenze = 30 kDa, PALL-GELMAN, Roßdorf) bei 14.000 rpm in der EPPENDORFF-Tischzentrifuge auf ca. 150 µl eingengt. Anschließend wird die Probe 3 x mit 500 µl PBS versetzt und wie oben eingengt.

#### **3.2.6.2 Endogene Proteinkinase C-Reaktion**

Zur Markierung der viralen Core-Proteine durch die verpackte zelluläre Proteinkinase C werden 5 µl Core-Partikel 12 h bei 37 °C in Proteinkinase C-Puffer mit 10 µCi/µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol) bzw. mit 1 µM nichtradioaktivem ATP inkubiert. Anschließend wird das freie ATP - wie oben für die Entfernung von Nukleotiden beschrieben - entfernt.

#### **3.2.6.3 Nachweis radioaktiver Core-Proteine und radioaktiver HBV-DNA**

70 mg Protein A-Sepharose (SIGMA, Deisenhofen) werden 1 h bei Raumtemperatur in PBS gequollen, mit 80 µl Kaninchen-anti-HBc versetzt, 48 h bei 4°C rotierend inkubiert und anschließend in einer EPPENDORFF-Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wird 5 x in 1 ml PBS resuspendiert und wie oben pelletiert. Das Pellet wird 6 h in 1 % BSA/PBS (w/v) bei Raumtemperatur rotierend inkubiert, 5 x wie oben pelletiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Für die Darstellung radioaktiv markierter Core-Proteine werden 50 ng Core-Partikel (Mengenbestimmung siehe Kap. 3.2.5), zur Darstellung der radioaktiv markierten

HBV-DNA 20 ng Core-Partikel mit 100 µl BSA-abgesättigter Kaninchen-anti-HBc-Protein A-Sepharose versetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Zum Waschen wird die Probe 1 min bei 14.000 rpm in einer EPPENDORFF-Tischzentrifuge pelletiert, und in 500 µl 0,1 % (v/v) Tween-20/PBS resuspendiert. Der Waschvorgang wird 2 x wiederholt.

### ***Nachweis <sup>32</sup>P-markierter Core-Proteine***

Das Pellet der Immunpräzipitation wird in 20 µl 10 % β-Mercaptoethanol (ROTH, Karlsruhe)/2 x PAGE-Probenpuffer resuspendiert, 10 min bei 96 °C denaturiert, die Sepharose pelletiert und der gesamte Überstand auf ein 16 % SDS-Polyacrylamidgel („Mighty Tall“-Gelkammer, 10 cm x 12 cm, HOEFER SCIENTIFIC, bezogen über SERVA, Heidelberg) mit 5 % Sammelgel aufgetragen. Die Probe wird ca. 4 h bei 150 V aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wird anschließend unter Vakuum 2 h bei 80 °C getrocknet. Die radioaktiven Bestandteile der Proben werden im Bioimager (BAS-1000, FUJI, bezogen über RAY-TEST, Straubenhardt) dargestellt.

### ***Nachweis radioaktiver HBV-DNA***

Das in PBS resuspendierte Pellet der Immunpräzipitation (ca. 40 µl) wird mit 100 µl 2 x Proteinase K-Puffer, 5 µl 100 ng/µl Proteinase K und 35 µl H<sub>2</sub>O versetzt und 4 h bei 56 °C inkubiert. Anschließend werden die Proteinfragmente durch Phenol-/Chloroform-Extraktion entfernt. Zum wässrigen Überstand der Extraktion werden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5), 3 Volumina Ethanol und 2 µl 20 µg/µl Glycogen (BOEHRINGER, Mannheim) als Fällungszusatz gegeben. Dieser Ansatz wird 2 h bei -20 °C inkubiert und anschließend 1 h bei 4 °C und 15.000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wird in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. 10 µl des resuspendierten Pellets werden in Agarose-Loading-Buffer auf einem 1 % Agarosegel bei 10 V/cm aufgetrennt. Die DNA wird mit Ethidiumbromid gefärbt und auf einem UV-Leuchttisch fotografiert. Das Agarosegel wird 2 x 10 min in 10 % (v/v) TCA und 2 x 5 min in 5 % (v/v) TCA auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 60 min bei 37 °C zwischen Papiertüchern mit einem Gewicht von ca. 800 g getrocknet und eine Autoradiographie des Gels durchgeführt.

#### ***3.2.6.4 Darstellung und Quantifizierung <sup>32</sup>P-markierter Core-Partikel***

Nach kurzem Waschen des Blots in PBS, Lufttrocknung und Imaging Screen-Exposition wird die Blotmembran in einem Bioimager dargestellt. Der Bioimager-Scan wird (Soft-



ware: PC-BAS-READER 2.09, RAYTEST, Straubenhardt) als Datei ausgelesen, gespeichert und mit der Bildverarbeitungssoftware TINA (Version 2.09f, RAYTEST, Straubenhardt) dargestellt sowie am angeschlossenen Drucker (Laserjet IVPlus, HEWLETT-PACKARD, Bad Homburg) ausgedruckt. Die Expositionszeit der Autoradiographie wird so gewählt, daß der maximale Wert einer quantifizierten Bande (vgl. Kap.3.2.5.2) 220 (PSL-bkg)/mm<sup>2</sup> nicht überschreitet, da, wie in Vorexperimenten gezeigt, oberhalb dieses Werts Sättigungseffekte des Bioimager-Screens zu beobachten sind.

Die Quantifizierung des Signals erfolgt durch das Programm TINA, das die PC-BAS-Reader-Datei einliest und am Bildschirm darstellt. Die Banden werden in einer einheitlichen Fläche eingegrenzt und durch TINA ausgewertet. Außerdem wird eine gleichgroße Fläche hinzugefügt und quantifiziert, die den Hintergrund der Autoradiographie wiedergibt. Das gemessene Signal (angegeben in PSL, Phosphor Stimulated Luminescence) des Hintergrunds (= background, bkg) wird vom Signal der jeweiligen Bande subtrahiert, so daß man einen um den Hintergrundstrahlung bereinigten Wert erhält (PSL-bkg), der durch die Fläche (in mm<sup>2</sup>) dividiert wird ([PSL-bkg]/mm<sup>2</sup>). Dieser Quotient stellt einen um die Hintergrundstrahlung bereinigten, auf die Fläche bezogenen Wert für die Menge der gemessenen Radioaktivität dar.

Zur Darstellung der spezifischen Radioaktivität der Core-Partikel im Bioimagerscan einer PVDF-Membran (angegeben in „(PSL-bkg)/mm<sup>2</sup>“) wird diese durch die Core-Menge dieser Probe im Immunblot (angegeben in „pg“, vgl. Kap.3.2.5.2) dividiert. Die vierte Nachkommastelle des Quotienten wird gerundet. Die „spezifische Radioaktivität“ ist somit die auf ein pg Core-Partikel bezogene, quantifizierte Radioaktivität und wird in [(PSL-bkg) x (mm<sup>2</sup> x pg)<sup>-1</sup>] angegeben. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese Einheit nicht zur Betrachtung der absolut eingebauten Nukleotide zu nutzen ist, da die Core-Partikel-Menge auf den Standard bezogen ist, der ebenfalls geblottet und den Immunreaktion zur Darstellung im Blot unterworfen wurde. Da jedoch z.B. verkürzte Waschvorgänge zwischen den Antikörperinkubationen im Immunblot zu stärkeren Signalen – wenn auch bei erhöhtem Hintergrund - führen, muß gefolgert werden, daß während der Immunreaktion eine unbekannte Menge an Core-Partikeln von der Membran gewaschen wird. Die Menge an gemessenen Core-Partikeln im Blot stellt also einen relativen Wert und keinen absoluten Wert dar. Da jedoch die einzelnen Fraktionen der jeweiligen Gradienten parallel getestet worden waren, ist ein vergleichende Beurteilung zulässig. Zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Quotienten werden dem größten Wert 100 % zugeordnet und die prozentualen Werte der anderen Quotienten errechnet.

### **3.2.7 Dichtegradientenzentrifugation von Core-Partikeln**

#### **3.2.7.1 Flotation**

100 µl Probe werden mit 400 µl 1,44 g/ml Nycodenz (NYCOMED, bezogen über GIBCO, Karlsruhe)/TN versetzt (resultierende Dichte: 1,32 g/ml) und in einem mit SIGMACOTE (SIGMA, Deisenhofen) nach Angaben des Herstellers silikonisierten Zentrifugenröhrchen (14 mm x 95 mm, KONTRON, Neufahrn) vorgelegt. Es wird ein in einem Gradientenmischer hergestellter, kontinuierlicher Nycodenzgradient von 1,32 g/ml Nycodenz/TN bis 1,1 g/ml Nycodenz/TN überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt 24 h bei 4 °C und 36.000 rpm in einem TST 41.14-Rotor in einer Ultrazentrifuge (L5-50, BECKMAN, München). Der Gradient wird vom Boden des Zentrifugenröhrchens her mit einer Glaskapillare in 500 µl-Aliquots in silikonisierte EPPENDORFF-Reagiergefäße ausgetropft. Der Refraktionsindex ( $\sigma$ ) jeder Fraktion wird mit einem Abbé-Refraktometer bestimmt und die entsprechende Dichte mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Dichte [g/ml]} = (\sigma \times 3,287) - 3,383$$

Die Konzentration an Core-Partikeln in jeder Fraktion wird im ELISA bestimmt.

#### **3.2.7.2 Dichtegradientensedimentation**

In einem silikonisierten Zentrifugenröhrchen wird ein kontinuierlicher Gradient aus 6 ml 1,32 g/ml Nycodenz/TN und 6 ml 1,1 g/ml Nycodenz/TN präformiert. Die Probe wird auf diesen Gradienten aufgetragen, wie in der Dichtegradientenflotation zentrifugiert, in 24-70 Fraktionen geerntet und untersucht.

### **3.2.8 Stabilitätsassay**

10 µl Kaninchen Retikulozyten Lysat (Rabbit Reticulocyte Lysate, RRL) werden mit dem gleichen Volumen mittels endogener Polymerase-Reaktion oder endogener Proteinkinase C-Reaktion markierter Core-Partikel versetzt und 24 h bei 37 °C (im Brutraum) in einem silikonisierten EPPENDORFF-Reagiergefäß inkubiert. In der Negativkontrolle wird RRL durch Transportpuffer (TP) ersetzt. Die DNA in den Ansätzen wird durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  (ad 8 mM) und S7-Nuklease (ad 0,25 U/25 µl Ansatz) 30 min bei 37 °C degradiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA (ad 16 mM) gestoppt. 10 µl der Ansätze werden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt, die Core-Partikel wie in Kap.3.2.5.2 beschrieben im Immunblot und in der Autoradiographie dargestellt (vgl. Kap.3.2.6.4).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Präparation, Markierung und Nachweis von Core-Partikeln

#### Core-Partikel-Isolierung aus HepG2.2.15-Zellen

Core-Partikel wurden aus HepG2.215-Zellen isoliert und in verschiedenen Verdünnungsstufen im Immunblot nach nativer Agarosegelelektrophorese dargestellt (Abbildung 3).

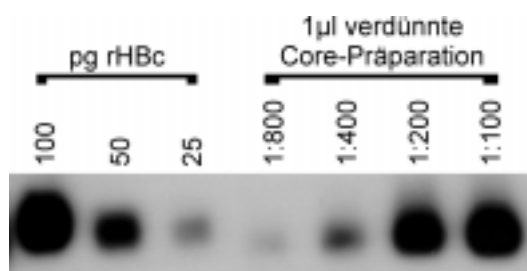


Abbildung 3 Immunblot von aus HepG2.2.15-Zellen isolierten Core-Partikeln



Abbildung 4 wie Abbildung 3, jedoch mit Eingrenzungen zur densitometrischen Auswertung

Signal	Intensität	Standard [pg]	Menge [pg]
1	2901,16	100	99,32
2	1954,79	50	51,17
3	1154,18	25	24,38
4	957,89	-----	19,23
5	1387,09	-----	31,15
6	2428,04	-----	72,54
7	2603,23	-----	81,76

Tabelle 1 Densitometrische Auswertung des Immunblots

Die intrazellulären Core-Partikel wandern im Gel entsprechend einer 3054 bp langen linearen DNA. Dies entspricht der 1,05fachen Migrationsgeschwindigkeit der in der Standardreihe aufgetragenen in *E. coli* exprimierten Core-Partikel (rHBc). Zur Quantifizierung der aufgearbeiteten Core-Partikel wurden die Signale in der densitometrischen Software WINCAM eingegrenzt (vgl. Abbildung 4) und die Signalstärke vermessen (vgl. Tabelle 1, Spalte „Intensität“). Mittels der Standardverdünnungsreihe aus rekombinant exprimierten Core-Partikeln (rHBc, Paul Pumpens, Riga, Lettland) wurde eine logarithmische Kalibrierungskurve erstellt. Der Korrelationskoeffizient dieser Kalibrierungskurve lag über 0,99. Anhand der Kalibrierungskurve wurden die Core-Partikel-Mengen in den Verdünnungen der aus HepG2.2.15-Zellen isolierten Core-Partikel ermittelt. Die Menge der aus Zellen isolierten Core-Partikel lag zwischen 100 - 2800 Core-Partikel pro HepG2.2.15-Zelle.

## Präparation aus HepG2.2.15-Zellkulturüberstand

Der Überstand der 5tägigen Inkubation der Zellen in 1 % FKS/DMEM wurde gesammelt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dann wurden Core-Partikel wie in Kap. 3.2.4 beschrieben aufgearbeitet und ebenso wie Core-Partikel aus HepG2.2.15-Zellen nachgewiesen. Es zeigte sich ein Unterschied im Gellaufverhalten (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18, beide Seite 43) zwischen intrazellulären Core-Partikeln und dieser Präparation: Die extrazellulären Core-Partikel migrieren knapp unterhalb der in *E.coli* exprimierten Core-Partikel, während, wie oben erwähnt, zwischen dem Laufverhalten intrazellulärer Core-Partikel und in *E. coli* exprimierten Core-Partikeln ein größerer Laufunterschied existiert. Aus dem Zellkulturüberstand konnten ca. 75 Core-Partikel pro Zelle, d.h. im Mittel 15 Core-Partikel pro Zelle und Tag, aufgearbeitet werden.

## Markierung und Nachweis von Core-Partikeln

### Radioaktive Markierung der HBV-DNA

Zur Darstellung der HBV-DNA wurden intrazelluläre Core-Partikel mit der endogenen Polymerase-Reaktion markiert, immunpräzipitiert und anschließend wie in Kap.3.2.6.3 beschrieben dargestellt. Abbildung 5 zeigt links den Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Größenstandard und rechts den Bioimagerscan der radioaktiven HBV-DNA.

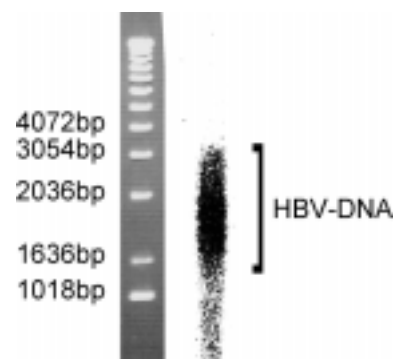


Abbildung 5 Darstellung der markierten HBV-DNA nach Agarosegelelektrophorese, links der Ethidiumbromid-gefärbte DNA-Größenmarker, rechts der Bioimagerscan

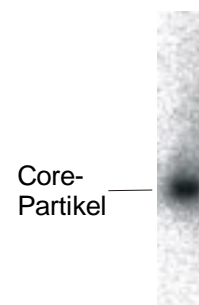


Abbildung 6 Bioimagerscan von durch endogene Polymerase-Reaktion markierten Core-Partikeln nach nativer Agarosegelelektrophorese, Immunblot und Autoradiographie

Es sind radioaktive Nukleinsäuren mit einem Laufverhalten von ca. 3.200 bp bis 1.500 bp doppelsträngiger linearer DNA zu erkennen. Aufgrund des Replikationszyklus' des Hepatitis-B-Virus könnte diese Radioaktivität sowohl einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, als auch DNA-RNA-Hybride darstellen. In jedem Fall entspricht sie ganz vorwiegend Replikationsintermediaten des viralen Genoms und nicht der relaxed circular-Form viraler DNA, wie sie in reifen Virionen vorliegt. In Abbildung 6 sieht man eine distinkte Bande von durch endogene Polymerase-Reaktion markierten Core-Partikeln nach nativer

Agarosegelelektrophorese, Immunblot und Autoradiographie. Es sind keine Kontaminationen, beispielsweise durch ebenfalls markierte zelluläre Nukleinsäuren, zu erkennen.

### **Radioaktive Markierung der HBV-Core-Proteine**

Zur Darstellung der Core-Proteine wurden intrazelluläre Core-Partikel mittels der endogenen Proteinkinase C-Reaktion markiert, mit einem Partikel-spezifischen Antikörper (Kaninchen-anti-HBc-Ak, DAKO, Hamburg) immunpräzipitiert und auf einem 16 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Proteine im Bioimager dargestellt.

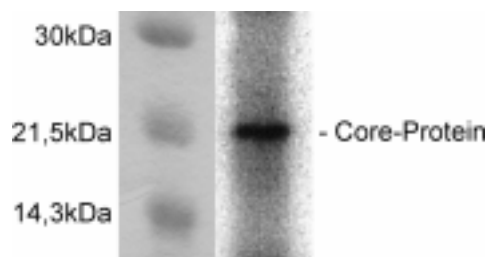


Abbildung 7 Darstellung der markierten Core-Proteine nach SDS-PAGE, links der Molekulargewichtsmarker, rechts der Bioimagerscan

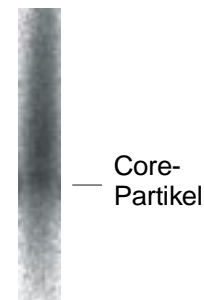


Abbildung 8 Bioimagerscan der durch endo. PKC-Reaktion markierten Core-Partikel nach nativer Agarosegelelektrophorese und Immunblot

Abbildung 7 zeigt eine radioaktive Bande in der Höhe des Molekulargewichts von HBV-Core-Proteinen (ca. 21,5 kDa). Damit wurde gezeigt, daß die endogene Proteinkinase-Reaktion (Albin and Robinson (1980)) erwartungsgemäß innerhalb der Core-Partikel ausschließlich die Core-Untereinheiten phosphorylierte. In Abbildung 8 sind durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markierte Core-Partikel nach nativer Agarosegelelektrophorese und Autoradiographie gezeigt. Man erkennt keine distinkte Bande. Vielmehr sieht man eine - vor Immunpräzipitation - immer vorhandene erhebliche Kontamination der Präparation mit Proteinkinasen und Substraten. Daher zeigte das Vorhandensein einer singulären Bande nach Immunpräzipitation (Abbildung 7) die Spezifität der Präzipitation. Dies bestätigt auch die zuvor dargelegte Hypothese, daß nach Immunpräzipitation und radioaktiver endogener Polymerase-Reaktion tatsächlich nur HBV-DNA dargestellt wurde (Abbildung 5).

## 4.2 **CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von Core-Partikeln**

Unmarkierte intrazelluläre Core-Partikel wurden in einem SW60-Ti-Rotor über einen präformierten kontinuierlichen Gradienten von 1,45 g/ml – 1,29 g/ml CsCl (18 h bei 37.000 rpm und 4 °C) aufgetrennt. Der Gradient wurde mit einer Glaskapillare von unten geerntet, die Dichte der Fraktionen refraktometrisch bestimmt und die Konzentration an Core-Partikeln in den einzelnen Fraktionen im ELISA ermittelt.

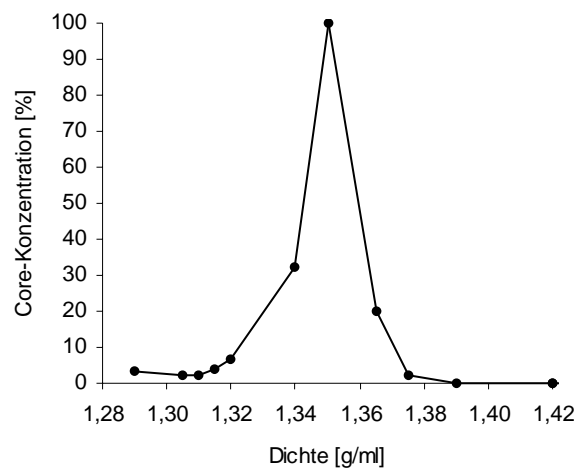


Diagramm 1 Verteilung der intrazellulären Core-Partikel im CsCl-Dichtegradienten lt. ELISA-Quantifizierung, experimentelle Daten auf Seite 69

Diagramm 1 zeigt die prozentuale Verteilung der Core-Partikel-Konzentration über den Gradienten. Die Konzentration steigt von 2% der max. Konzentration (bei einer Dichte von 1,365 g/ml) auf einen einzelnen Peak bei einer Dichte von 1,350 g/ml an. Diese Dichte entspricht der Dichte, die von Hess, et al. (1981) für intrazelluläre Core-Partikel aus Lebergewebe gezeigt wurde. Insgesamt wurden in den positiven Fraktionen ca. 7% der eingesetzten Menge an Core-Partikeln wiedergefunden.

### 4.2.1 **Charakterisierung von Core-Partikeln in Nycodenz/TN**

#### **Dichtegradientenzentrifugation von intrazellulären Core-Partikeln**

Die relativ geringe Wiederfindungsrate von Core-Partikeln aus HepG2.215-Zellen in CsCl deutete auf eine hohe Zersetzungsrate in diesem Medium hin. Versuche zur Auftrennung in Saccharose - dem zweiten in der Literatur beschriebenen Medium - waren ebenfalls unbefriedigend, da hier eine Zersetzung von 75 % (persönliche Mitteilung von Dipl. Biol.

Angelika Vlachou, Institut für medizinische Virologie der Justus Liebig-Universität in Gießen) erfolgte und zudem noch das Maß an Verunreinigungen, wie durch endogene Polymerase- und Proteinkinase-Reaktion gezeigt, weit stärker war (Vlachou, persönliche Mitteilung). Daher wurde ein weiteres Dichtegradientenmedium (Nycodenz) getestet, das weitgehend inert ist, so daß auch enzymatischen Reaktionen in ihm weitgehend ungestört ablaufen (Nycomed (1996)). Dazu wurden intrazelluläre Core-Partikel durch Dichtegradientensedimentation über einen kontinuierlichen Gradienten von 1,32 g/ml bis 1,10 g/ml Nycodenz/TN wie in Kap. 3.2.7.2 beschrieben aufgetrennt.

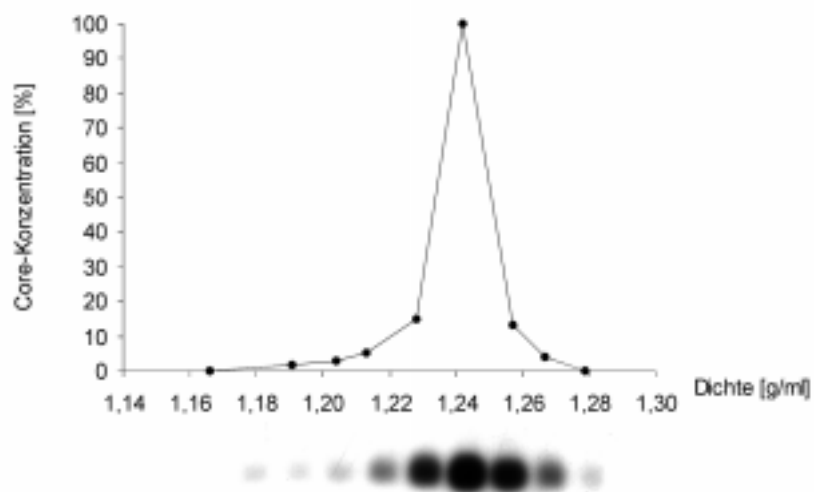


Diagramm 2 Verteilung intrazellulärer Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten nach Dichtegradientensedimentation lt. ELISA-Quantifizierung, experimentelle Daten auf Seite 70, Erläuterungen im Text

Diagramm 2 zeigt die prozentuale Verteilung der Core-Partikel-Konzentrationen über den Nycodenz-Dichtegradienten aufgrund der Quantifizierung im ELISA. Alternativ befindet sich darunter ein Gradient in der Darstellung im Immunblot. Die Core-Partikel-Konzentration steigt auf ein scharfes Maximum bei einer Dichte von 1,242 g/ml an. 93% der eingesetzten Core-Partikel wurden in den positiven Fraktionen wiedergefunden. Damit zeigte sich, daß dieses Medium im Gegensatz zu CsCl und Saccharose besser zur Aufreinigung geeignet ist. Weiterhin lassen diese Ergebnisse darauf schließen, daß in CsCl – wie es weitgehend in der Literatur verwendet wurde – nur die Aufreinigung „besonders stabiler“ Core-Partikel erlaubt, die evtl. nicht die Gesamtheit der in der Zelle vorhandenen Core-Partikel reflektiert.

### Gleichgewichtsdichte von intrazellulären Core-Partikeln

Nycodenz ist im Gegensatz zu CsCl viskös: Bei 20 °C besitzt eine Nycodenz-Lösung einer Dichte von 1,265 g/ml eine Viskosität von 5,3 mPas (H<sub>2</sub>O: 1 mPas). Daher wurde untersucht, ob die im vorherigen Versuch ermittelte Dichte der Core-Partikel auch in der Flotation erreicht wurde.

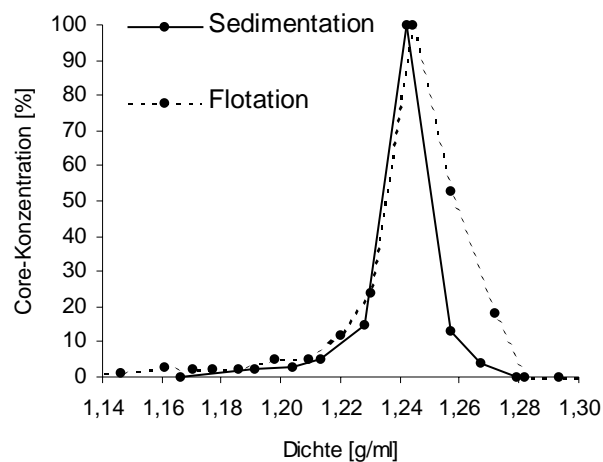


Diagramm 3 Verteilung intrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten nach Dichtegradientenflotation und -sedimentation lt. ELISA-Quantifizierung, experimentelle Daten auf Seite 70 und 71

Diagramm 3 zeigt die prozentuale Verteilung der Core-Partikel-Konzentrationen über den Dichtegradienten. Die Core-Partikel-Konzentration zeigt - im Vergleich zur Nycodenz-Dichtegradientensedimentation - ebenfalls ein scharfes Maximum, welches 100 % im Diagramm reflektiert, bei einer Dichte von 1,244 g/ml.

Die Dichten der Maxima liegen bei 1,242 g/ml nach Dichtegradientensedimentation und bei 1,244 g/ml nach Dichtegradientenflotation. Die geringe Differenz erklärt sich dadurch, daß die beiden Gradienten nicht so präzise geerntet werden können, daß die Dichten der einzelnen Fraktionen in der dritten Nachkommastelle übereinstimmen. Die Wanderungstrecke der Core-Partikel bis zu ihrer Gleichgewichtsdichte war in der Dichtegradientensedimentation größer als in der Dichtegradientenflotation. Da die Maxima in beiden Fällen dennoch bei der gleichen Dichte auftreten, muß die Zentrifugationsdauer auch in der Dichtegradientensedimentation ausreichend gewesen sein, damit intrazelluläre Core-Partikel ihre Gleichgewichtsdichte erreichen.



### **Dichtegradientenzentrifugation von extrazellulären Core-Partikeln**

Morphologisch ist kein Unterschied zwischen intra- und extrazellulären Core-Partikeln anzunehmen oder in der Literatur beschrieben. Daher ist davon auszugehen, daß das Sedimentationsverhalten extrazellulärer Core-Partikel nicht durch ihre Morphologie, sondern von ihrer Masse bzw. von verpackten Bestandteilen abhängt. Um deren Einfluß auf die Gleichgewichtsdichte zu untersuchen, wurden extrazelluläre Core-Partikel wie in Kap. 3.2.7.2 beschrieben angereichert und über eine Dichtegradientensedimentation aufgetrennt.

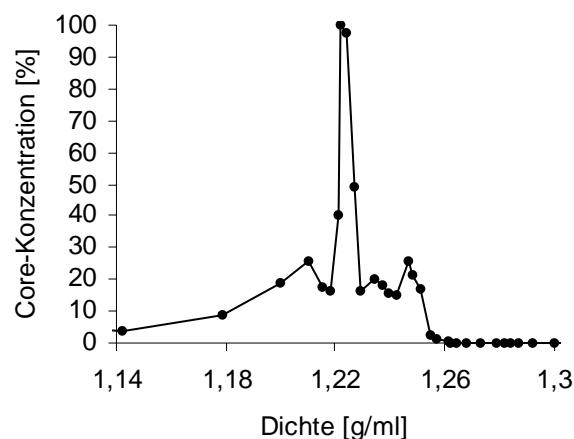


Diagramm 4 Verteilung extrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten lt. ELISA-Quantifizierung, experimentelle Daten auf Seite 72

Die Verteilung extrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten in Diagramm 4 zeigt die Core-Partikel-Konzentration mit einem sehr scharfen Maximum bei einer Dichte von 1,222 g/ml und unterscheidet sich signifikant von der des Maximums intrazellulärer Core-Partikel bei 1,244 g/ml um 0,024 g/ml. Neben dem Maximum sind sowohl bei höheren als auch niedrigeren Dichten Nebenfraktionen zu sehen.

### **Permeabilität von Core-Partikeln für Nycodenz**

Da die Erststrang-DNA-Synthese – wenn auch in einem unbekanntem Maß – Voraussetzung für die Sekretion von HBV darstellt (Gerelsaikhan, et al. (1996)), sollten extrazelluläre Core-Partikel, von denen durch NP-40-Behandlung die Hüllproteine entfernt worden waren, eine höhere Menge an Nukleinsäure beinhalten, also eine größere Masse aufweisen. Unter der Annahme, daß Nycodenz nicht in die Partikel eindringt, sollten sie also eine höhere Schwebedichte als intrazelluläre Core-Partikel aufweisen. Diese Annahme steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Sedimentationen. Die Ergebnisse sind jedoch erklärbar, wenn vorausgesetzt wird, daß Nycodenz ins Lumen der Core-Partikel

eindringt, da doppelsträngige Nukleinsäuren in Nycodenz eine geringere Dichte (1,13 g/ml) als einzelsträngige Nukleinsäuren (1,18 g/ml) aufweisen (Rickwood, (1989). Um das Eindringen des Nycodenz in die Partikel zu verifizieren, wurden in *E.coli* exprimierte Core-Partikel, die in wesentlich höheren Konzentrationen als eukaryontisch exprimierte Core-Partikel aufgearbeitet werden können, mit Nycodenz der Schwebedichte präinkubiert und in der Elektronenmikroskopie dargestellt. Nycodenz – als jodhaltiges Röntgenkontrastmittel – sollte ein Anfärben des Lumens der Partikel erlauben.

Abbildung 9 zeigt runde Strukturen mit einem unscharf begrenzten Durchmesser von 27 nm und 31 nm. Dieser Durchmesser entspricht dem durch Cryoelektronenmikroskopie ermittelten Durchmesser des Lumens von Core-Partikeln (Crowther, et al. (1994)) abhängig davon, ob diese in T=3- oder T=4-Symmetrie vorliegen. Ein Auszählen der Häufigkeit von 27 nm- bzw. 31 nm-messenden Strukturen ergab eine Relation von 1:6, was auch der Verteilung der T=3 zur T=4-symmetrischen Core-Partikel in der Literatur entspricht (Crowther, et al. (1994)).

Als Kontrolle wurden entsprechende Core-Partikel mit Phosphorwolframsäure (PTA) gefärbt und elektronenmikroskopisch dargestellt. Abbildung 10 zeigt das elektronenmikroskopische Bild dieser Core-Partikel, wobei man bei einigen durch die eingelaufene PTA das Lumen der Core-Partikel erkennt. Es existieren – wie in der vorigen Darstellung - zwei Populationen von Core-Partikeln, die sich in ihrem Durchmesser unterscheiden (30 nm

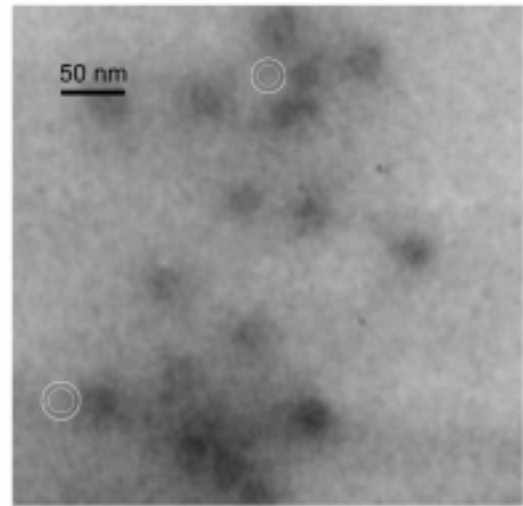


Abbildung 9 Elektronenmikroskopische Darstellung von in *E.coli* exprimierten Core-Partikeln in Nycodenz/TN. Als weiße Kreise sind der innere und äußere Durchmesser von Core-Partikeln in der PTA-Färbung eingefügt.

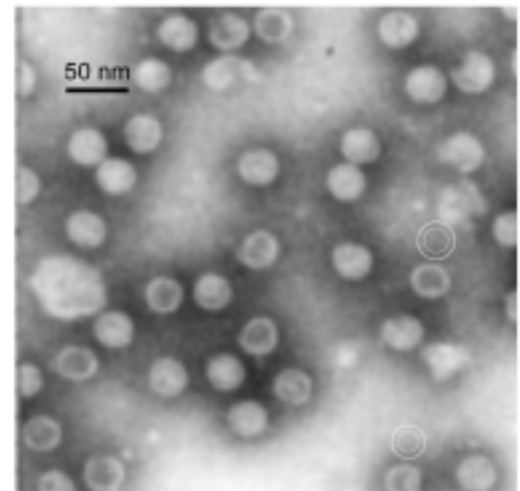


Abbildung 10 Elektronenmikroskopische Darstellung von PTA-gefärbten, in *E.coli* exprimierten Core-Partikeln.

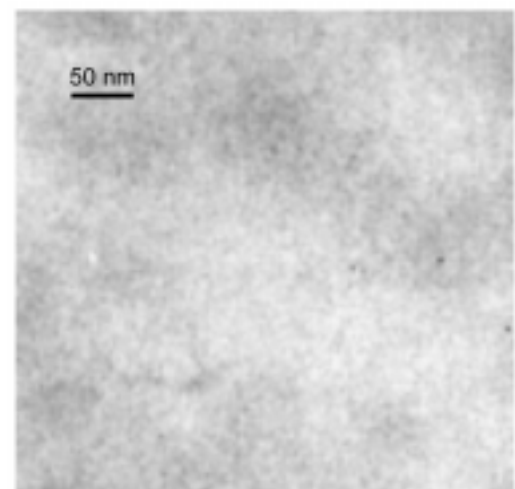


Abbildung 11 Elektronenmikroskopische Darstellung von in *E.coli* exprimierten Core-Partikeln ohne Färbung.

und 32 nm), die wieder durch die eingezeichneten Kreise markiert sind. Als Negativkontrolle ist ein elektronenmikroskopisches Bild von in *E.coli* exprimierten Core-Partikeln, die nicht gefärbt wurden, gezeigt (Abbildung 11). Es sind weder Core-Partikel noch andere Strukturen zu erkennen.

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Kann, Institut für Medizinische Virologie, und Heidrun Will, Institut für Veterinärvirologie, beide Justus Liebig-Universität in Gießen, zur Verfügung gestellt.

#### 4.2.2 Verteilung der Core-assoziierten Enzymaktivitäten in Nycodenz-Dichtegradienten

##### Sedimentationsverhalten endogen phosphorylierter Core-Partikel

Zunächst sollte festgestellt werden, ob durch die endogene Phosphorylierung das Sedimentationsverhalten intrazellulärer Core-Partikel verändert wird. Dies war für die Untersuchungen zum Verlauf der Erst- und Zweitstrang-, als auch für die Gesamtsyntheseaktivität über den Dichtegradienten von Bedeutung, da in diesen Versuchen der endogenen Polymerase-Reaktion eine endogene Phosphorylierung vorausgegangen war (vgl. Kap.0). Intrazelluläre Core-Partikel wurden durch die endogene Proteinkinase-Reaktion mit  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP markiert und wie beschrieben in einer Dichtegradientenflotation aufgetrennt.

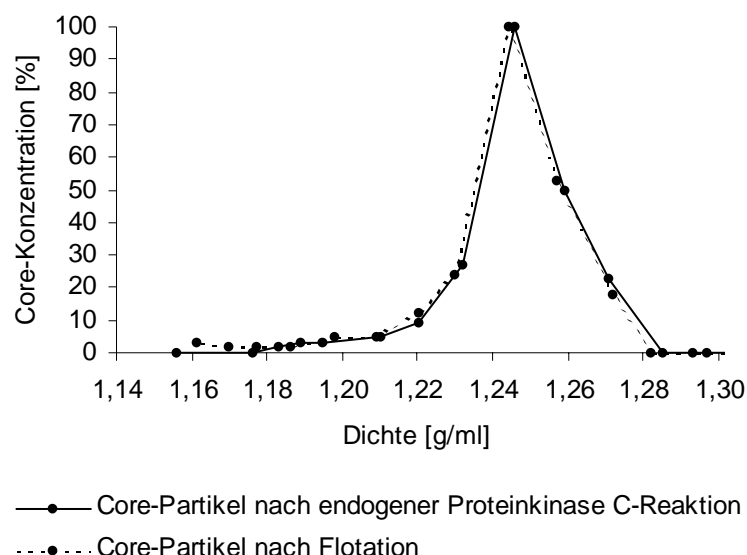


Diagramm 5

Verteilung von durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markierten intrazellulären Core-Partikeln über den Nycodenz-Dichtegradienten lt. ELISA-Quantifizierung, experimentelle Daten auf Seite 73

Endogen phosphorylierte intrazelluläre Core-Partikel verteilten sich über den Nycodenz-Dichtegradienten wie in Diagramm 5 dargestellt, wobei das Maximum der Core-Partikel-Konzentration bei einer Dichte von 1,246 g/ml erreicht wurde und mit der Gleichgewichtsdichte unmarkierter intrazellulärer Core-Partikel bei 1,244 g/ml gut übereinstimmt. Die geringe Differenz in der dritten Nachkommastelle erklärt sich wiederum durch das manuelle Ernten der Gradientenfraktionen, so daß festzustellen ist, daß die endogene Phosphorylierung zu keiner Veränderung des Sedimentationsverhaltens führt, also keine strukturelle Veränderung der Partikel bewirkt, die eine signifikant veränderte Dichte der Partikel zur Folge hat.

### ***Spezifische Endogene Proteinkinase C- und Polymerase-Aktivität***

Aus Gründen der Nachweisbarkeit wurden im Folgenden nur die Fraktionen mit Dichten zwischen 1,23 g/ml und 1,28-1,30 g/ml untersucht.

Intrazelluläre Core-Partikel wurden wie beschrieben durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markiert. Um einer, auch in dieser Arbeit beobachteten Abnahme der viralen Proteinkinase C-Aktivität bei längerer Lagerung, vermutlich bedingt durch Degradation der Core-Proteine (Albin and Robinson (1980)), vorzubeugen, erfolgte die Markierungsreaktion möglichst bald nach Aufarbeitung der Core-Partikel. Auch bei der Markierung durch die endogene Polymerase-Reaktion musste die Reaktion möglichst bald nach der Aufarbeitung der Core-Partikel erfolgen. Vorversuche ergaben, daß die endogene Proteinkinase C-Reaktion – ebenso wie die endogene Polymerase-Reaktion – vor der Zentrifugation ungefähr um den Faktor 10 besser erfolgt als nach Zentrifugation in Gegenwart von Nycodenz. Um eine Kontamination der Proben mit exogenen Kinasen und deren Reaktionspartnern weitestgehend auszuschließen, wurden markierte Core-Partikel zunächst über eine Nycodenz-Dichtegradientenflotation gereinigt und die Core-Partikel-Konzentrationen im ELISA bestimmt. Die positiven Fraktionen wurden gepoolt, in NANO-SEP-Konzentratoren auf ein Volumen von 100 µl eingengt und wie beschrieben in einer Nycodenz-Dichtegradientensedimentation aufgetrennt. Core-Partikel der zu untersuchenden Dichten (1,235 - 1,270 g/ml) wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und wie beschrieben durch Immunblot dargestellt und quantifiziert. Nach Autoradiographie der ECL-Membran wurde die spezifische Radioaktivität der Proben bestimmt.

endogene Proteinkinase

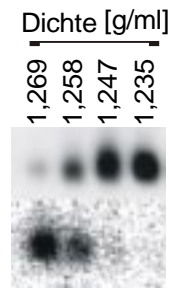


Abbildung 12 Immunblot (oben) und Bioimagerscan (unten) von durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markierten Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation, experimentelle Daten Seite 74

endogene Polymerase

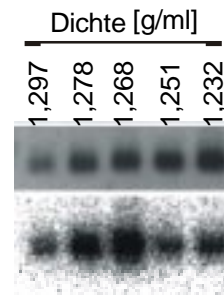


Abbildung 13 Immunblot (oben) und Bioimagerscan (unten) von durch endogene Polymerase-Reaktion markierten Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation, experimentelle Daten Seite 75

In Abbildung 12 erkennt man eine Ungleichverteilung der Proteinkinase C-Aktivität über die betrachtete Dichte: Eine relativ geringe Core-Partikel-Menge in Fraktion 5 (1,269 g/ml) erzeugt ein deutlich stärkeres Signal im Bioimagerscan als beispielsweise eine vergleichsweise große Menge an Core-Partikeln in Fraktion 8 (1,235 g/ml).

Abbildung 13 zeigt eine Ungleichverteilung der spezifischen endogenen Polymerase-Aktivität über die betrachtete Dichte: Beispielsweise erzeugt die aufgetragene Core-Partikel-Menge aus Fraktion 11 (1,268 g/ml) im Bioimagerscan ein stärkeres Signal als die Core-Partikel aus Fraktion 13 (1,232 g/ml), von der eine geringere Menge aufgetragen wurde.

Diagramm 6 zeigt zusammenfassend die Verläufe der spezifischen endogenen Proteinkinase C-Aktivität und der spezifischen endogenen Polymerase-Aktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten.

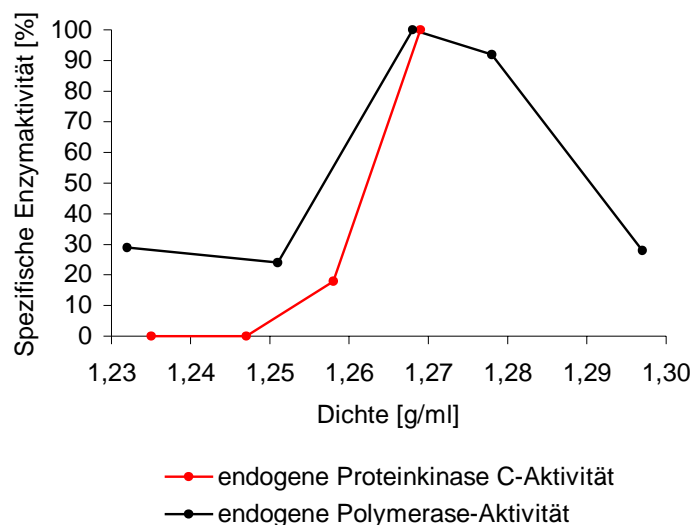


Diagramm 6

Verlauf der endogenen Proteinkinase C- und der Polymerase-Aktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten, experimentelle Daten Seite 74 und Seite 75

Die prozentuale Verteilung der spezifischen Proteinkinase C-Aktivität über den Dichtegradienten steigt von 0 % der maximalen spezifischen Enzymaktivität (bei einer Dichte von 1,235 g/ml) über 18 % (bei einer Dichte von 1,258 g/ml) auf 100 % (bei einer Dichte von 1,269 g/ml) an. Der Verlauf der spezifischen endogenen Polymerase-Aktivität über den Dichtegradienten zeigt ein Maximum bei einer Dichte von 1,267 g/ml. Die endogene Polymerase-Reaktion findet also am stärksten in Core-Partikeln statt, deren Sedimentationsdichte in etwa genauso groß ist wie die derjenigen, in denen die endogene Proteinkinase C-Reaktion vermehrt abläuft. Da anhand dieser Daten nicht beurteilt werden kann, ob es sich bei dieser Markierung um Synthese des HBV-Erststrangs oder des –Zweitstrangs handelt, wurde dies im Folgenden untersucht.

### **Verteilung der verschiedenen HBV-DNA-Syntheseaktivitäten über den Nycodenz-Dichtegradienten**

#### **Verteilung der HBV-Erststrangsyntheseaktivität**

Intrazelluläre Core-Partikel wurden durch die endogene Proteinkinase C-Reaktion mit nichtradioaktivem ATP phosphoryliert und das freie ATP abgereinigt. Dann wurden die Core-Partikel durch die endogene Polymerase-Reaktion in Gegenwart von 80  $\mu$ M Actinomycin D, einem Inhibitor der DNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität (Reich and Goldberg (1964), Kaplan, et al. (1973), Summers and Mason (1982), Offensperger, et al. (1988)), also der HBV-Zweitstrangsynthese, mit radioaktivem dCTP markiert, in einer Dichtegradientensedimentation aufgetrennt und die spezifische Enzymaktivität bestimmt. Die gemessene Radioaktivität gibt also die DNA-Erststrangsynthese wieder.

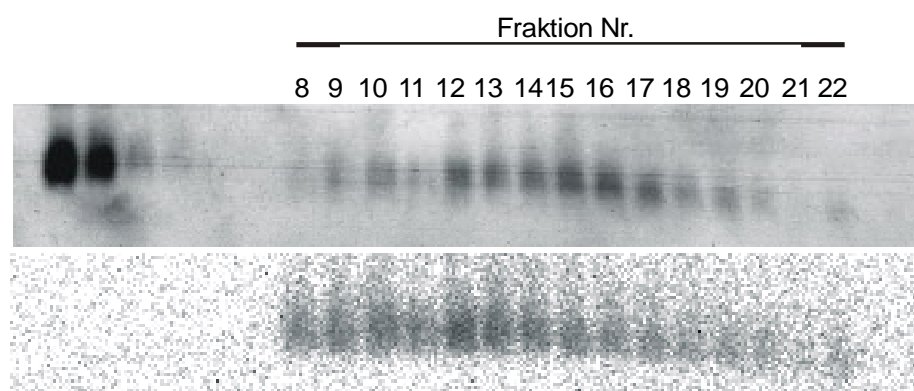


Abbildung 14 *Immunblot (oben) und Bioimagerscan (unten) von durch endogene Polymerase-Reaktion (in Gegenwart von Actinomycin D) markierten Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation, experimentelle Daten Seite 76*

Abbildung 14 zeigt die Verteilung der HBV-Erststrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten. Wiederum erkennt man eine Ungleichverteilung der spezifischen

Syntheseaktivität: Eine geringere Core-Partikel-Menge ergibt bei Fraktion 8 (1,274 g/ml) ein stärkeres Signal im Bioimagerscan als bei Fraktion 14 (1,260 g/ml). Zur besseren Veranschaulichung ist der Verlauf der spezifischen HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten in Diagramm 7 graphisch dargestellt.

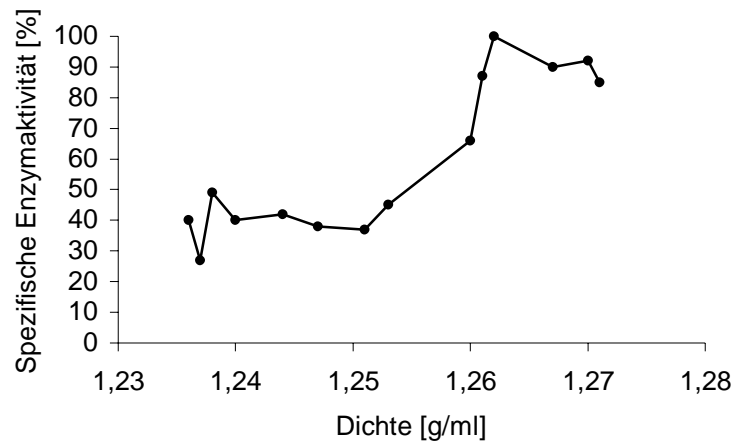


Diagramm 7 Verteilung der spezifischen HBV-Erststrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten, experimentelle Daten auf Seite 76

Diagramm 7 zeigt ein deutliches Maximum der spezifischen Erststrangsyntheseaktivität bei einer Dichte von 1,262 g/ml. Bis zu einer Dichte von 1,274 g/ml „pendelt“ sie auf hohem Niveau um Werte von 90 %. Das Maximum der spez. Erststrangsyntheseaktivität fällt mit der Dichte des Maximums der endogenen Polymeraseaktivität (1,267 g/ml) und der endogenen Proteinkinase C-Aktivität (1,269 g/ml) annähernd zusammen. Die spezifische Erststrangsyntheseaktivität fällt bei einer Dichte von 1,251 g/ml auf 37 % ab und „schwankt“ bis zur niedrigsten untersuchten Dichte von 1,236 g/ml zwischen Werten von 49 % und 27 %.

### **Verteilung der HBV-Zweitstrangsyntheseaktivität**

Core-Partikel aus Zellextrakt wurden wie oben beschrieben mit nichtradioaktivem ATP phosphoryliert bevor nach Entfernung des freien ATPs die endogene Polymerase-Reaktion in Gegenwart von 1 mM Phosphonoformic Acid (PFA), einem Inhibitor der HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität, durchgeführt wurde. Die mit radioaktivem dCTP markierten Core-Partikel werden in einer Nycodenz-Dichtegradientensedimentation aufgetrennt und die spezifischen Enzymaktivität bestimmt.

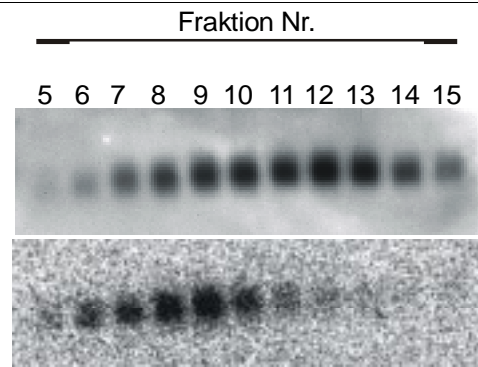


Abbildung 15 Immunblot (oben) und Bioimagerscan (unten) von durch endogene Polymerase-Reaktion (in Gegenwart von PFA) markierten Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation, experimentelle Daten Seite 77

Abbildung 15 zeigt die Verteilung der spezifischen HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten. Auch hier erkennt man wieder eine Ungleichverteilung der untersuchten enzymatischen Aktivität bei verschiedenen Dichten. Diese Ungleichverteilung ist in Diagramm 8 graphisch dargestellt.

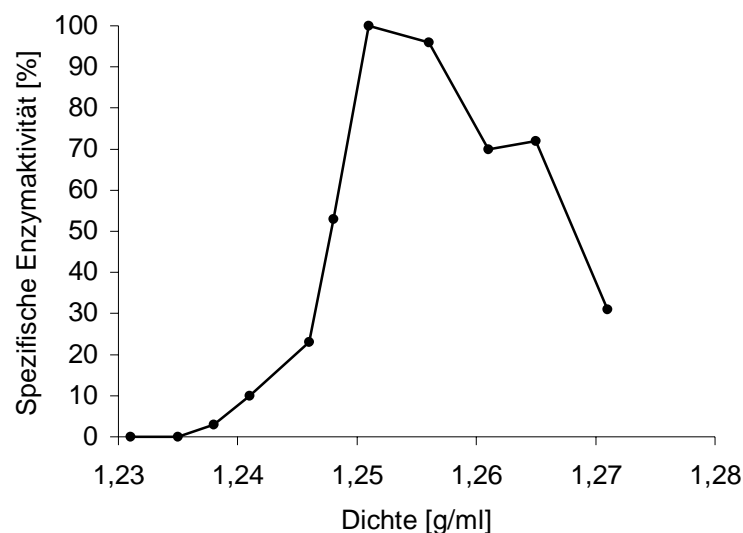


Diagramm 8 Verteilung der spezifischen HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten, experimentelle Daten auf Seite 77

Diagramm 8 zeigt einen biphasischen Verlauf mit einem Peak bei einer Dichte von 1,251 g/ml und einem zweiten bei einer Dichte von 1,265 g/ml. Im Vergleich zum Gradienten, in dem die Erststrangsynthese untersucht wurde, zeigt sich also ein zusätzlicher, starker Peak bei einer Dichte von 1,251 g/ml, der die Dichte von Core-Partikeln anzeigen sollte, in denen nur die Zweitstrangsynthese stattfindet. Der kleinere Gipfel tritt bei einer Dichte von 1,265 g/ml auf und ist, da er in den Bereich der Dichte von Core-Partikeln mit Erststrangsynthese fällt, wohl auch am ehesten als das Resultat einer nicht ganz vollständigen Inhibition der Erststrangsynthese durch das PFA zu erklären.



### Verteilung der HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität

Um die relative Verteilung von Core-Partikeln mit Erst- und Zweitstrangsynthese (in dieser Arbeit auch als HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität bezeichnet) zu ermitteln, die einen Anhalt für den relativen Anteil unreifer und reifer Core-Partikel innerhalb der Zelle gibt, wurden Core-Partikel mit nichtradioaktivem ATP endogen phosphoryliert und durch die endogene Polymerase-Reaktion in Abwesenheit eines Inhibitors wie zuvor beschrieben markiert und in einer Dichtegradientensedimentation aufgetrennt. Dieser Markierungsansatz unterscheidet sich durch die vorherige endogene Phosphorylierung von der in Kap. 4.2.2 dargestellten endogenen Polymerase-Reaktion.

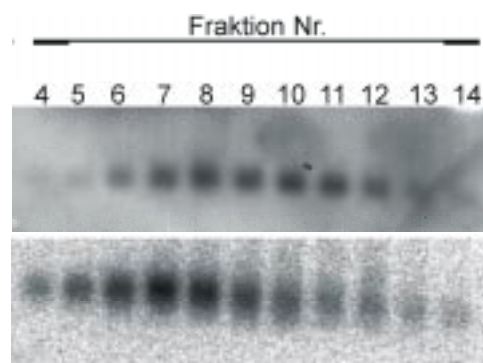


Abbildung 16 Verteilung der spezifischen HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten, experimentelle Daten auf Seite 78

Abbildung 16 zeigt die Ungleichverteilung der spezifischen HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität über den Dichtegradienten. Beispielsweise sind mehr Core-Partikel (137 pg) aus Fraktion 8 (1,254 g/ml) als aus Fraktion 7 (117 pg, 1,262 g/ml) aufgetragen, das im Bioimagerscan durch die größere Menge an Core-Partikeln erzeugte Signal ist jedoch schwächer. In Diagramm 9 ist die Auswertung dieser Untersuchung graphisch wiedergegeben.

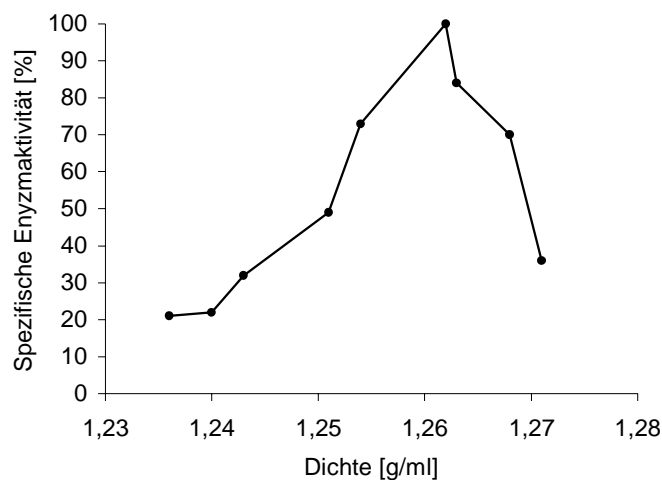


Diagramm 9 Verteilung der spezifischen HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten, experimentelle Daten auf Seite 78

Diagramm 9 zeigt die Verteilung der spezifischen HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität über den Dichtegradienten. Bei einer Dichte von 1,262 g/ml erreicht die Syntheseaktivität ihr Maximum und fällt somit genau mit dem Maximum der Erststrangsyntheseaktivität zusammen. Daher scheint es wahrscheinlich, daß das Gros Polymerase-aktiver intrazellulärer Core-Partikel vor allem Erststrangsyntheseaktivität aufweist.

#### **4.2.3 Korrelation zwischen den viralen Enzymaktivitäten**

Zusätzlich zu den experimentellen Daten bezüglich der Migration der endogenen Polymerase-Reaktion und der endogenen Proteinkinase C-Aktivität im Dichtegradienten wurden Korrelationskoeffizienten zwischen den Verteilungen der verschiedenen viralen Enzymaktivitäten über den Dichtegradienten berechnet. Für die spezifische endogene Proteinkinase C-Aktivität ergab sich dabei ein Korrelationskoeffizient von 0,99 zur spezifischen endogenen Polymerase-Aktivität, von 0,9 zur Erststrangsyntheseaktivität, von 0,3 zur Zweitstrangsyntheseaktivität und von 0,6 zur DNA-Gesamtsyntheseaktivität. Somit scheint die Verteilung der spezifischen Proteinkinase C-Aktivität über den Dichtegradienten sehr gut mit der endogenen Polymerase-Aktivität und mit der Erststrangsyntheseaktivität, aber nur mäßig mit der Gesamtsyntheseaktivität und kaum mit der Zweitstrangsyntheseaktivität zu korrelieren. Andere Verhältnisse findet man bei der spezifischen endogenen Polymeraseaktivität, die zwar ebenfalls gut mit der Erststrangsyntheseaktivität (Korr. = 0,9), aber nur wenig mit der Zweitstrangsyntheseaktivität (Korr. = 0,6) und kaum mit der Gesamtsyntheseaktivität (Korr. = 0,3) korreliert. Die DNA-Synthese in der endogenen Polymerasereaktion (ohne vorangegangene endogene Phosphorylierung) scheint daher wie zuvor erwähnt vor allem Erststrangsyntheseaktivität darzustellen.

Zur Verdeutlichung zeigt Diagramm 10 eine Zusammenstellung der verschiedenen endogenen Enzymaktivitäten.

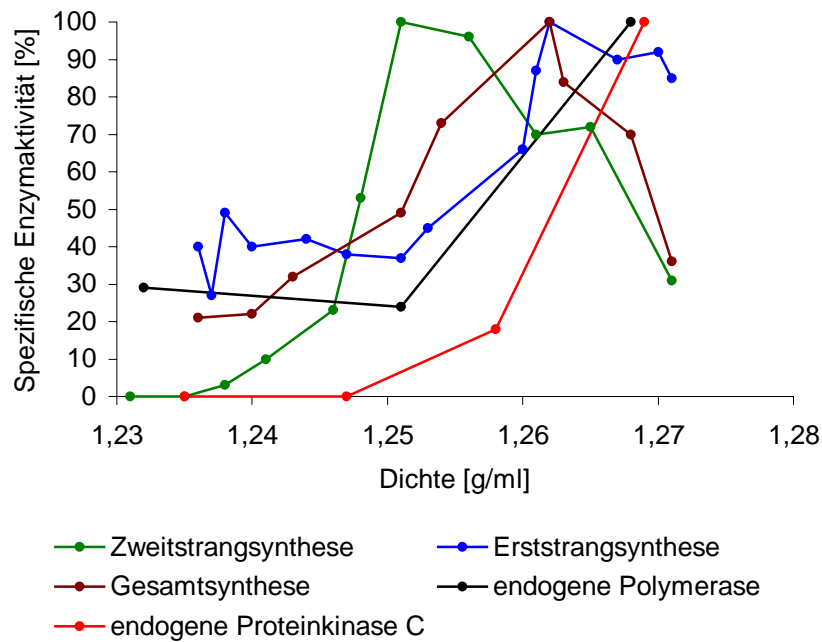


Diagramm 10 Zusammenstellung der Verläufe der verschiedenen endogenen Enzymaktivitäten über den Nycodenz-Dichtegradienten

Man erkennt, daß die Gesamtsyntheseaktivität stets zwischen der Erst- und der Zweitstrangsyntheseaktivität verläuft. Zwischen der Gesamtsyntheseaktivität einerseits und der Erststrangsyntheseaktivität bzw. der Zweitstrangsyntheseaktivität andererseits ergeben sich Korrelationskoeffizienten von 0,8, die bedeuten, daß die Gesamtsyntheseaktivität gleichermaßen aus Erststrangsyntheseaktivität und Zweitstrangsyntheseaktivität besteht. Im Vergleich zur spezifischen endogenen Polymeraseaktivität bedeutet dies eine Verschiebung von hauptsächlich Erststrangsyntheseaktivität zu mehr Zweitstrangsyntheseaktivität durch vorangegangene endogene Phosphorylierung hin. Der Korrelationskoeffizient von 0,4 zwischen Erststrangsyntheseaktivität und Zweitstrangsyntheseaktivität weist darauf hin, daß es sich um zwei Aktivitäten handelt, die unterschiedlich bandieren, welches in Übereinstimmung mit Rickwood (1989) ist, die zeigten, daß doppelsträngige DNA in Nycodenz bei einer geringeren Dichte bandiert als einzelsträngige Nukleinsäuren. Da diese Verhältnisse auch für in Capside verpackte Nukleinsäuren gelten, scheint es wahrscheinlich, daß die in Anwesenheit des Erststrangsyntheseinhibitors (PFA) durch die endogene Polymerasereaktion markierte Nukleinsäure vor allem doppelsträngige DNA ist. Die in Anwesenheit des Zweitstrangsyntheseinhibitors (Actinomycin D) markierten Core-Partikel können nur einzelsträngige DNA-Moleküle enthalten oder einzelsträngige RNA-Moleküle, die über einen kurzen Überlappungsbereich mit der neu synthetisierten einzelsträngigen DNA verbunden sind. Diese sind in der Gradientenzentrifugation – Rickwood (1989) entsprechend - am schwersten. Die durch Gesamtsynthesereaktion markierte Core-Partikel-Menge enthält sowohl Core-Partikel mit einzelsträngiger Nukleinsäure als auch Core-Partikel mit einem partiell doppelsträngigen DNA-Molekül und bandiert erwartungsgemäß zwischen den schweren (ausschließlich Einzelstrang-haltigen) und den leichten

(ausschließlich partiell doppelstrangige DNA-haltigen) Core-Partikeln, wie in Diagramm 10 zu sehen.

#### **4.2.4 Abhängigkeit der endogenen Polymeraseaktivität von der endogenen Core-Phosphorylierung**

Aus den bisher beschriebenen Versuchen ist zu entnehmen, daß sich intra- und extrazelluläre Core-Partikel durch ihren Nukleinsäuregehalt unterscheiden. Der Korrelationskoeffizient zwischen Proteinkinase C-Aktivität und DNA-Syntheseaktivität zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen diesen Enzymaktivitäten im Verlauf über den Dichtegradienten.

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung der Core-Untereinheiten einen Einfluß auf die Polymeraseaktivität hat, oder ob die Polymeraseaktivität die endogene Phosphorylierung beeinflusst, wurden intrazelluläre und extrazelluläre Core-Partikel in getrennten Ansätzen ausschließlich durch die endogene Polymerase-Reaktion wie folgt markiert:

1. Markierung durch 24 h endogene Polymerase-Reaktion mit radioaktivem dCTP (Abbildung 17 und Abbildung 18, Signal Nr. 4)
2. 24 h ohne Markierung in endogene Polymerase- und endogene Proteinkinase C-Puffer (Abbildung 17 und Abbildung 18, Signal Nr. 5)
3. Markierung durch 12 h endogene Polymerase-Reaktion mit radioaktivem dCTP, gefolgt von der Abreinigung der Nukleotide in NANOSEP-Konzentratoren und einer 12stündigen endogenen Proteinkinase C-Reaktion mit **nichtradioaktivem** ATP (Abbildung 17 und Abbildung 18, Signal Nr. 6)
4. 12 h endogene Proteinkinase C-Reaktion mit **nichtradioaktivem** ATP, gefolgt von der Abreinigung des ATPs in NANOSEP-Konzentratoren und einer 12stündigen Markierung durch endogene Polymerase-Reaktion mit radioaktivem dCTP (Abbildung 17 und Abbildung 18, Signal Nr. 7).

Anschließend wurden die freien Nukleotide bzw. das freie ATP durch NANOSEP-Konzentratoren abgereinigt, ein Aliquot der markierten Proben auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und die Core-Partikel im Immunblot nachgewiesen und quantifiziert. Anschließend wurde der radioaktive Einbau im Bioimager dargestellt, quantifiziert und die spezifische Radioaktivität errechnet und die prozentuale Verteilung – bezogen auf den Wert der stärksten Markierung - ermittelt (vgl. Tabelle 2).

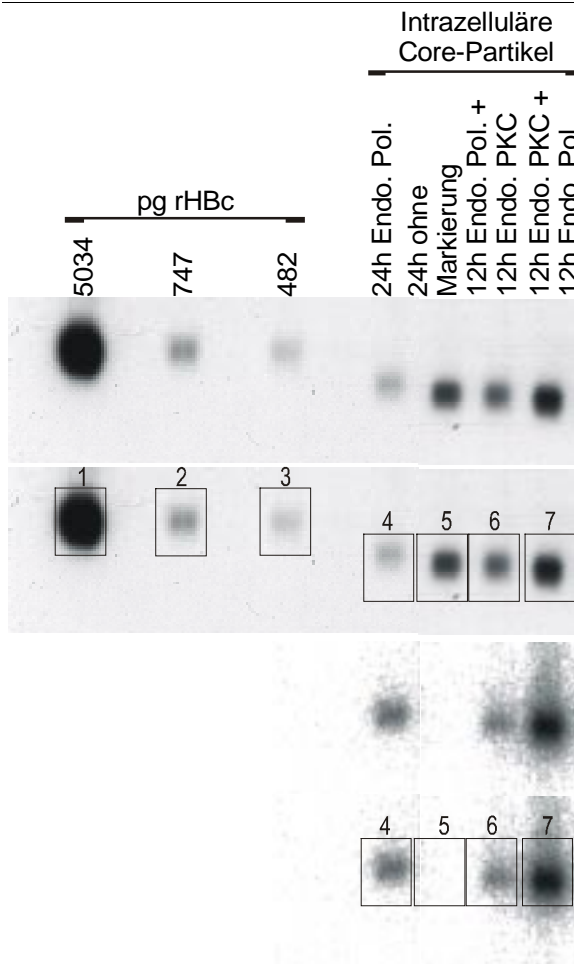


Abbildung 17 Immunblot (oben) und Bioimagerscan (unten) von durch endogene Polymerase-Reaktion markierten intrazellulären Core-Partikeln

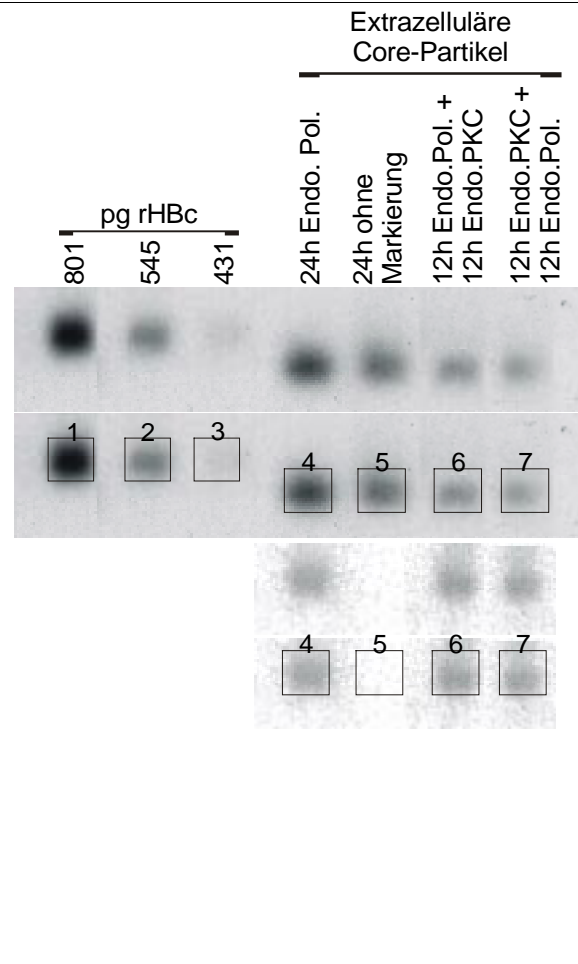


Abbildung 18 Immunblot (oben) und Bioimagerscan (unten) von durch endogene Polymerase-Reaktion markierten extrazellulären Core-Partikeln

Abb. Nr.	Signal Nr.	Markierungsweise	(PSL-bkg) /mm <sup>2</sup>	Core pg	Spezifische Radioaktivität PSL-bkg mm <sup>2</sup> x pg	Spezif. Radioakt. %
17	1	rHBc-Standard	-----	5034	-----	-----
17	2	rHBc-Standard	-----	747	-----	-----
17	3	rHBc-Standard	-----	482	-----	-----
17	4	24h endo. Pol.	3,54	611	0,00579	40
17	5	24 h ohne Markierung/Background	-----	942	-----	-----
17	6	12 h endo. Pol. + 12 h endo. PKC	2,86	942	0,00304	21
17	7	12 h endo. PKC + 12 h endo. Pol.	22,93	1567	0,01463	100
18	1	rHBc-Standard	-----	801	-----	-----
18	2	rHBc-Standard	-----	545	-----	-----
18	3	rHBc-Standard	-----	431	-----	-----
18	4	24 h endo. Pol.	2,37	718	0,0033	100
18	5	24 h ohne Markierung/Background	-----	637	-----	-----
18	6	12 h endogene Polymerase	1,24	556	0,0022	67
18	7	12 h endo. PKC + 12 h endo. Pol.	1,19	520	0,0023	70

Tabelle 2 Auswertung von Abbildung 17 und Abbildung 18

Bei intrazellulären Core-Partikeln (Abbildung 17) findet sich die maximale endogene Polymerase-Reaktion nach vorausgegangener nichtradioaktiver endogener Phosphorylie-

nung (Signal 7); ohne vorhergehende Phosphorylierung wurde nur 1/5 der Polymerase-Reaktion gemessen (Signal 6). Die alleinige Durchführung der Polymerase-Reaktion für die doppelte Zeit (Signal 4) zeigte einen doppelten Nukleotid-Einbau.

Bei extrazellulären Core-Partikeln (Abbildung 18) findet sich die maximale Markierung nach vierundzwanzigstündiger endogener Polymerase-Reaktion (Signal 4). Die zwölfstündige endogene Polymerase-Reaktion mit und ohne vorausgegangener endogener Phosphorylierung führen zu annähernd gleichen Markierungsraten von 67 % – 70 %. Anders als bei intrazellulären Core-Partikeln läßt sich bei extrazellulären Core-Partikeln keine Verstärkung der endogenen Polymerase-Reaktion nach vorausgegangener endogener Phosphorylierung um den Faktor 5 beobachten (Signal 6 und 7).

Die Daten aus den Markierungsreaktionen der intra- und extrazellulären Core-Partikel sind noch einmal vergleichend in Tabelle 3 dargestellt.

Ansatz Nr.	Markierungsreaktion	Spezifische Radioaktivität [%]	
		intrazelluläre Core-Partikel	Extrazelluläre Core-Partikel
1	24 h endogene Polymerase	40	100
3	12 h endogene Polymerase	21	67
4	12 h endo. PKC + 12 h endo. Pol.	100	70

Tabelle 3 Verschiedene Markierungen intrazellulärer und extrazellulärer Core-Partikel

### 4.3 Destabilisierung von Core-Partikeln

Im Rahmen des HBV-Lebenszyklus muß das in die Core-Partikel verpackte Virusgenom wieder entlassen werden, wofür die Partikelstruktur des Cores aufgelöst werden muß. Am plausibelsten erscheint hierbei eine Destabilisierung der Core-Partikel in Abhängigkeit von der Partikelreifung.

Die Phosphorylierung der Core-Untereinheiten bewirkt eine verminderte Interaktion der Core-Moleküle mit der verpackten Nukleinsäure (Kann and Gerlich (1994)). Diese Interaktion wird durch den Carboxyterminus der Core-Untereinheiten bewirkt, der nicht am Aufbau der Core-Partikel im Sinne einer Interaktion mit benachbarten Core-Untereinheiten beteiligt ist (Bottcher, et al. (1997)). Deletionsanalysen des Carboxyterminus zeigten auch, daß intakte Core-Partikel ohne verpackte RNA gebildet werden, diese jedoch eine verminderte Stabilität aufweisen (Birnbaum and Nassal (1990)). Daraus ergab sich die Frage, ob eine verminderte Stabilität ein Resultat aus der fehlenden Core-Nukleinsäure-Interaktion sein könnte. In diesem Falle ergäbe sich die Hypothese, daß die Phosphorylierung der Core-Untereinheiten - über eine verminderte Interaktion mit der verpackten Nukleinsäure - ebenfalls eine verminderte Stabilität bewirken kann. Um dieses Modell experimentell zu überprüfen, wurden intrazelluläre Core-Partikel – nach radioaktiver Markierung durch die endogene Polymerase bzw. durch die endogene Proteinkina-

se C – in einen Stabilitätsassay eingesetzt, in dem die Degradation der Core-Partikel in An- und Abwesenheit von ATP - dem Substrat zur Phosphorylierung der Core-Untereinheiten - untersucht wurde. Dabei wurden Core-Partikel einer Schwebbedichte verwendet, bei der die jeweilige spezifische endogene Enzymaktivität maximal ist. Um intrazelluläre Bedingungen zu simulieren, wurde die Stabilität der Core-Partikel im cytosolischen Extrakt (Rabbit Reticulocyte Lysate, RRL) im Vergleich zu Puffer (Transportpuffer, TP) untersucht. Um eine möglichst große Nähe zur in-vivo-Situation zu erzielen, war es notwendig, eine möglichst große Konzentration cytosolischer Faktoren zu verwenden. Daher wurde Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), welches in einer Proteinkonzentration von 70 mg/ml geliefert wird, benutzt. Vorversuche mit 4 h und 12 h-Inkubation in RRL ergaben nur eine schwache Zersetzung der Core-Partikel, erst nach einer 24stündigen Inkubation war eine deutliche Zersetzung sichtbar.

Als Marker für die Zersetzung der Core-Partikel diente der Nachweis der Partikel im nativen Immunblot mit einem Partikel-spezifischen Antikörper (Kaninchen-anti-HBc-Ak). Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde die Zugänglichkeit des verpackten Genoms für die S7-Nuklease getestet. Diese sollte nur dann das Innere der Core-Partikel – also das verpackte Genom – erreichen, wenn die Struktur der Partikel desintegriert ist. Als Maß für die Zugänglichkeit des Virusgenoms wurde die Degradation der radioaktiv durch die endogene Polymeraseaktivität markierten DNA ermittelt. Dazu wurden intrazelluläre Core-Partikel mit dem gleichen Volumen RRL bzw. TP versetzt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze nach Zugabe von S7-Nuklease weitere 30 min bei 37 °C inkubiert und die enzymatische Degradation der Nukleinsäuren anschließend mit EDTA gestoppt. Auch bei Untersuchungen mit Core-Partikeln, die ausschließlich endogen phosphoryliert waren, wurde der S7-Nuklease-Degradation aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit mit den Untersuchungen, in denen durch endogene Polymerase-Reaktion markierte Core-Partikel verwendet wurden, durchgeführt. Ein Aliquot der Proben wurde in einem nativen 1 % Agarosegel aufgetrennt und in einem Immunblot auf Integrität der Core-Partikel getestet. Danach wurde eine Bioimager-Exposition des Immunblots durchgeführt und ausgewertet. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.

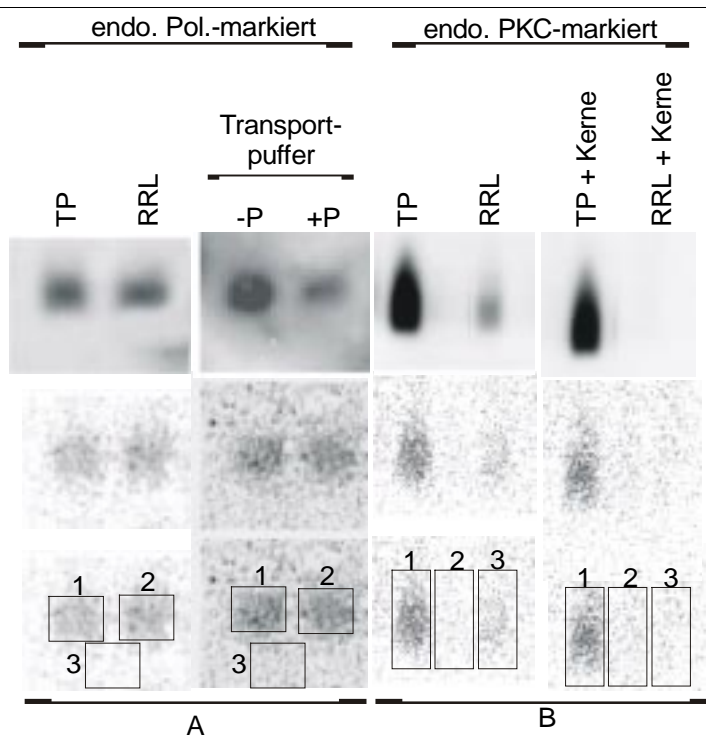


Abbildung 19 Immunblot (oben) und Bioimagerscan (darunter) der Stabilitätsuntersuchungen, Teil A nach Entfernung eines Artefakts im Immunblot des RRL-Ansatzes

-P / + P ohne / mit endogener Phosphorylierung

TP Transportpuffer

RRL Rabbit Reticulocyte Lysate

A Markierung durch endogene Polymerase-Reaktion

B Markierung durch endogene Phosphorylierung

Teil von Abbildung 19	Signal Nr.	Endo. Pol	Endo. PKC	24 h Inkubation in	(PSL-bkg)/ mm <sup>2</sup>	Restradio- aktivität [%]
A	1	+	-	TP	1,21	100
A	2	+	-	RRL	1,25	103
A	3	-----	-----	Background	-----	-----
B	1	+	+	TP	0,70	100
B	2	+	+	TP	0,61	87
B	3	-----	-----	Background	-----	-----
C	1	-	+	TP	0,41	100
C	2	-	+	RRL	0,18	44
C	3	-----	-----	Background	-----	-----
D	1	-	+	TP + Kerne	0,41	100
D	2	-	+	RRL + Kerne	0,08	20
D	3	-----	-----	Background	-----	-----

Tabelle 4

Auswertung der Stabilitätsuntersuchungen

Die durch endogene Polymerase-Reaktion markierten Core-Partikel zersetzen sich in RRL im Vergleich zu Transportpuffer (TP) nicht (Abbildung 19, Teil A, linke Hälfte), wie durch die Auswertung des Bioimagerscans deutlich wird. Werden solche Core-Partikel zusätzlich mit nichtradioaktivem ATP endogen phosphoryliert, so erkennt man nach Inkubation in Transportpuffer eine geringe Abnahme der Restradioaktivität auf 87 % des Wertes der Negativkontrolle (ohne endogene Phosphorylierung, Abbildung 19, Teil A,



rechte Hälfte). Dies legt einen destabilisierenden Effekt der endogenen Phosphorylierung nahe, obwohl ein Synergismus zwischen endogener Phosphorylierung und endogener Polymerase-Reaktion aufgrund dieser Daten nicht völlig auszuschließen ist. Da, wie in Abbildung 19, Teil B gezeigt, ausschließlich endogen phosphorylierte Core-Partikel deutlich zerlegt werden, ist ein Synergismus jedoch unwahrscheinlich.

Im Immunblot ist die Zersetzung der Core-Partikel deutlicher zu erkennen als im Bioimagerscan. Das Verschwinden des Partikel-spezifischen Epitops bedeutet nicht zwangsläufig eine Desintegration der Core-Partikel. Daher ist die Reduktion der Signalstärke im Immunblot weniger aussagekräftig als dieselbe Reduktion der Signalstärke im Bioimagerscan, die nur nach Öffnung der Core-Partikel und Degradation der markierten viralen DNA durch die S7-Nuklease zustande kommen kann. Ein mangelhafter S7-Nuklease-Verdau kann ausgeschlossen werden, da diese Divergenz auch bei ausschließlich endogen phosphorylierten Core-Partikeln auftritt (vgl. Abbildung 19, Teil B). Weiterhin ist es nicht möglich, daß die Divergenz zwischen Immunblot und Bioimagerscan dadurch entsteht, daß die Zersetzung durch reife, instabile, aber nur noch relativ schwach durch die endogene Polymerase-Reaktion markierbare Core-Partikel zustande kommt, da für diese Untersuchungen Core-Partikel mit einer starken endogenen Polymerase-Aktivität, also mit einem unreifen Genom verwendet wurden. Vielmehr scheint sich hier der Unterschied zwischen der sigmoiden Schwärzungskinetik des im Immunblot verwendeten Röntgenfilms und der linearen Schwärzungskinetik der Bioimaging-Platte zu manifestieren. Da die quantitative Auswertung der Partikel-Destabilisierung anhand der Bioimagerscans vorgenommen wurde ist die angegebene Zersetzung die minimale in diesen Untersuchungen gefundene Zersetzung. Möglicherweise ist das Ausmaß der tatsächlichen Partikel-Dissoziation noch größer.

Da diese, durch endogene Phosphorylierung ausgelöste Destabilisierung in Transportpuffer gezeigt wurde, lag es nahe, die Stabilität endogen phosphorylierter Partikel auch im cytosolischen Extrakt (RRL) zu untersuchen. Dazu wurden mit radioaktivem ATP endogen phosphorylierte Core-Partikel in einen Stabilitätsassay unter Zusatz eines ATP-generierenden Systemes (Creatinphosphokinase (SIGMA, Deisenhofen) ad 20 U/ml, Creatinphosphat (SIGMA) ad 5 mM, ATP (Boehringer, Mannheim) ad 1 mM, modifiziert nach Adam, et al. (1990)) eingesetzt. Abbildung 19 (Teil B, linke Hälfte) zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Man erkennt eine deutliche Reduktion der Menge an Core-Partikeln im RRL-Ansatz auf 44 % des Vergleichswertes der Negativkontrolle (Transportpuffer). Die endogene Phosphorylierung wirkt also destabilisierend auf die Core-Partikel, wobei der destabilisierende Effekt aber erst voll im cytosolischen Extrakt zum Tragen kommt. Diese Destabilisierung von ausschließlich durch endogene Phosphorylierung markierten Core-Partikel befindet sich in Übereinstimmung mit der zuvor geäußerten Vermutung, daß kein Synergismus von endogener Polymerase-Reaktion und endogener Phosphorylierung in Hinsicht auf die Destabilisierung der Core-Partikel vorliegt.

Auch hier ist eine Divergenz zwischen der im Immunblot sichtbaren Zerlegung und der im Bioimagerscan zu erkennen. Da hier aber im Gegensatz zu den vorigen Untersuchungen keine durch endogene Polymerase-Reaktion markierten Core-Partikel verwendet wurden, wird die zuvor aufgestellte Hypothese bestätigt, daß die beobachtete Divergenz weder durch eine mangelhafte S7-Nuklease-Degradation, noch durch die Verwendung von reifen und daher möglicherweise instabilen, aber schwach markierten Core-Partikeln zustande kommt.

Da unbekannt ist, in bzw. an welchem Zellkompartiment die Zersetzung der Core-Partikel stattfindet, sollte - in Analogie zu den Herpes- und Adenoviren (Sodeik, et al. (1997), Greber, et al. (1997)) - untersucht werden, ob dem Zellkern eine Funktion bei der Desintegration der Core-Partikel zukommt.

Um den Einfluß von Zellkernen und anderen cytoskeletalen Bestandteilen zu untersuchen, wurden endogen phosphorylierte Core-Partikel der Schwebedichte von 1,26 g/ml wie in vorigem Versuch in einen Stabilitätsassay mit ATP-generierendem System eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Huh7-Kernpräparation, bei der aufgrund der Herstellungsweise Reste des Cytoskeletts und des ER enthalten sein können, in einer Konzentration ad  $1,5 \times 10^5$  Zellkerne/ $\mu$ l Versuchansatz hinzugegeben. Der weitere Verlauf des Versuchs erfolgte wie zuvor beschrieben. Abbildung 19 (Teil B, rechte Hälfte) zeigt diesen Versuch. Man erkennt eine auf 20 % reduzierte Restradioaktivität im Ansatz mit RRL und Kernpräparation. Die Zerlegung der Core-Partikel in RRL mit Kernpräparation ist mit 80 % um die Hälfte stärker als die in vorigem Versuch gezeigte Zerlegung von 56 % in RRL alleine.

## 5 Diskussion

Das HBV vermehrt sich über ein RNA-Replikationsintermediat, welches vom nukleären Virusgenom transkribiert wird. Dieses RNA-Intermediat wird nach seiner Synthese und folgendem Transport ins Cytoplasma von der viralen Polymerase gebunden (Junker-Niepmann (1990)) und zusammen mit zellulärer Proteinkinase C (PKC, Kann, et al. (1993)) ins virale Nucleocapsid (Core-Partikel) verpackt (Bartenschlager and Schaller (1992)). Die weitere Genomreifung, d.h. die Umschreibung der RNA in (-)-Strang-DNA (auch als Erststrangsynthese bezeichnet) und die folgende (+)-Strang-DNA-Synthese (auch als Zweitstrangsynthese bezeichnet) findet innerhalb der Core-Partikel im Cytosol der infizierten Zelle statt (Summers and Mason (1982)), wobei die verpackte PKC zu einem unbekanntem Zeitpunkt die Core-Untereinheiten vom Lumen der Partikel aus phosphoryliert. Reife Core-Partikel, also Core-Partikel, die das partiell doppelsträngige DNA-Virusgenom beinhalten, können anschließend zum einen in die viralen Hüllproteine verpackt und als Viren sekretiert werden (Huovila, et al. (1992), Gerelsaikhan, et al. (1996)), oder zum anderen ihr Genom in den Zellkern der bereits infizierten Zelle entlassen und so zu einer Amplifikation der nukleären Virus-DNA führen (Tuttleman, et al. (1986)). Da das Genom zunächst im viralen Nucleocapsid verpackt vorliegt, muß, um die Transkription der viralen RNAs im Kern zu ermöglichen, das Virusgenom aus dem Capsid freigesetzt werden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Stabilität der Core-Partikel untersucht werden. Bei diesen Untersuchungen galt es jedoch zu berücksichtigen, daß die virale (+)-Strang-DNA-Synthese vom Vorhandensein der Core-Untereinheiten abhängig ist (Nassal (1992)), so daß ein vorzeitiges Auseinanderfallen der Core-Partikel zu einer Unterbrechung des viralen Lebenszyklus führen würde. Daher wurde von der Hypothese ausgegangen, daß die Stabilität der Core-Partikel vom Reifegrad des verpackten Virusgenom abhängig ist, welches bedeutet, daß reife Core-Partikel instabiler als unreife Partikel sein sollten. Dies würde bedingen, daß entweder die Art der Nukleinsäure – RNA oder DNA – die Stabilität der Partikel direkt beeinflusst, oder aber, daß die begleitende Phosphorylierung der Core-Untereinheiten die Destabilisierung der Partikel bewirkt.

Grundlage derartiger Untersuchungen zur Reife-abhängigen Stabilität ist, daß eine Möglichkeit zur Aufreinigung von Core-Partikeln existiert, die Core-Partikel ihrem Nukleinsäuregehalt nach auftrennt und mit der auch instabile Core-Partikel extrahiert werden können. Bislang wurden zur Aufreinigung vorwiegend die Sedimentation oder isopyknische Dichtegradienten eingesetzt, wobei in Dichtegradienten eine bessere Abtrennung der Core-Partikel von Kontaminationen beobachtet wurde. Aufgrund der hohen Dichte der Core-Partikel wird hierbei zumeist CsCl eingesetzt, in dem die Core-Partikel je nach Herkunft (Leber oder Serum) und Zentrifugationsbedingungen bei Dichten von 1,30 g/ml – 1,36 g/ml (Hess, et al. (1981)) bandieren. Ein Nachteil dieser Technik ist jedoch, daß nach Zentrifugation in CsCl keine endogene Polymerase-Aktivität mehr vorliegt. Ein weiterer Nachteil liegt in der extrem hohen Verlustrate der Partikel von ca. 93 %, wie in

dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Andere Autoren (Albin and Robinson (1980), Feitelson, et al. (1982)) finden bei Core-Partikeln aus Leber oder Plasma eine Gleichverteilung der viralen Polymerase-, der Proteinkinase-Aktivität und der Core-Antigenität über CsCl-Dichtegradienten nach einem ersten Zentrifugationsschritt. Erfolgt jedoch eine zweite CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, so trennen sich die beiden Enzymaktivitäten voneinander, vermutlich bedingt durch eine Desintegration der Core-Partikel in CsCl (Ohori, et al. (1980), (Feitelson, et al. (1982))). Dieser Effekt würde zusätzlich die Untersuchung der viralen Proteinkinase- und Polymerase-Aktivitäten stören. Da eine ähnlich hohe Zersetzung auch in KBr-Gradienten beobachtet wurde (unveröffentlichte Beobachtung von Frau Dipl. Biol. Angelika Vlachou, Institut für medizinische Virologie, Justus Liebig-Universität in Gießen), liegt es nahe, daß die hohe Salzkonzentration - beispielsweise von ca. 2,8 M bei Verwendung von CsCl - bei der Schwebbedichte der Partikel zu einer Destruktion führt. Auch die Sedimentation durch visköse Gradientenmedien zeigt eine nur unbefriedigende Stabilität. Versuche mit Saccharose und Ficoll ergaben eine Wiederfindungsrate von 25 % bzw. 9 % (unveröffentlichte Beobachtung von Frau Dipl. Biol. Angelika Vlachou, Institut für medizinische Virologie, Justus Liebig-Universität Gießen).

Da davon ausgegangen werden kann, daß sich bevorzugt instabile Core-Partikel in den oben genannten Medien zersetzen würden, wurde mit Nycodenz ein Medium verwendet, das weitgehend inert ist, so daß auch enzymatische Reaktionen – wie zum Beispiel die der Adenylatcyclase, der Glucose-6-phosphatase oder der Succinatdehydrogenase (Nycomed (1996)) - größtenteils unbeeinflusst ablaufen. Eine mögliche Zersetzung besonders der instabilen Core-Partikel ist auch hier nicht auszuschließen; sie sollte jedoch bei einer Wiederfindungsrate von 93 %, wie in diese Arbeit gezeigt, wesentlich geringer als in den anderen erwähnten Zentrifugationsmedien sein.

Da Seren oder Biopsiematerial zur Gewinnung von Core-Partikeln nur in unzureichenden Mengen erhältlich sind, wurde auf Core-Partikel zurückgegriffen, die aus einer stabil mit dem HBV-Genom transfizierten Zellkulturlinie (HepG2.2.15-Zellen, Sells, et al. (1987)) aufgearbeitet wurden. Viren, die von dieser Zelllinie sekretiert werden, sind infektiös (Sells, et al. (1988)), so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Core-Partikel dieser Zelllinie den natürlichen Partikeln in infizierten Patienten entsprechen. Diese Core-Partikel mußten zunächst hinsichtlich ihres Sedimentationsverhaltens in der Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation charakterisiert werden.

### **5.1 Verteilung von Core-Partikeln über den Dichtegradienten**

In der Literatur existieren nur wenige Berichte über die Verwendung von Nycodenz-Dichtegradienten zur Auftrennung von Viren. Es wurde zur Aufreinigung des pflanzenpathogenen La France-Disease-Virus (van der Lende, et al. (1994)) oder des Herpes

Simplex Virus Typ 1 (Sathananthan, et al. (1997)) eingesetzt, zur Auftrennung von HBV-Core-Partikeln aber bisher nicht beschrieben. Daher wurde die Verteilung intrazellulärer und extrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten untersucht. In der Dichtegradientensedimentation zeigten intrazelluläre Core-Partikel einen nach beiden Seiten hin relativ gleichmäßig abfallenden, einzelnen Peak mit einem Maximum bei einer Dichte von 1,242 g/ml. Erwartungsgemäß zeigt sich der Peak bei einer anderen Dichte als nach Zentrifugation in CsCl (1,350 g/ml), da Zentrifugationsmedien u.a. durch ihre unterschiedlichen Molekülgrößen, Hydratisierungseigenschaften und Viskositäten maßgeblich die apparenten Sedimentationsdichten der aufzutrennenden Partikel beeinflussen. Eine zur Nycodenz-Sedimentation analog durchgeführte Flotation zeigte dieselbe Dichte des Core-Partikel-Maximums, womit gezeigt wurde, daß unter den gewählten Zentrifugationsbedingungen die Schwebedichte der Partikel erreicht wurde. Unter diesen Bedingungen wurde das Sedimentationsverhaltens extrazellulärer Core-Partikel untersucht. Die Auftrennung zeigte eine maximale Core-Partikel-Konzentration bei einer Dichte von 1,222 g/ml und unterschied sich somit deutlich von der Peak-Dichte intrazellulärer Core-Partikel bei 1,244 g/ml. Die Verteilung intra- und extrazellulärer Core-Partikel nach Dichtegradientensedimentation ist in Diagramm 11 vergleichend dargestellt; der eingezeichnete Pfeil markiert die Dichteverschiebung von intra- zu extrazellulären Core-Partikeln.

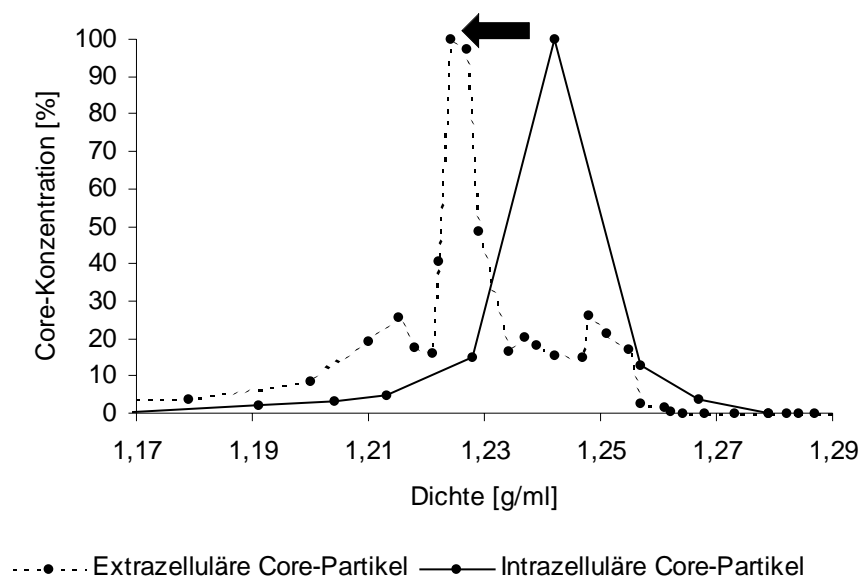


Diagramm 11 Verteilung intra- und extrazellulärer Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten

Da bisher in der Literatur keine morphologischen Unterschiede zwischen intra- und extrazellulären Core-Partikeln beschrieben wurden, ist davon auszugehen, daß sich extrazelluläre Core-Partikel von ihren intrazellulären Pendanten weitgehend durch ihren Inhalt unterscheiden. Dabei sollten extrazelluläre Core-Partikel vor allem partiell doppelsträngige DNA (Gerelsaikhan, et al. (1996)), intrazelluläre vor allem Replikationsintermediate wie beispielsweise das virale RNA-Prägenom beinhalten. Es war jedoch nicht auszuschlie-

ßen, daß auch die endogene Kinasereaktion auf die Partikelstruktur einen Einfluß haben könnte, ohne daß die geänderte Partikelstruktur morphologisch erkennbar ist. Einen Hinweis auf ein solches Phänomen ergibt sich aus Arbeiten von Kann, et al. (1999), in denen gezeigt wurde, daß ausschließlich phosphorylierte Core-Partikel an den Zellkern binden, ohne daß sich die Partikelstruktur bei elektronenmikroskopischer Betrachtung ändert. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß den morphologischen Analysen Grenzen gesetzt sind, da der die Phosphorylierungsstellen tragende Carboxyterminus der Core-Partikel keine reguläre Struktur besitzt und daher selbst in der Cryoelektronenmikroskopie nicht darstellbar ist.

Um einen eventuellen Unterschied in der Sedimentation zu untersuchen, wurde das Verhalten von Core-Partikeln vor und nach endogener Phosphorylierung untersucht.

### ***Sedimentationsverhalten endogen phosphorylierter Core-Partikel***

Zur Untersuchung des Sedimentationsverhaltens endogen phosphorylierter Core-Partikel wurden auf diese Weise markierte Core-Partikel in einer Dichtegradientensedimentation aufgetrennt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zum Sedimentationsverhalten unmarkierter Core-Partikel; beide Peak-Fractionen erscheinen bei ungefähr der gleichen Dichte von 1,242 g/ml bzw. 1,246 g/ml. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß wohl auch die unmarkierten Core-Partikel in unbekanntem Maß phosphoryliert sind. Da weiterhin keine verlässliche Angabe darüber gemacht werden kann, wieviele Phosphate pro Core-Partikel durch die endogene Kinasereaktion eingebracht werden, bzw. ob dies homogen für alle Core-Partikel zutrifft, kann nur festgestellt werden, daß aus der Kinasereaktion keine Änderung des Sedimentationsverhaltens resultiert. Eine Änderung der Schwebedichte muß also damit auf den Nukleinsäuregehalt zurückzuführen sein. In der Tat muß aber eine geringe Änderung der Struktur postuliert werden, da Vorversuche gezeigt haben, daß endogen phosphorylierte Core-Partikel von Goldgekoppeltem Trypsin degradiert wurden, während Core-Partikel, die keiner endogenen Proteinkinase C-Reaktion unterzogen worden waren, nicht degradiert wurden (unveröffentlichte Beobachtung von Dr. M. Kann, Institut für Medizinische Virologie der Justus Liebig-Universität in Gießen). Dies befindet sich in Übereinstimmung mit der Exposition eines Kerntransportsignals nur in phosphorylierten Core-Partikeln (Kann, et al. (1999)).

## **5.2 Endogene Enzymaktivitäten**

Um die Verteilung der endogenen Enzymaktivitäten über den Dichtegradienten zu untersuchen, wurden intrazelluläre Core-Partikel durch Zugabe radioaktiven  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTPs bzw.

$\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATPs markiert, in einer Dichtegradientensedimentation aufgetrennt und analysiert. Andere Autoren konnten eine Comigration von Proteinkinase-Aktivität, Polymerase-Aktivität und Core-Antigenität über den Dichtegradienten zeigen (Albin and Robinson (1980), Feitelson, et al. (1982)). Gerlich, et al. (1982) wiesen darauf hin, daß die Proteinkinase-Aktivität von in CsCl „schweren“ Core-Partikeln geringer als die leichter Core-Partikel war.

Hier wurde die Verteilung der spezifischen Proteinkinase C-Aktivität über den Dichtegradienten dargestellt; sie erreicht in Core-Partikeln einer Dichte von 1,269 g/ml ihr Maximum und sinkt mit geringer werdenden Dichten ab, wobei die Interpretierbarkeit des Verlaufs der Proteinkinase C-Aktivität über den Dichtegradienten begrenzt ist: Wie zuvor erwähnt, kann anhand der experimentellen Daten zunächst nicht beurteilt werden, ob die endogene Proteinkinase C-Aktivität bei einer gegebenen Dichte beispielsweise schwach ist, weil die Phosphorylierung schon stattgefunden hat, oder weil sie noch nicht stattfinden kann (z.B. da das RNA-Prägenom noch innen an den Core-Proteinen der Partikel gebunden ist).

Analog dazu wurde die Verteilung der spezifischen endogenen Polymerase-Aktivität intrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten untersucht. Die summarische Darstellung in Diagramm 12 zeigt das Maximum beider spezifischen Enzymaktivitäten bei der gleichen Dichte.

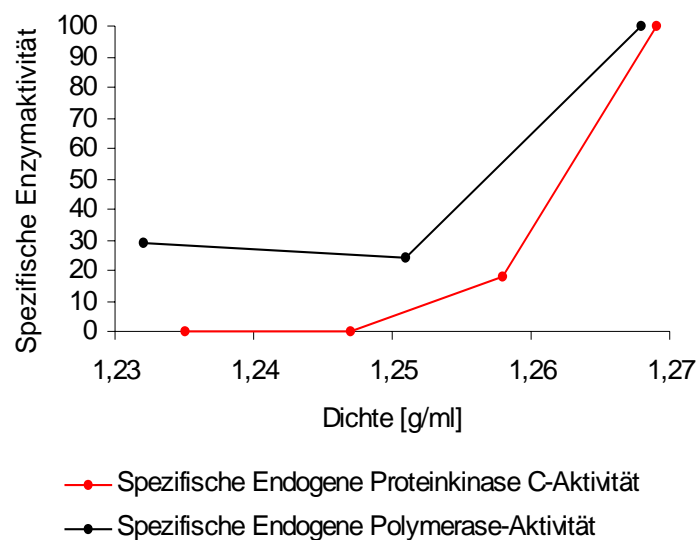


Diagramm 12 Verlauf der Proteinkinase C-Aktivität und der Polymerase-Aktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten

Im Unterschied zu bisher publizierten Untersuchungen (Albin and Robinson (1980), Feitelson, et al. (1982)) sieht man hier die Comigration der viralen Enzymaktivitäten **bezogen auf die gleiche Menge an Core-Partikeln**, wobei der in Kap. 7.1.11 beschriebene Korrelationskoeffizient von 0,99 zwischen diesen beiden viralen Enzymaktivitäten zusätzlich zur graphischen Darstellung den starken Zusammenhang deutlich macht. Diese sehr

gute Korrelation könnte durch einen mechanistischen Zusammenhang bedingt sein, wobei folgende, in Diagramm 13 dargestellte Hypothesen in Betracht kamen:

- 1) Die endogene Phosphorylierung der Core-Proteine tritt vor der Verpackung des RNA-Prägenoms in die neu synthetisierten Core-Partikel auf. Eine experimentell durchgeführte endogene Polymerase-Reaktion kann daher nicht mehr durch die endogene Phosphorylierung beeinflusst werden und sollte keine Korrelation zum Verlauf der Erst- oder Zweitstrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten zeigen. Ferner sollte im Experiment die radioaktive Markierung der Core-Proteine durch die endogene Phosphorylierung nicht mehr möglich sein.
- 2) Die endogene Phosphorylierung erfolgt vor der reversen Transcription des verpackten RNA-Prägenoms. Der Verlauf der Proteinkinase C-Aktivität sollte mit dem Verlauf der (-)-Strangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten korrelieren und letztere im Experiment durch die endogene Phosphorylierung beeinflussbar sein.
- 3) Die endogene Phosphorylierung erfolgt im Zuge der reversen Transcription dergestalt, daß die Phosphorylierung an den Stellen erfolgt, an denen das RNA-Prägenom schon in (-)-Strang-DNA überschrieben wurde, während an den Stellen, an denen das RNA-Prägenom noch an die Core-Proteine gebunden ist, noch keine Phosphorylierung stattgefunden hat. In diesem Fall sollte der Verlauf der endogenen Phosphorylierung mit dem Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten korrelieren; die endogene Phosphorylierung sollte im Experiment aber keinen Einfluß auf die Erststrangsynthese ausüben.
- 4) Die endogene Phosphorylierung erfolgte im Zuge der Zweitstrangsynthese. In diesem Falle sollte der Verlauf der endogenen Proteinkinase C-Aktivität mit dem Verlauf der Zweitstrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten korrelieren; im Experiment sollte die endogene Phosphorylierung die Zweitstrangsynthese beeinflussen.
- 5) Die endogene Phosphorylierung erfolgt nach der Zweitstrangsynthese. In diesem Falle sollte der Verlauf der endogenen Proteinkinase C-Aktivität weder mit dem Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität, noch mit dem Verlauf der Zweitstrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten korrelieren; im Experiment sollte die endogene Phosphorylierung die endogene Polymerase-Reaktion daher nicht mehr beeinflussen können.

Durch den dargestellten korrelierenden Verlauf von Proteinkinase C- und Polymerase-Aktivität über den Dichtegradienten ergaben sich Hinweise darauf, daß die Hypothesen 1 („Phosphorylierung vor RNA-Verpackung“) und 5 („Phosphorylierung nach (+)-Strangsynthese“) wahrscheinlich nicht zutreffen. Der eingehenden Differenzierung zwischen den Hypothesen dienten sowohl die Untersuchungen zur zeitlichen Abfolge der enzymatischen Reaktionen (Kap.5.3), als auch die Untersuchungen zum Verlauf der verschiedenen Polymerase-Aktivitäten über den Dichtegradienten (Kap.5.4).



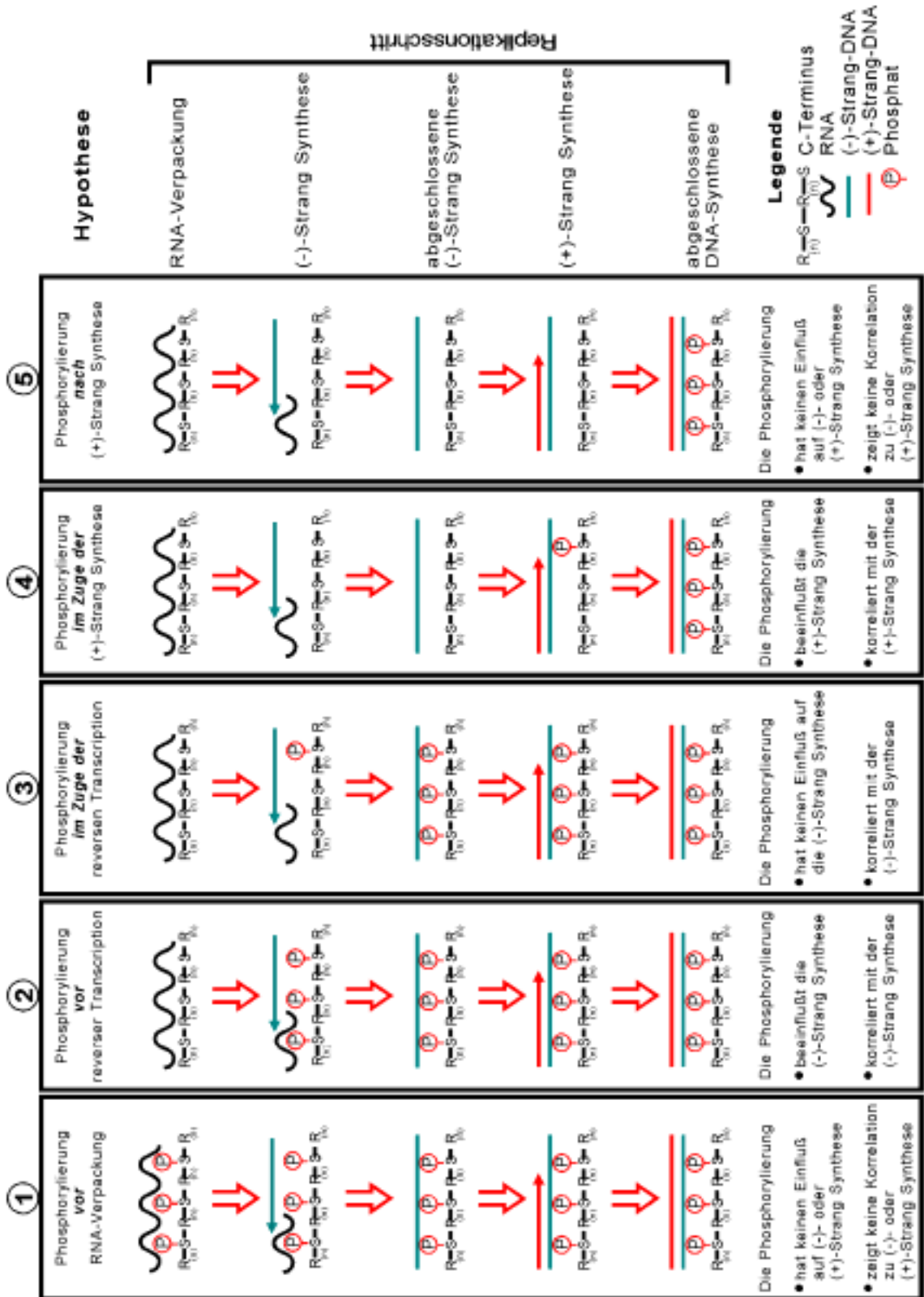


Diagramm 13

Hypothesen zum Zeitpunkt der endogenen Phosphorylierung

### 5.3 Zeitliche Abfolge von Polymerase-Reaktion und Phosphorylierung

Um die Abfolge der viralen Enzymaktivitäten zu untersuchen, wurden intra- und extrazelluläre Core-Partikel ohne oder nach erfolgter nichtradioaktiver endogener Phosphorylierung (12 h) durch die endogene Polymerase-Reaktion in Gegenwart radioaktiver Nukleotide (12 h) markiert und deren Einbau quantifiziert. Als Kontrolle wurden Core-Partikel für die doppelte Zeitspanne (24 h) durch die endogene Polymerase-Reaktion markiert. Die Auswertung für intrazelluläre Core-Partikel ergab nach 24stündiger endogener Polymerase-Reaktion eine Markierungstärke von 40 % der maximalen Markierung. Die maximale Markierung (100 %) fand sich nach 12stündiger endogener Polymerase-Reaktion bei **vorausgegangener** endogener Phosphorylierung mit nichtradioaktivem ATP. Diese Markierung ist ca. um den Faktor 5 stärker als die beobachtete Markierung bei endogener Polymerase-Aktivität für dieselbe Zeitspanne. Diese Verstärkung war nur bei intrazellulären, nicht aber bei extrazellulären Core-Partikeln zu beobachten. Die endogene Phosphorylierung scheint daher die endogene Polymerase-Reaktion zu beeinflussen. In Diagramm 14 ist dieser Verstärkungseffekt graphisch dargestellt.

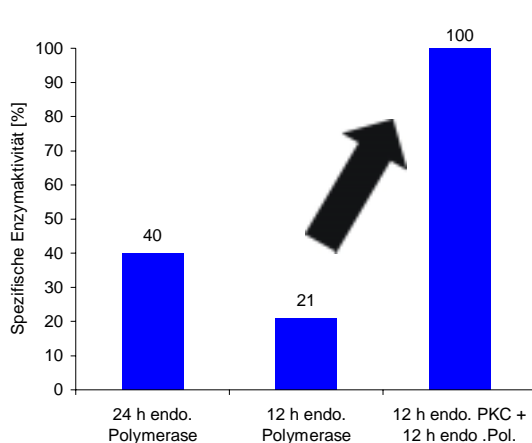


Diagramm 14 Radioaktive Markierung nach verschiedenen durchgeführten endogenen Polymerase-Reaktionen bei **intrazellulären** Core-Partikeln

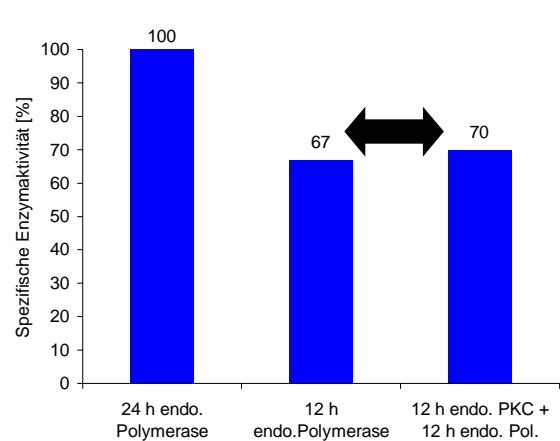


Diagramm 15 Radioaktive Markierung nach verschiedenen durchgeführten endogenen Polymerase-Reaktionen bei **extrazellulären** Core-Partikeln

Den Kontrollansätzen in Diagramm 14 ist zu entnehmen, daß bei intrazellulären Core-Partikeln nach 24 Stunden endogener Polymerase-Reaktion eine etwa doppelt so starke radioaktive Markierung (40 %) wie in Core-Partikeln mit nur 12stündiger endogener Polymerase-Reaktion (21 %) erfolgte. Die endogene Polymerase-Reaktion befindet sich demzufolge auch nach 24 h noch nicht im Sättigungsbereich.

Demgegenüber findet man bei extrazellulären Core-Partikeln (Abbildung 15) die maximale Einbaurate bei 24stündiger endogener Polymerase-Reaktion (100 %). Da eine 12stündige endogene Polymerase-Reaktion nicht 50 %, sondern 67 % der Markierung der 24stündigen endogenen Polymerase-Reaktion bewirkt, scheint sich die Polymerase-Reaktion bei extrazellulären Core-Partikeln näher am Sättigungsbereich zu befinden als bei intrazellulären Core-Partikeln. Bei vorausgegangener endogener Phosphorylierung findet man im Gegensatz zu intrazellulären Core-Partikeln keine verstärkte Markierung durch die endogene Polymerase-Reaktion.

Diese Daten zeigten, daß bei intrazellulären Core-Partikeln die endogene Phosphorylierung die endogene Polymerase-Reaktion beeinflusst. Dies wird zusätzlich zu der gezeigten Korrelation zwischen endogener Proteinkinase C-Aktivität und endogener Polymerase-Aktivität als Hinweis darauf gewertet, daß die zuvor dargestellten Hypothesen 1 („Phosphorylierung vor RNA-Verpackung“) und 5 („Phosphorylierung nach Zweitstrangsynthese“) nicht zutreffen. Da bei extrazellulären Core-Partikeln, die in der Hauptsache zu Zweitstrangsynthese, jedoch nicht mehr zu Erststrangsynthese fähig sein sollten, kein Einfluß auf die endogene Polymerase-Reaktion nachweisbar ist, ist dies ein Hinweis darauf, daß auch Hypothese 4 („Phosphorylierung im Zuge der Zweitstrangsynthese“) möglicherweise nicht zutrifft. Um zwischen den „verbleibenden“ Hypothesen 2, 3 und 4 zu differenzieren, mußte der Verlauf der Erst- und Zweitstrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten untersucht werden.

#### **5.4 Verteilung der verschiedenen endogenen Polymerase-Aktivitäten über den Dichtegradienten**

Beim Sendai-Virus ist es gelungen, frühe und späte Formen in Nycodenz-Dichtegradienten voneinander zu trennen (Nycomed (1996)). Daher lag es nahe, dieses Medium auch auf die Auftrennung von reifen und unreifen HBV-Core-Partikeln hin zu testen. Durch die Verwendung von in der Literatur beschriebenen Inhibitoren der verschiedenen viralen Polymeraseaktivitäten können die Erst- und Zweitstrangsyntheseaktivität experimentell differenziert werden. Da die vorherige endogene Phosphorylierung von Bedeutung für das Maß der endogenen Polymerase-Aktivität ist, wurden intrazelluläre Core-Partikel zunächst durch die endogene Proteinkinase C-Reaktion mit nichtradioaktivem ATP phosphoryliert, anschließend in Anwesenheit dieser Inhibitoren durch die endogene Polymerase-Reaktion radioaktiv markiert und über eine Dichtegradientensedimentation aufgetrennt. Man erhält so den Verlauf der Polymerase-Aktivität über den Dichtegradienten. Durch die Verwendung von Actinomycin D als spezifischen Inhibitor der HBV-DNA-Zweitstrangsynthese (Reich and Goldberg (1964), Kaplan, et al. (1973), Summers and Mason (1982), Offensperger, et al. (1988)) erhält man eine Markierung des HBV-DNA-Erststrangs, der vom verpackten viralen RNA-Prägenom aus transkribiert wird (Summers

and Mason (1982)). Diese HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität zeigte ihr Maximum bei einer Dichte von 1,262 g/ml, ungefähr der Dichte, bei der auch die endogene Polymerase-Aktivität (ohne vorherige Phosphorylierung) und die endogene Proteinkinase C-Aktivität maximal sind.

Es ist wahrscheinlich, daß Core-Partikel des Dichtebereichs von ca. 1,26 g/ml – 1,27 g/ml die am wenigsten reifen von allen gefundenen Core-Partikeln sind, da sie, wie zuvor erläutert, das RNA-Prägenom mit Intermediaten der (-)-Strang-DNA-Synthese enthalten. Mit dieser Unreife auf Genomebene geht einher, daß bei dieser Dichte auch die maximale endogene Proteinkinase C-Aktivität gefunden wird. Auch der Korrelationskoeffizient von 0,9 zwischen dem Verlauf der endogenen Proteinkinase C-Aktivität und dem Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität bestätigt diese Interpretation, zumal der Verlauf der Proteinkinase C-Aktivität kaum mit dem Verlauf der Zweitstrangsyntheseaktivität (Korr. = 0,3) korreliert. „Unreife“ bedeutet bei Core-Partikeln also auch eine vergleichsweise große endogene Phosphorylierbarkeit. Der Korrelationskoeffizient von 0,9 zwischen dem Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität und dem Verlauf der endogenen Polymeraseaktivität (ohne vorherige endogene Phosphorylierung) zeigt weiterhin, daß die gefundene endogene Polymerase-Aktivität (**ohne** vorherige endogene Phosphorylierung) weitgehend Erststrangsyntheseaktivität ist. Daher stellt sich die Frage, wie sich diese hauptsächliche Erststrangsyntheseaktivität verändert, wenn man die endogene Polymerase-Reaktion **mit** vorheriger endogener Phosphorylierung durchführt: Diese Syntheseaktivität wurde in dieser Arbeit als Gesamtsyntheseaktivität bezeichnet und zeigte ihr Maximum bei einer Dichte von 1,262 g/ml, der Dichte also, bei der auch die maximale HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität zu finden ist.

Das Zusammenfallen der Dichte der maximalen Gesamtsyntheseaktivität mit der Dichte der maximalen Erststrangsyntheseaktivität gibt Hinweis darauf, daß intrazelluläre Polymerase-aktive Core-Partikel weitgehend „unreif“ sind und vor allem HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität betreiben. Da einerseits die endogene Polymerase-Reaktion (ohne vorherige endogene Phosphorylierung) vor allem aus Erststrangsyntheseaktivität besteht, andererseits man eine Verstärkung der endogenen Polymerase-Reaktion nach vorheriger endogener Phosphorylierung beobachtet, lag die Vermutung nahe, daß die Verstärkung der endogenen Polymerase-Reaktion nach vorheriger endogener Phosphorylierung durch eine vermehrte Zweitstrangsynthese zustande kommt.

Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurde der Verlauf der HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten bestimmt, indem Core-Partikel zunächst wie oben beschrieben endogen phosphoryliert, anschließend durch die endogene Polymerase-Reaktion in Anwesenheit von PFA, einem spezifischen Inhibitor der HBV-Erststrangsyntheseaktivität, markiert und nachfolgend über eine Dichtegradientensedimentation aufgetrennt wurden. Das Maximum der HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität erscheint bei einer Dichte von 1,251 g/ml; einer Dichte, die deutlich geringer ist als die des Maximums der HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität (1,262 g/ml). Diagramm

16 stellt den Verlauf der HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität und der HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität dar; deutlich erkennt man die Dichteverschiebung der maximalen HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität von 1,262 g/ml auf 1,251 g/ml bei der maximalen HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität.

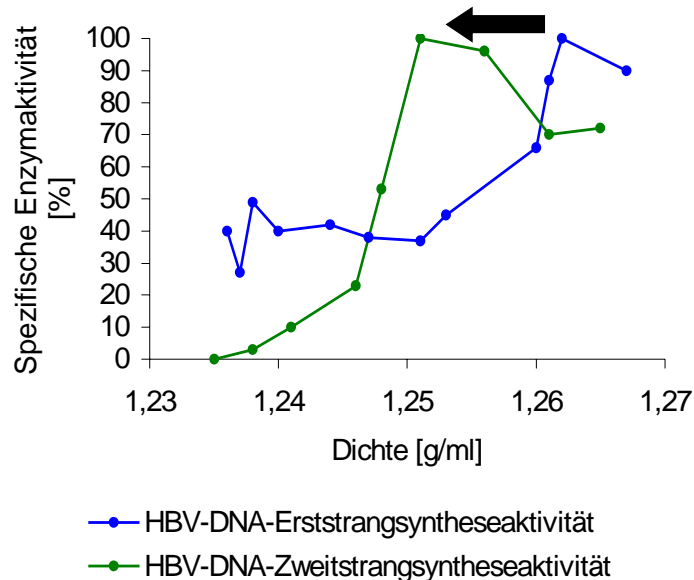


Diagramm 16 Verlauf der HBV-DNA-Erststrang- und -Zweitstrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten

In der Literatur (Rickwood (1989)) bandiert ds DNA in Nycodenz leichter als einzelsträngige RNA und einzelsträngige DNA, so daß gefolgert wird, daß Core-Partikel der Dichte von 1,251 g/ml in der Hauptsache partiell doppelsträngige DNA beinhalten, deren HBV-Zweitstrang markiert ist. Variierenden Konzentrationsangaben zufolge jedoch inhibiert PFA die **gesamte** HBV-DNA-Synthese bis zu ca. 90 % schon bei einer geringeren als der hier verwendeten Konzentration von 1 mM (Nordenfelt, et al. (1979), Nordenfelt, et al. (1980), Hess, et al. (1980), Lin, et al. (1983), Goto, et al. (1984), Hantz, et al. (1984), Fourel, et al. (1987), Offensperger, et al. (1988)). Auch in dieser Arbeit wird in Gegenwart von 1 mM PFA bei intrazellulären Core-Partikeln eine Reduktion der DNA-Polymerase-Aktivität auf 10 % des Ausgangswertes gefunden. Da die so markierten Core-Partikel jedoch nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation bei einer geringeren Dichte als die ohne Inhibitor markierten Core-Partikel und als die durch HBV-Erststrangsynthese markierten Core-Partikel bandieren, scheint die gemessene Restsyntheseaktivität in Gegenwart von PFA hauptsächlich auf HBV-Zweitstrangsynthese zurückzuführen zu sein. Die von anderen Autoren gemessene Inhibition der Gesamtsyntheseaktivität um 90 % durch PFA unterscheidet nicht zwischen HBV-Erststrangsynthese- und HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität, so daß die dort gefundene Restsyntheseaktivität ebenfalls Zweitstrangsyntheseaktivität sein könnte. Möglich scheint dies, da sich die Wirkungen von PFA auf die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität und auf die DNA-abhängige

DNA-Polymerase-Aktivität des HBV voneinander unterscheiden, wie Untersuchungen von Sherker, et al. (1986) nahelegen. PFA hemmt die RNA-abhängige-DNA-Polymerase-Aktivität zum großen Teil, aber nicht vollständig, wie der im Bereich der Erststrangsyntheseaktivität liegende Nebenpeak (bei einer Dichte von 1,265 g/ml) der Zweitstrangsyntheseaktivität vermuten läßt. Die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität des HBV, wird aber durch PFA noch weniger vollständig blockiert als die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, selbst in der verwendeten Konzentration von 1 mM nicht, denn anders ist die Dichteverchiebung bei Untersuchung der Zweitstrangsyntheseaktivität nicht zu erklären. So finden auch Hess, et al. (1980), Hantz, et al. (1984), und Fourel, et al. (1987) bei einer PFA-Konzentrationen von 1 mM eine 90 - 95 %ige, aber keine völlige Inhibition der Polymerase-Aktivität. Weiterhin scheint es unwahrscheinlich, daß die Dichteverchiebung der durch die Polymerase-Reaktion in Anwesenheit von PFA markierten Core-Partikel auf große Mengen von im Partikel gebundenem PFA (z.B. durch DNA-Interkalation) beruht, da das Modell des Inhibitionsmechanismus von einer Wirkungsweise an der Pyrophosphat-Bindestelle der Polymerase ausgeht (Mao and Robishaw (1975), Leinbach, et al. (1976), Öberg (1989)). Eine Bindung vorausgesetzt, könnten dort nur wenige Moleküle PFA binden und demzufolge kaum das Sedimentationsverhalten des vergleichsweise schweren Core-Partikels verändern.

Zusammenfassend ergibt sich Folgendes: Der Verlauf der Proteinkinase C-Aktivität über den Dichtegradienten korreliert mit dem der Erststrangsyntheseaktivität, **nicht** aber mit dem der Zweitstrangsyntheseaktivität. Unter Einbeziehung des Befunds, daß die vorherige endogene Phosphorylierung die endogene Polymerase-Reaktion der in der Hauptsache Zweitstrangsynthese „betreibenden“ extrazellulären Core-Partikel **nicht** beeinflusst, kann auch Hypothese 4 („Phosphorylierung im Zuge der Zweitstrangsynthese“) nicht zutreffen. Betrachtet man die Korrelationskoeffizienten der endogenen Polymerase-Reaktion ohne und mit vorheriger endogener Phosphorylierung, so erkennt man eine Verschiebung der endogenen Polymerase-Reaktion von hauptsächlich Erststrangsyntheseaktivität zu mehr Zweitstrangsyntheseaktivität hin, da der Korrelationskoeffizient der endogenen Polymerase-Reaktion (ohne vorherige endogene Phosphorylierung) zur Zweitstrangsyntheseaktivität von  $\text{Korr.} = 0,3$  auf  $\text{Korr.} = 0,8$  ansteigt, wenn vor der endogenen Polymerase-Reaktion eine endogene Phosphorylierung (DNA-Gesamtsyntheseaktivität) durchgeführt wird. Die vorherige endogene Proteinkinase-Reaktion führt also zu einer verstärkten Zweitstrangsynthese während der endogenen Polymerase-Reaktion intrazellulärer Core-Partikel. Die Proteinkinase C-Aktivität korreliert mit dem Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität, wirkt sich aber bei folgender endogener Polymerase-Reaktion durch eine vermehrte Zweitstrangsynthese aus. Diese experimentellen Daten werden von der „verbleibenden“ Hypothese 2 („Phosphorylierung vor Erststrangsynthese“) nicht, wohl aber von Hypothese 3 („Phosphorylierung im Zuge der Erststrangsynthese“) abgedeckt. Träfe Hypothese 2 zu, so sollte die Erststrangsynthese durch die vorherige endogene Phosphorylierung deutlich beeinflusst werden. Dies ist aber kaum der Fall,

da der Korrelationskoeffizient des Verlaufs der endogenen Polymerase-Aktivität (ohne vorherige endogene Phosphorylierung) zum Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität nur von 0,9 auf 0,8 absinkt, wenn vor der endogenen Polymerase-Reaktion eine endogene Phosphorylierung (Gesamtsyntheseaktivität) durchgeführt wird. Da man sowohl eine starke Korrelation des Verlaufs der Proteinkinase-Aktivität zum Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität, als auch die Nicht-Beeinflussung der Erststrangsyntheseaktivität durch die endogene Phosphorylierung findet, trifft Hypothese 3 zu.

Der Einfluß der endogenen Phosphorylierung auf die Zweitstrangsyntheseaktivität wird dadurch erklärbar, daß die endogene Phosphorylierung der Core-Proteine eine Bindung des neu synthetisierten (-)-DNA-Strangs an deren Carboxytermini verhindert und so die Zweitstrangsynthese in der endogenen Polymerase-Reaktion fördert.

In Diagramm 17 ist die Verteilung der viralen Enzymaktivitäten sowie die Verteilung intrazellulärer Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten vergleichend dargestellt.

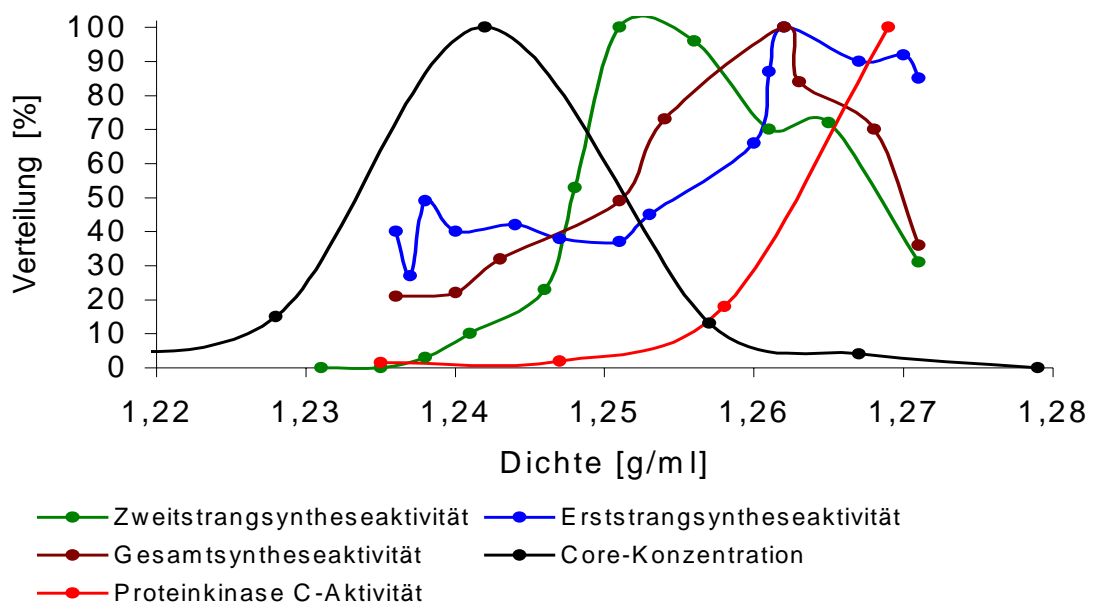


Diagramm 17 Summarische Darstellung der Verteilung der verschiedenen Enzymaktivitäten sowie der intrazellulären Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten

Man erkennt, daß der quantitative Peak intrazellulärer Core-Partikel, wie gezeigt, bei einer Dichte von 1,244 g/ml bandiert, bei der die Werte der untersuchten Polymerase-Aktivitäten zwischen 20 und 42 % ihrer Maxima liegen. Die Proteinkinase C-Aktivität befindet sich bei dieser Dichte an der Nachweisgrenze. Daher ist das Gros der intrazellulären Core-Partikel enzymatisch nur schwach aktiv und als relativ reif zu bezeichnen. Diese Core-Partikel scheinen sich kurz vor ihrer Sekretion zu befinden, und sind, da extrazelluläre Core-Partikel alle reif sind, das Produkt der Erst- und Zweitstrangsynthese.

Mit diesen Befunden läßt sich ein Modell aufstellen, in dem bei intrazellulären Core-Partikeln die endogene Polymerase-Reaktion ohne vorherige endogene Phosphorylierung vor allem HBV-DNA-Erststrangsynthese darstellt; durch die vorherige endogene Phosphorylierung wird diese HBV-DNA-Erststrangsyntheseaktivität durch eine verstärkte HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität überlagert. Die meisten der aufgearbeiteten intrazellulären Core-Partikel sind in ihrer Genomreifung vergleichsweise weit fortgeschritten und zeigen nur noch geringe DNA-Syntheseaktivitäten. Nach Umhüllung der Core-Partikel mit viralen Oberflächenproteinen werden sie von der Zelle sezerniert. Das Gros der von der Zelle sezernierten Virionen hat seine DNA-Synthese vergleichsweise weit durchlaufen und zeigt daher eine im Vergleich zum Gros der intrazellulären Core-Partikel noch geringere DNA-Synthese-Aktivität. Die endogene Phosphorylierung trägt somit maßgeblich zur „Reifung“ unreifer Core-Partikel bei, da sie Voraussetzung für die Reifung auf Genomebene ist, indem sie ein Umschreiben des einzelsträngigen HBV-DNA-Erststrangs in ein partiell doppelsträngiges virales Genom ermöglicht.

Anhand dieser Daten konnte nicht beurteilt werden, wodurch die zu fordernde Regulation der Core-Partikel-Destabilisierung gegeben ist. Die Untersuchungen der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind im Folgenden dargestellt.

### **5.5 Stabilität von Core-Partikeln**

Da die HBV (+)-Strang-DNA-Synthese vom Vorhandensein nicht nur der viralen Polymerase, sondern auch der Core-Untereinheiten abhängt ((Hatton, et al. (1992), Nassal (1992)), würde ein vorzeitiges Auseinanderbrechen der Core-Partikel zum Abbruch des viralen Lebenszyklus führen. Bei hoch replizierenden Viren, bei denen nur ein geringer Teil infektiös ist, würde sicherlich kein Regulationsmechanismus zur Dissoziation notwendig sein. Da für HBV aber gezeigt wurde, daß zwischen 1 und 10 Viren im Schimpansenmodell eine Hepatitis auslösen (Shikata, et al. (1977), Ulrich, et al. (1989)), scheint dieses Virus über eine Strategie zu verfügen, die eine reifungsabhängige Destabilisierung der Core-Partikel bewirkt. Die bisher dargestellten Arbeiten lassen offen, ob es sich hierbei um die Genomreifung selbst, oder aber die Phosphorylierung der Core-Untereinheiten handelt, da beide miteinander korrelieren. Daher wurde die Partikelstabilität in beschriebenem Testsystem untersucht. Die eventuelle Desintegration der Partikel wurde zum einen mit einem Partikel-spezifischen Antikörper untersucht, zum anderen wurde die Zugänglichkeit der radioaktiv markierten viralen DNA mit S7-Nuklease bestimmt. Da die Degradation der viralen DNA das empfindlichere Kriterium zur Beurteilung der Zersetzung der Core-Partikel ist, wurde sie statt der im Immunblot sichtbaren Zersetzung, die letztendlich lediglich das Verschwinden des Partikel-spezifischen Epitops anzeigt, zugrunde gelegt.



Setzt man durch die endogene Polymerase-Reaktion markierte Core-Partikel in einen solchen Stabilitätsassay ein, so fand im Vergleich zur Negativkontrolle keine Zersetzung in Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL) statt. Die endogene Polymerase-Reaktion führte demzufolge zu keiner sichtbaren Zersetzung der Core-Partikel nach Inkubation in RRL im Vergleich zur Inkubation in Puffer. Daher wurde der Einfluß der endogenen Phosphorylierung auf die Partikelstabilität untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Diagramm 18 dargestellt.

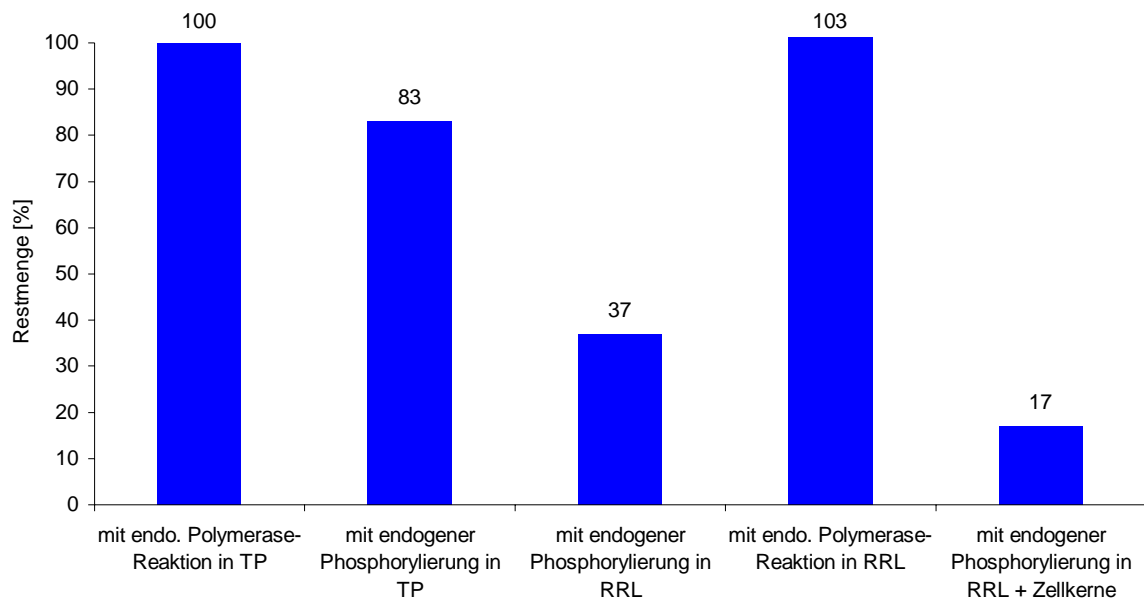


Diagramm 18 Stabilitätsassays mit intrazellulären Core-Partikeln

Als Negativkontrolle (Transportpuffer, TP, 100 %) wurden durch die endogene Polymerase-Reaktion markierte Core-Partikel verwendet. Die Werte der Ansätze in RRL wurden - anders als in der Darstellung im Ergebnisteil - auf diesen Ansatz bezogen. Phosphoryliert man solche Core-Partikel endogen und inkubiert sie während des Stabilitätsassays in Transportpuffer mit ATP, so erkennt man eine geringe Reduktion der Core-Menge um 17 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Abnahme scheint durch eine destabilisierende Wirkung der endogenen Phosphorylierung bedingt zu sein, da sich die beiden Ansätze nur durch die endogene Phosphorylierung und durch das Vorhandensein von ATP während der Inkubation in TP unterscheiden. Aufgrund der experimentellen Daten kann ein Synergismus zwischen der endogenen Polymerase-Reaktion und der endogenen Phosphorylierung bei der Destabilisierung der Core-Partikel nicht völlig ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich, da sich eine deutliche Destabilisierung auch bei Verwendung ausschließlich endogen phosphorylierter Core-Partikel zeigt. Eine analoge Destabilisierung des Capsids nach Phosphorylierung der Capsid-Proteine konnte auch für das Poliovirus gezeigt werden. Scharli and Koch (1984) und Lackmann, et al. (1987) finden, daß die Poliovirus-assoziierte Proteinkinase die  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf die

Capsidproteine transferiert und so eine Destabilisierung der Virionen auslöst. Ratka, et al. (1989) zeigen einen zusätzlichen Einfluß von  $Zn^{2+}$ -Ionen auf die Capsidstabilität, die sich in einer Änderung der Capsidstruktur niederschlägt. Die veränderte Capsidstruktur ist Voraussetzung für eine verstärkte Phosphorylierungsaktivität der Poliovirus-assoziierten Proteinkinase, die durch die Phosphorylierung zu einer zusätzlichen Destabilisierung des Capsids beiträgt. Die Destabilisierung des Capsids führt schließlich zu einer Dissoziation von Poliovirus-assoziiierter Proteinkinase und Capsid.

Beim HBV scheint die Initiation der Phosphorylierung eine andere zu sein. Hier ist der luminal gelegene C-Terminus der Core-Proteine von großer Bedeutung, denn zum einen findet hier die endogene Phosphorylierung der Core-Proteine statt (Machida, et al. (1991)), zum anderen sind C-terminal gelegene Arginin-reiche Cluster an der Verpackung des hepadnaviralen RNA-Prägenoms und der DNA-Reifung beteiligt (Schlicht, et al. (1989), Gallina, et al. (1989), Yu and Summers (1991), Hatton, et al. (1992), Nassal (1992), Zhou and Standring (1992), Beames and Lanford (1993)), so daß eine Konkurrenz von Proteinkinase und Nukleinsäure vorliegt (Kann and Gerlich (1994)). Die berechnete Korrelation zwischen Erststrangsynthese- und Proteinkinase C-Aktivität bestätigt diese Beobachtung und zeigt, daß, anders als beim Poliovirus, hier die reverse Transkription den Initiator der Phosphorylierung darstellt.

Der Mechanismus der Partikeldestabilisierung erschließt sich im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Obwohl nicht direkt an der Interaktion zwischen einander benachbarten Core-Proteinen beteiligt (Birnbaum and Nassal (1990), König, et al. (1998)), scheint der C-Terminus dennoch einen Einfluß auf die Partikelstabilität zu haben. So konnten Köck, et al. (1998) zeigen, daß carboxyterminal trunke Core-Proteine beim Enten Hepatitis B Virus (DHBV) zur vorzeitigen Desintegration des Capsids führen. Bei Pflanzenviren wie zum Beispiel dem Tabacco Mosaic Virus (TMV) spielt die elektrostatische Abstoßung zwischen Carboxylatgruppen der Nucleocapsid-Untereinheiten eine wesentliche Rolle beim Prozeß der Dissoziation (Lu, et al. (1998)). Auch konformationelle Umlagerungen könnten beim Dissoziationsprozeß von Bedeutung sein, so wie sie es beispielsweise auch für den Assoziationsprozeß von HBV-Capsiden in geringem Maße sind (Wingfield, et al. (1995)).

Wie bei anderen Viren auch ist die Dissoziation des Capsids an zelluläre Kompartimente gebunden, die gleichzeitig das Entpacken des Virusgenoms im „richtigen“ Kompartiment der Zelle garantieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß cytosolische Faktoren im RRL das Entpacken des Virusgenoms auf 37 % der Vergleichsmenge in der Negativkontrolle, in der durch endogene Polymerase-Reaktion markierte Core-Partikel in Transportpuffer inkubiert wurden, verursachte. Diese Zersetzung in RRL trat nur bei Core-Partikeln auf, die durch die endogene Proteinkinase C-Reaktion phosphoryliert wurden, nicht aber bei Partikeln, die durch die endogene Polymerase-Reaktion markiert wurden. In der Literatur sind verschiedene zelluläre Komponenten beschrieben, die an der Capsid-Dissoziation beteiligt sind. So löst zum Beispiel beim Semliki Forest Virus (SFV) ein sau-

rer pH-Wert eine partielle Proteolyse aus, die im Dissoziationsprozeß wichtig sein kann (Schlegel, et al. (1993)). Die Membran des Influenza-Virus fusioniert nach pH-abhängiger Aktivierung im Endosom mit der endosomalen Membran; der niedrige pH-Wert scheint aber ebenso die Dissoziation des Capsids auszulösen (Bui, et al. (1996)). Auch kann eine Beteiligung von sich ebenfalls im endosomalen Kompartiment befindlichen Proteasen, wie für das Reovirus gezeigt (Baer and Dermody (1997)), nicht ausgeschlossen werden. Eine stärkere Homologie zu HBV zeigt die Dissoziation der Adenoviren, bei denen cytosolische Elemente, aber auch der Zellkern an der Freisetzung des Virusgenoms beteiligt sind Greber, et al. (1997). Da auch HBV-Core-Partikel elektronenmikroskopisch am Nuclear Pore Complex (NPC) nachgewiesen wurden (unveröffentlichte Beobachtung von Dr. Michael Kann, Institut für medizinische Virologie der Liebig-Universität in Gießen), schien es naheliegend, ein mögliche Beteiligung des Zellkerns bei der HBV-Capsid-Dissoziation zu untersuchen. Dazu wurden endogen phosphorylierte Core-Partikel in einen Stabilitätsassay eingesetzt, wobei jedoch zusätzlich Huh7-Zellkerne hinzugegeben wurden, die eine deutliche Zersetzung der endogen phosphorylierten Core-Partikel auf 17 % der Vergleichsmenge in der Negativkontrolle bewirkten. Diese Zerlegung ist also stärker als nach Inkubation in RRL ohne Zellkerne. Diese Ergebnisse werden bestätigt durch Experimente, die Core-Partikel in der konfokalen Lasermikroskopie sowohl an den Kernporen, als auch im Zellkern von Huh7-Zellen zeigen (unveröffentlichte Beobachtung von Frau Dipl. Biol. Angelika Vlachou, Institut für medizinische Virologie der Liebig-Universität in Gießen). Da Core-Partikel mit einem Durchmesser von 36 nm (Crowther, et al. (1994)) zu groß für eine Passage durch die Kernporen sind, muß eine Desintegration der Partikel in Untereinheiten auf der cytosolischen Seite der Kernpore und ein spontanes Assoziieren (Seifer, et al. (1993)) dieser Untereinheiten zu Partikeln nach Transport in den Zellkern gefordert werden. Der kovalent gebundene Komplex aus viraler Polymerase und HBV-DNA könnte dann, wie von Kann, et al. (1997) gezeigt, mit oder ohne eventuell anhaftende Core-Proteine, in den Zellkern transportiert werden, um dort den nucleären Pool viraler DNA zu regenerieren.

Zusammenfassend lassen sich die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Charakterisierung und zur Dissoziation der HBV-Core-Partikel in folgendem Diagramm zusammenfügen.

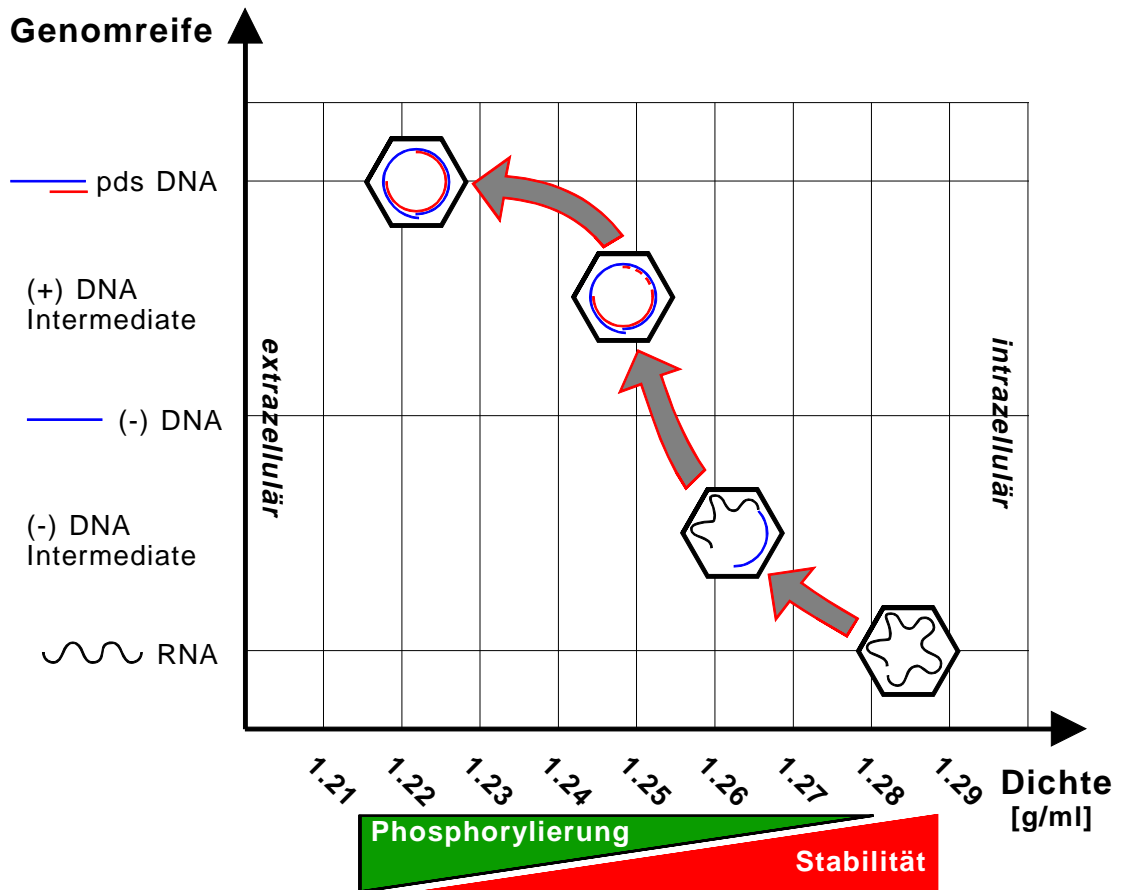


Diagramm 19

Summarische Darstellung von Genomreifung, Core-Partikel-Stabilität, Phosphorylierung und Verteilung über den Dichtegradienten

Diagramm 19 zeigt die Abhängigkeit der Schwebedichte der Core-Partikel von ihrem Reifegrad. Man findet RNA-haltige Core-Partikel (unveröffentlichte Beobachtung von Dr. M. Kann, Institut für medizinische Virologie der Liebig-Universität in Gießen) bei einer Dichte von 1,285 g/ml. Durch die Erststrangsynthese, die bei einer Dichte von 1,262 g/ml maximal ist, nimmt der Gehalt an (-)-Strang-DNA zu und die Schwebedichte der Partikel ab. Diese Abnahme der Schwebedichte setzt sich während der Zweitstrangsynthese, die bei einer Dichte von 1,251 g/ml ihr Maximum erreicht, weiter fort. Reife Core-Partikel, die das partiell doppelsträngige DNA-Genom beinhalten, findet man schließlich bei einer Dichte von 1,222 g/ml sowohl intrazellulär als auch extrazellulär. Der quantitative Peak intrazellulärer Core-Partikel liegt bei einer Dichte von 1,244 g/ml und besteht daher aus relativ reifen Core-Partikeln, die eine vergleichsweise geringe Polymerase-Aktivität zeigen. Einhergehend mit der abnehmenden Schwebedichte der Core-Partikel findet man eine zunehmende Phosphorylierung, wobei hier die Gesamtphosphorylierung dargestellt ist, und nicht, wie bisher, die Phosphorylierbarkeit. Diese ist naheliegenderweise bei den Core-Partikeln am größten, die am wenigsten phosphoryliert sind und sich im Dichtegradienten bei einer Schwebedichte von 1,269 g/ml befinden. Umgekehrt proportional zur Gesamtphosphorylierung scheint sich die Stabilität der Core-Partikel zu verhalten: Je größer die Gesamtphosphorylierung, desto geringer die Stabilität. Diese Aussage ist je-

doch teilweise noch spekulativ, da eine unterschiedliche Zersetzbarkeit in Abhängigkeit von der Gesamtphosphorylierung noch nicht gezeigt wurde.

## **5.6 Modell des HBV-Replikationszyklus**

Die zuvor dargestellten Daten lassen sich in folgendes Modell zum Replikationszyklus des Hepatitis B Virus integrieren.

Bei der Infektion einer Wirtszelle muß das virale Nukleocapsid nach dem Entfernen der Hüllproteine zerlegt und die virale DNA in den Zellkern transportiert, durch zelluläre Enzyme komplettiert, transkribiert und translatiert werden. Die neu synthetisierte virale Polymerase bindet an das Verpackungssignal  $\epsilon$  der prägenomischen RNA und wird in einem spontanen Assoziationsprozeß von Core-Proteinen umgeben, die auf der luminalen Seite über Arginin-reiche Cluster im C-Terminus ebenfalls die prägenomische RNA binden und damit die Phosphorylierungsstellen zwischen den Clustern blockieren. Im Zuge der reversen Transkription werden die Phosphorylierungsstellen frei und können genutzt werden, wodurch die Korrelation von Phosphorylierung und reverser Transkription gegeben ist. Die Phosphorylierung blockiert eine Bindung der neu synthetisierten (-)-Strang-DNA an die Arginin-Cluster, wodurch die (+)-Strang-Synthese – da hier kein Ablösen der DNA vom C-Terminus der Core-Untereinheiten mehr nötig ist – gefördert wird. Diese fortlaufende Phosphorylierung wird bei Umhüllung der Core-Partikel mit den Hüllproteinen und folgender Sekretion durch ATP-Mangel eingestellt, kann jedoch nach Infektion einer neuen Zelle mit Freisetzung des Core-Partikels ins Cytoplasma wieder aufgenommen werden. Die fortschreitende Phosphorylierung resultiert in einer verstärkten Inhibition der Interaktion zwischen C-Terminus und verpacktem Genom, welches sich einer Destabilisierung der neu gebildeten Core-Partikel niederschlägt. Es ist unklar, ob diese verminderte Interaktion der einzige Einfluß auf die Partikelstabilität ist, oder ob weitere Faktoren, wie beispielsweise konformationelle Umlagerungen der Core-Proteine oder eine durch die Phosphorylierung vergrößerte elektrostatische Abstoßung der Core-Proteine, eine Rolle spielen. In jedem Falle werden die Core-Partikel unter Beteiligung von cytosolischen Faktoren und des Zellkerns degradiert, so daß das virale Genom im Komplex mit der kovalent gebundenen viralen Polymerase in den Nucleus transportiert wird, dort zur Aufrechterhaltung des nucleären Pools an viraler DNA beiträgt und der Replikationszyklus von neuem beginnen kann.

---

**6 Zusammenfassung**

In der Arbeit wurde die endogene Polymerase- und Proteinkinase C-Aktivität von intrazellulären HBV-Core-Partikeln untersucht. In der Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation konnten Core-Partikel mit unterschiedlich starken Enzymaktivitäten und unterschiedlichem Nukleinsäuregehalt aufgetrennt werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung im Zuge der reversen Transkription des RNA-Prägenoms im Lumen der Core-Partikel stattfindet und im weiteren Verlauf der Genomreifung die Zweitstrangsynthese fördert. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung eine Destabilisierung der Core-Partikel induziert. Unter Mitwirkung zellulärer Komponenten im Cytosol und der Kernmembran führte diese zu einer Dissoziation der Partikel, was in einer Freisetzung des viralen Polymerase-DNA-Komplexes resultiert. Damit scheint die Phosphorylierung ein zentraler Regulationsmechanismus im Lebenszyklus des HBV zu sein, der bewirkt, daß nur „reife“ Core-Partikel zerfallen und damit garantiert, daß der Lebenszyklus nicht durch die vorzeitige Partikeldissoziation unterbrochen wird.

## 7 Anhang

### 7.1 Experimentelle Daten

#### 7.1.1 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von Core-Partikeln

Core-Standard [pg]	Gemessene Extinktion
50000	0,843
25000	0,687
12500	0,463
6000	0,292
3000	0,151
1500	0,084
800	0,050
400	0,030

Tabelle 5 ELISA-Meßwerte der Core-Partikel-Standardreihe

Fraktion Nr.	Refrakt. Meßwert	Dichte [g/ml]	Extinktion ELISA 5µl Fraktion	Core- Konzentration [pg/µl]	Core- Konzentration [%]
10	1,3749	1,420	0,010	0	0
11	1,3725	1,390	0,040	22	0
12	1,3709	1,375	0,238	184	0
13	1,3650	1,365	0,483	520	2
14	1,3687	1,350	0,913	2.600	100
15	1,3673	1,340	0,621	840	32
16	1,3661	1,320	0,227	176	7
17	1,3651	1,315	0,127	100	4
18	1,3645	1,310	0,076	60	2
19	1,3644	1,305	0,077	56	2
20	1,3628	1,290	0,106	80	3
			Summe:	4.638	

Tabelle 6 Auswertung der Fraktionen des Dichtegradienten

Ausgangsmenge vor Zentrifugation: 10,5 µg  
 Volumen der Fraktionen: 150 µl  
 Wiedergefunden nach Zentrifugation: 4638 pg x 150 µl = 696 ng (= ca. 7 % der Ausgangsmenge)

### 7.1.2 Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation intrazellulärer Core-Partikel

Core-Standard [pg]	Gemessene Extinktion
25.000	1,551
12.500	1,283
6.000	1,172
3.000	0,780
1.500	0,477
800	0,275
400	0,170
200	0,058
100	0,053

Tabelle 7 ELISA-Meßwerte der Core-Partikel-Standardreihe

Fraktion Nr.	Refrakt. Meßwert	Dichte [g/ml]	Extinktion im ELISA	Core-Konz. [pg/10µl]	Core-Konz. [%]
1	1,4331	1,328	0,022	0	0
2	1,4276	1,310	0,025	0	0
3	1,4230	1,294	0,019	0	0
4	1,4185	1,279	0,031	0	0
5	1,4148	1,267	0,267	700	4
6	1,4117	1,257	0,774	2.300	13
7	1,4071	1,242	1,490	18.000	100
8	1,4028	1,228	0,849	2.700	15
9	1,3981	1,213	0,343	950	5
10	1,3955	1,204	0,225	550	3
11	1,3915	1,191	0,142	320	2
12	1,3879	1,179	0,084	150	1
13	1,3840	1,166	0,059	0	0
14	1,3811	1,157	0,053	0	0
15	1,3781	1,147	0,033	0	0
16	1,3740	1,133	0,048	0	0
17	1,3683	1,115	0,044	0	0
18	1,3610	1,091	0,040	0	0
19	1,3522	1,062	0,027	0	0
20	1,3463	1,042	0,026	0	0
21	1,3626	1,096	0,049	0	0
22	1,3659	1,107	0,052	0	0
			Summe	25.670	

Tabelle 8 Auswertung der Fraktionen des Dichtegradienten

Ausgangsmenge vor Zentrifugation: 11 µg  
 Volumen der positiven Fraktionen: 4000 µl  
 Wiedergefunden nach Zentrifugation:  $25.670 \text{ pg} / 10 \text{ µl} \times 400 = 10,3 \text{ µg}$   
 (= ca. 93 % der Ausgangsmenge)



### 7.1.3 Gleichgewichtsdichte von intrazellulären Core-Partikeln in Nycodenz

Core-Standard [pg]	Gemessene Extinktion
12500	2,699
6000	2,292
3000	1,591
1500	0,996
800	0,550
400	0,331
200	0,187
100	0,113
50	0,072
25	0,063

Tabelle 9 ELISA-Meßwerte der Core-Partikel-Standardreihe

Fraktion Nr.	Refrakt. Meßwert	Dichte [g/ml]	Extinktion im ELISA	Core-Konz. [pg/10µl]	Core-Konz. [%]
1	1,4328	1,327	0,055	0	0
2	1,4309	1,320	0,047	0	0
3	1,4272	1,308	0,041	0	0
4	1,4225	1,293	0,041	0	0
5	1,4192	1,282	0,016	0	0
6	1,4162	1,272	0,758	1.000	18
7	1,4117	1,257	1,542	2.900	53
8	1,4078	1,244	2,139	5.500	100
9	1,4035	1,230	0,913	1.300	24
10	1,4005	1,220	0,411	650	12
11	1,3971	1,209	0,220	250	5
12	1,3936	1,198	0,231	250	5
13	1,3900	1,186	0,124	120	2
14	1,3872	1,177	0,106	100	2
15	1,3853	1,170	0,092	100	2
16	1,3825	1,161	0,080	170	3
17	1,3778	1,146	0,068	80	1
18	1,3667	1,109	0,048	0	0
19	1,3571	1,078	0,043	0	0
20	1,3602	1,088	0,069	80	1
21	1,3812	1,157	0,122	120	2
22	1,3758	1,139	0,083	80	1
23	1,3989	1,215	0,109	100	2
24	1,3940	1,199	0,073	50	1
			Summe	12.850	

Tabelle 10 Auswertung der Fraktionen des Dichtegradienten

### 7.1.4 Verteilung extrazellulärer Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten

Core-Standard [pg]	Gemessene Extinktion
40.000	2,279
20.000	1,967
10.000	1,808
5.000	1,387
2.500	0,917
1.250	0,493
625	0,245
313	0,140
156	0,083
78	0,044
39	0,025
20	0,018

Tabelle 11

ELISA-Meßwerte der Core-Partikel-Standardreihe

Fraktion Nr.	Refrakt. Meßwert	Dichte [g/ml]	Extinktion im ELISA	Core-Konz. [pg/10µl]	Core-Konz. [%]
1	1,4303	1,318	0,009	0	0
2	1,4250	1,304	0,010	0	0
3	1,4248	1,300	0,008	0	0
4	1,4224	1,292	0,011	0	0
5	1,4207	1,287	0,012	0	0
6	1,4198	1,284	0,012	0	0
7	1,4192	1,282	0,016	0	0
8	1,4184	1,279	0,017	0	0
9	1,4166	1,273	0,037	60	0
10	1,4151	1,268	0,056	90	0
11	1,4139	1,264	0,057	90	0
12	1,4130	1,262	0,097	180	0
13	1,4127	1,261	0,195	465	1
14	1,4115	1,257	0,455	1.250	2
15	1,4110	1,255	0,858	2.000	3
16	1,4098	1,251	1,118	13.600	17
17	1,4090	1,248	1,921	17.000	21
18	1,4086	1,247	2,024	20.800	26
19	1,4070	1,242	1,735	11.900	15
20	1,4061	1,239	1,765	12.600	16
21	1,4054	1,237	1,841	14.400	18
22	1,4045	1,234	1,897	16.300	20
23	1,4032	1,229	1,791	13.200	17
24	1,4025	1,227	2,263	39.000	49
25	1,4017	1,224	2,561	78.000*	98
26	1,4010	1,222	2,592	80.000*	100
27	1,4006	1,221	2,151	32.300	40
28	1,3997	1,218	1,782	12.900	16
29	1,3988	1,215	1,833	14.300	18
30	1,3973	1,210	2,001	20.700	26
31	1,3943	1,200	1,865	15.200	19
32	1,3878	1,179	1,471	7.000	9
33	1,3766	1,142	1,1320	3.200	4
34	1,3702	1,121	1,219	4.000	5
35	1,3670	1,110	1,323	5.200	7

Tabelle 12

Auswertung der Fraktionen des Dichtegradienten

### 7.1.5 Sedimentationsverhalten endogen phosphorylierter Core-Partikel

Core-Standard [pg]	Gemessene Extinktion
50.000	0,648
25.000	0,645
12.500	0,514
6.000	0,413
3.000	0,295
1.500	0,153
800	0,101
400	0,058
200	0,041
100	0,027
50	0,025
25	0,021
13	0,018

Tabelle 13 ELISA-Meßwerte der Core-Partikel-Standardreihe

Fraktion Nr.	Refrakt. Meßwert	Dichte [g/ml]	Extinktion im ELISA	Core-Konz. [pg/10µl]	Core-Konz. [%]
1	1,4332	1,328	0,003	0	0
2	1,4310	1,321	0,009	0	0
3	1,4280	1,311	0,008	0	0
4	1,4238	1,297	0,011	0	0
5	1,4202	1,285	0,016	0	0
6	1,4159	1,271	0,116	1000	23
7	1,4122	1,259	0,217	2200	50
8	1,4082	1,246	0,339	4400	100
9	1,4041	1,232	0,131	1200	27
10	1,4002	1,220	0,064	400	9
11	1,3972	1,210	0,039	200	5
12	1,3928	1,195	0,031	150	3
13	1,3910	1,189	0,025	120	3
14	1,3891	1,183	0,018	100	2
15	1,3870	1,176	0,013	0	0
16	1,3810	1,156	0,007	0	0
17	1,3736	1,132	0,012	0	0
18	1,3635	1,099	0,009	0	0
19	1,3511	1,058	0,009	0	0

Tabelle 14 Auswertung der Fraktionen des Dichtegradienten

### 7.1.6 Spezifische Proteinkinase C-Aktivität

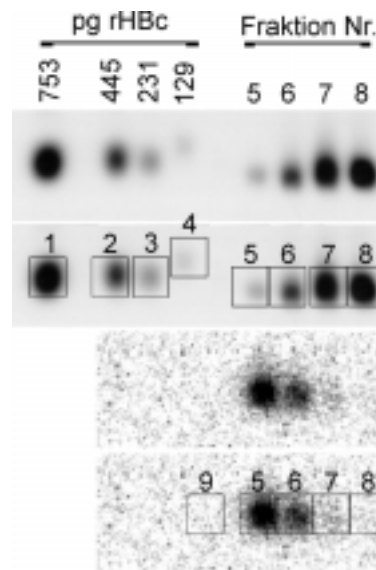


Abbildung 20 Immunblot und Bioimagerscan von durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markierten intrazellulären Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation

Signal Nr.	Fraktion Nr.	Dichte [g/ml]	PSL /19,2mm <sup>2</sup>	(PSL-bkg) /mm <sup>2</sup>	Core pg	Spezifische Radioaktivität PSL-bkg mm <sup>2</sup> x pg	Spezif. Radioakt. %
1	rHbc-Standard	-----	-----	-----	753	-----	-----
2	rHbc-Standard	-----	-----	-----	445	-----	-----
3	rHbc-Standard	-----	-----	-----	231	-----	-----
4	rHbc-Standard	-----	-----	-----	129	-----	-----
5	5	1,269	110,03	5,37	163	0,0329	100
6	6	1,258	52,24	2,36	399	0,0059	18
7	7	1,247	17,30	0,54	669	0,0001	0
8	8	1,235	11,01	0,21	711	0,0000	0
9	Background	-----	6,97	0,00	-----	-----	-----

Tabelle 15 Verlauf der spezifischen endogenen Proteinkinase C-Aktivität über den Dichtegradienten

### 7.1.7 Spezifische Endogene Polymerase-Aktivität

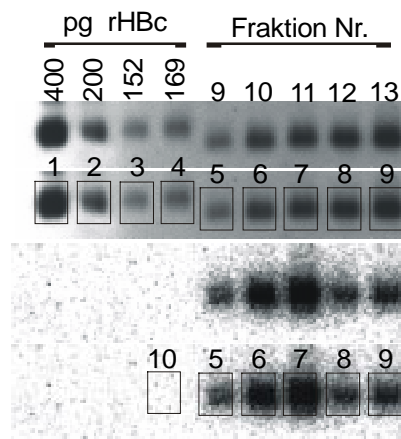


Abbildung 21 Immunblot und Bioimagerscan von durch endogene Polymerasereaktion markierten intrazellulären Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation

Signal Nr.	Fraktion Nr.	Dichte [g/ml]	PSL /25,76mm <sup>2</sup>	(PSL-bkg) /mm <sup>2</sup>	Core pg	Spezifische Radioaktivität PSL-bkg mm <sup>2</sup> x pg	Spezif. Radioakt. %
1	rHBc-Standard	-----	-----	-----	400	-----	-----
2	rHBc-Standard	-----	-----	-----	200	-----	-----
3	rHBc-Standard	-----	-----	-----	152	-----	-----
4	rHBc-Standard	-----	-----	-----	169	-----	-----
5	9	1,297	68,99	2,44	169	0,0144	28
6	10	1,278	212,18	8,00	167	0,0480	92
7	11	1,268	320,26	12,20	234	0,0521	100
8	12	1,251	88,02	3,18	255	0,0125	24
9	13	1,232	106,36	3,89	257	0,0151	29
10	Background	-----	6,12	-----	-----	-----	-----

Tabelle 16 Verlauf der spezifischen endogenen Polymerase-Aktivität über den Dichtegradienten

### 7.1.8 Verteilung der HBV-Erststrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten

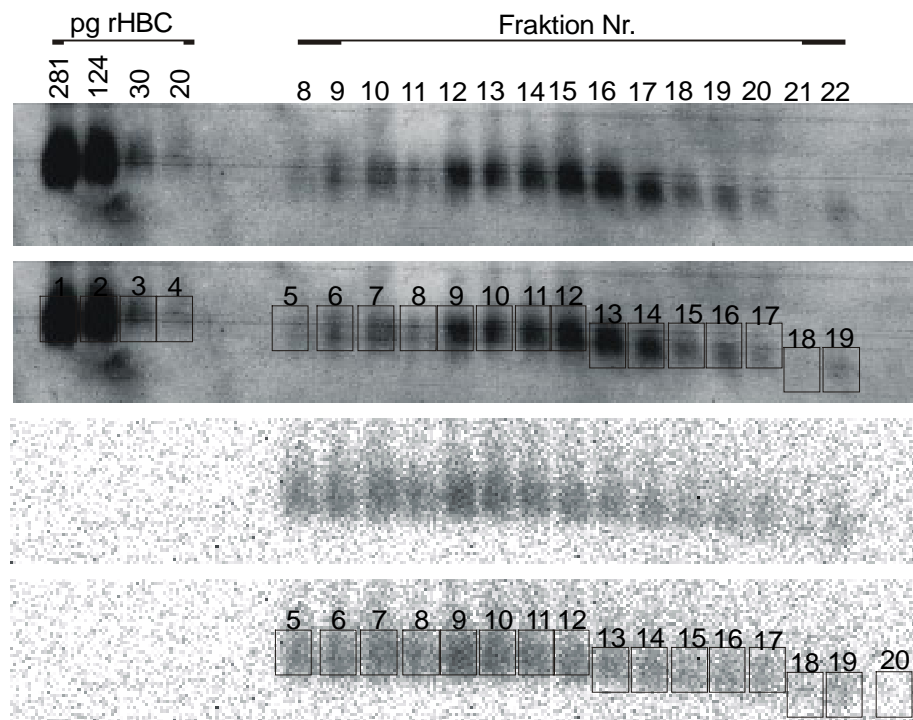


Abbildung 22 Immunblot und Bioimagerscan von durch HBV-Erststrangsynthese markierten intrazellulären Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation

Signal Nr.	Fraktion Nr.	Dichte g/ml	PSL /25,6mm <sup>2</sup>	(PSL-bkg) /mm <sup>2</sup>	Core pg	Spezifische Radioaktivität PSL-bkg mm <sup>2</sup> x pg	Spezif. Radioakt. %
1	rHbc-Standard	-----	-----	-----	281	-----	-----
2	rHbc-Standard	-----	-----	-----	124	-----	-----
3	rHbc-Standard	-----	-----	-----	30	-----	-----
4	rHbc-Standard	-----	-----	-----	20	-----	-----
5	8	1,274	74,38	2,23	22	0,1014	89
6	9	1,271	91,90	2,92	30	0,0973	85
7	10	1,270	108,60	3,57	34	0,1050	92
8	11	1,267	83,14	2,57	25	0,1028	90
9	12	1,262	145,67	5,02	44	0,1141	100
10	13	1,261	119,03	3,98	40	0,0995	87
11	14	1,260	100,03	3,23	43	0,0751	66
12	15	1,253	85,97	2,69	52	0,0517	45
13	16	1,251	71,69	2,13	51	0,0418	37
14	17	1,247	65,50	1,89	44	0,0429	38
15	18	1,244	56,79	1,55	32	0,0484	42
16	19	1,240	52,44	1,38	30	0,0460	40
17	20	1,238	50,06	1,28	23	0,0557	49
18	21	1,237	30,78	0,53	17	0,0312	27
19	22	1,236	41,49	0,95	21	0,0452	40
20	Background	-----	17,23	0,00	-----	-----	-----

Tabelle 17 Verlauf der Erststrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten

### 7.1.9 Verteilung der HBV-Zweitstrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten

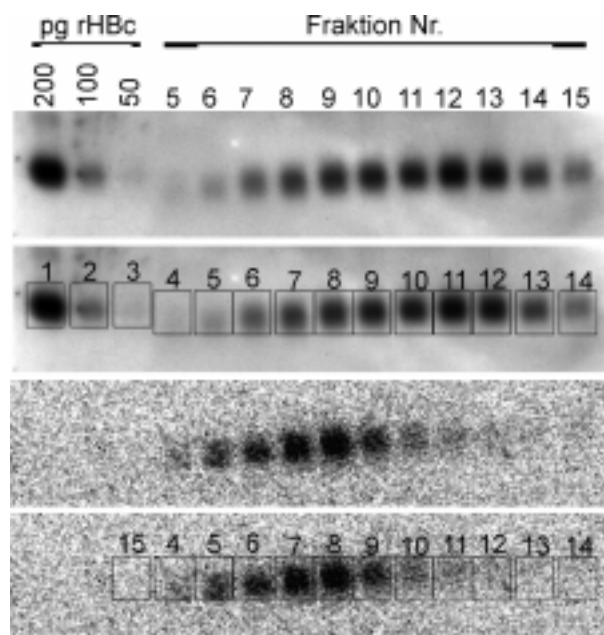


Abbildung 23 Immunblot und Bioimagerscan von durch HBV-Zweitstrangsynthese markierten intrazellulären Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation

Signal Nr.	Fraktion Nr.	Dichte g/ml	PSL /28,2mm <sup>2</sup>	(PSL-bkg) /mm <sup>2</sup>	Core pg	Spezifische Radioaktivität PSL-bkg mm <sup>2</sup> x pg	Spezif. Radioakt. %
1	rHBc-Standard	-----	-----	-----	200	-----	-----
2	rHBc-Standard	-----	-----	-----	100	-----	-----
3	rHBc-Standard	-----	-----	-----	50	-----	-----
4	5	1,271	33,44	0,24	52	0,0046	31
5	6	1,265	46,33	0,70	66	0,0106	72
6	7	1,261	53,99	0,97	93	0,0104	70
7	8	1,256	72,50	1,63	115	0,0142	96
8	9	1,251	81,61	1,95	132	0,0148	100
9	10	1,248	56,89	1,08	138	0,0078	53
10	11	1,246	41,04	0,51	149	0,0034	23
11	12	1,241	34,18	1,21	177	0,0015	10
12	13	1,238	28,30	1,01	167	0,0005	3
13	14	1,235	26,11	0,93	121	0,0000	0
14	15	1,231	26,10	0,94	87	0,0000	0
15	Background			-----	-----	-----	-----

Tabelle 18 Verlauf der Zweitstrangsyntheseaktivität über den Dichtegradienten

### 7.1.10 Verteilung der HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten

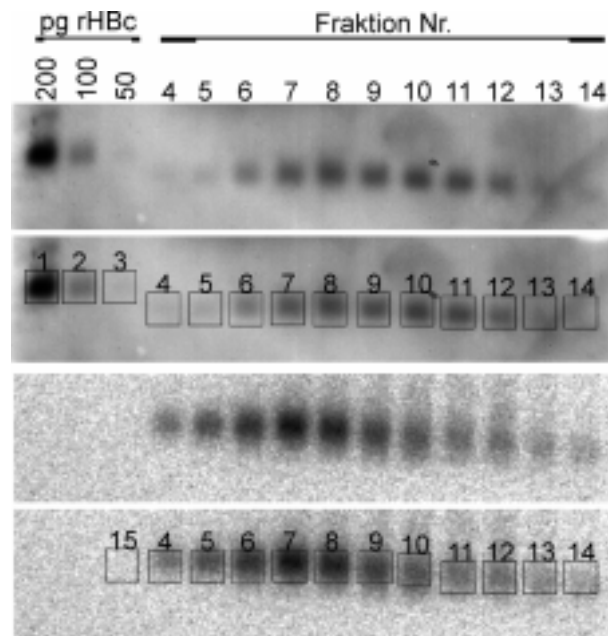


Abbildung 24 Immunblot und Bioimagerscan von durch HBV-DNA-Gesamtsynthese markierten intrazellulären Core-Partikeln nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation

Signal Nr.	Fraktion Nr.	Dichte g/ml	PSL /28,2mm <sup>2</sup>	(PSL-bkg) /mm <sup>2</sup>	Core pg	Spezifische Radioaktivität PSL-bkg mm <sup>2</sup> x pg	Spezif. Radioakt. %
1	rHBc-Standard	-----	-----	-----	200	-----	-----
2	rHBc-Standard	-----	-----	-----	100	-----	-----
3	rHBc-Standard	-----	-----	-----	50	-----	-----
4	4	1,271	79,91	2,84	49	0,0386	36
5	5	1,268	136,07	4,83	52	0,0748	70
6	6	1,263	234,18	8,32	83	0,0888	84
7	7	1,262	376,29	13,36	117	0,1062	100
8	8	1,254	324,06	11,51	137	0,0771	73
9	9	1,251	209,14	7,43	125	0,0518	49
10	10	1,243	162,05	5,75	132	0,0364	32
11	11	1,240	112,03	3,98	131	0,0231	22
12	12	1,236	101,70	3,61	121	0,0221	21
13	13	1,231	66,69	2,37	50	0,0284	27
14	14	1,229	52,68	1,87	25	0,0372	35
15	Background	-----	26,61	-----	-----	-----	-----

Tabelle 19 Verlauf der Gesamtsyntheseaktivität über den Dichtegradienten



### 7.1.11 Korrelation der viralen Enzymaktivitäten

Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten müssen die jeweiligen Enzymaktivitäten der genau gleichen Dichten verwendet werden. Da die Dichten der Fraktionen der verschiedenen Gradienten aber nicht genau übereinstimmen, wurden die fehlenden Enzymaktivitäten Diagramm 20 entnommen und in Tabelle 20 übertragen.

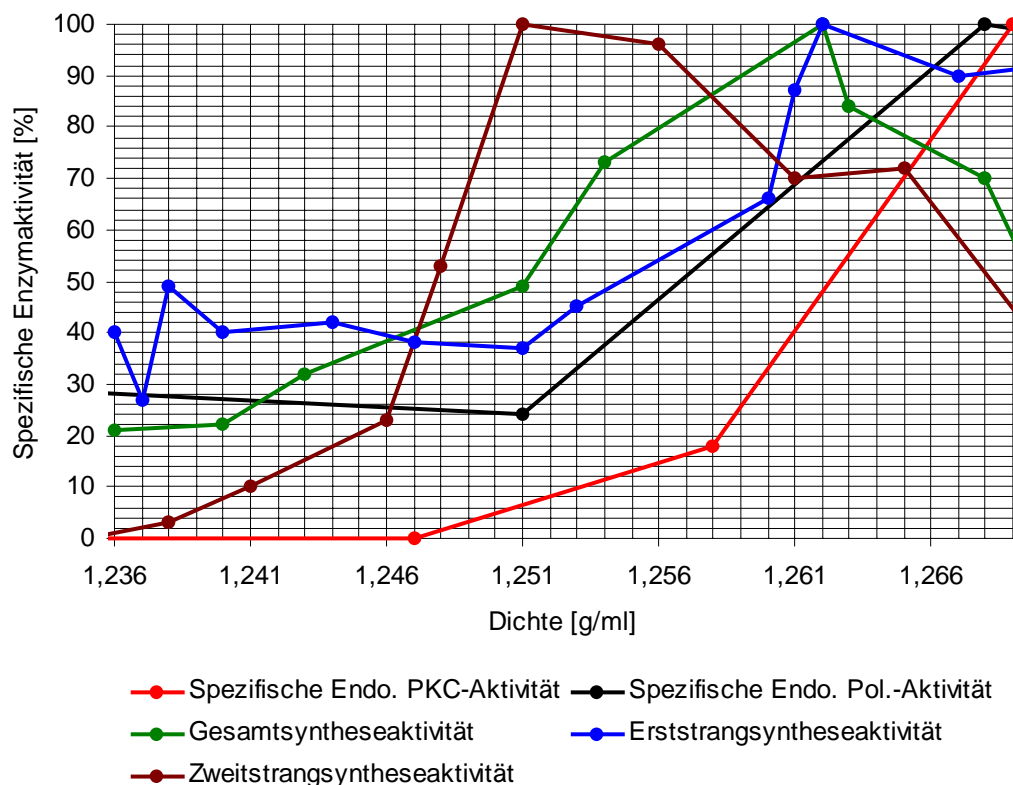


Diagramm 20 Verteilung der viralen Enzymaktivitäten über den Dichtegradienten, Darstellung zum Ablesen der fehlenden Enzymaktivitäten

Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurden die in Tabelle 20 in Fettdruck umrahmten Enzymaktivitäten verwendet, da lediglich für diesen Dichtebereich Enzymaktivitäten entweder experimentell bestimmt (weiß unterlegte Tabellenfelder) oder aus Diagramm 20 abgelesen (grau unterlegte Tabellenfelder) werden konnten.

Tabelle 21 gibt die Matrix der Korrelationskoeffizienten wieder, wobei jede untersuchte Enzymaktivität mit den anderen verbleibenden anderen Enzymaktivitäten korreliert wurde.

Dichte	Endo.-PKC-Aktivität	Endo. Pol.-Aktivität	Gesamt-syntheseaktivität	Erststrang-syntheseaktivität	Zweitstrang-syntheseaktivität
[g/ml]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
1,297	-----	28	-----	-----	-----
1,278	-----	92	-----	-----	-----
1,274	-----	93	-----	89	-----
1,271	-----	94	36	85	31
1,270	-----	96	59	92	38
1,269	100	98	59	90	44
1,268	92	100	70	91	51
1,267	85	96	73	90	58
1,265	70	87	81	94	72
1,263	55	78	84	98	71
1,262	47	74	100	100	71
1,261	40	69	97	87	70
1,260	33	64	94	66	75
1,258	18	55	87	72	86
1,256	15	46	80	62	96
1,254	12	44	73	52	97
1,253	11	37	65	45	98
1,251	8	24	49	37	100
1,248	3	25	43	39	53
1,247	0	25	40	40	38
1,246	0	25	38	41	23
1,244	0	26	34	42	20
1,243	0	26	32	42	18
1,241	0	27	29	41	10
1,240	0	27	22	40	7
1,238	0	28	22	40	3
1,237	0	28	21	27	2
1,236	0	28	21	40	1
1,235	0	29	-----	-----	0
1,232	-----	29	-----	-----	-----

Tabelle 20 Ermittlung des Korrelationskoeffizienten zwischen den viralen Enzymaktivitäten

Korrelation von:	Endo. Pol.-Aktivität	Gesamt-syntheseaktivität	Erststrang-syntheseaktivität	Zweitstrang-syntheseaktivität
mit:				
Endo. PKC-Aktivität	0,99	0,6	0,9	0,3
Endo. Pol.-Aktivität	-----	0,6	0,9	0,3
Gesamtsyntheseaktivität	-----	-----	0,8	0,8
Erststrangsyntheseaktivität	-----	-----	-----	0,4

Tabelle 21 Korrelationskoeffizienten zwischen den verschiedenen viralen Enzymaktivitäten

## **7.2 Verzeichnis der Abbildungen**

Abbildung 1	Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus.....	5
Abbildung 2	Schemazeichnung des HBV-Replikationszyklus.....	7
Abbildung 3	Immunblot von aus HepG2.215-Zellen isolierten Core-Partikeln.....	25
Abbildung 4	wie Abbildung 3, jedoch mit Eingrenzungen zur densitometrischen Auswertung.....	25
Abbildung 5	Darstellung der markierten HBV-DNA nach Agarosegelelektrophorese .....	26
Abbildung 6	Bioimagerscan von durch endo. Polymerase-Reaktion markierten Core-Partikeln.....	26
Abbildung 7	Darstellung der markierten Core-Proteine nach SDS-PAGE.....	27
Abbildung 8	Bioimagerscan der durch endo. PKC-Reaktion markierten Core-Partikel.....	27
Abbildung 9	Elektronenmikroskopische Darstellung von in E.coli exprimierten Core-Partikeln in Nycodenz/TN.....	32
Abbildung 10	Elektronenmikroskopische Darstellung von PTA-gefärbten, in E.coli exprimierten Core-Partikeln.....	32
Abbildung 11	Elektronenmikroskopische Darstellung von in E.coli exprimierten Core-Partikeln ohne Färbung.....	32
Abbildung 12	Durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markierte Core-Partikel nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation .....	35
Abbildung 13	Durch endogene Polymerase-Reaktion markierte Core-Partikel nach Nycodenz- Dichtegradientensedimentation .....	35
Abbildung 14	Durch Erststrangsynthese markierte Core-Partikel nach Nycodenz- Dichtegradientensedimentation .....	36
Abbildung 15	Durch Zweitstrangsynthese markierte Core-Partikel nach Nycodenz- Dichtegradientensedimentation .....	38
Abbildung 16	Durch HBV-DNA-Gesamtsynthese markierte Core-Partikel nach Nycodenz- Dichtegradientensedimentation .....	39
Abbildung 17	Durch endogene Polymerase-Reaktion markierte intrazelluläre Core-Partikel .....	43
Abbildung 18	Durch endogene Polymerase-Reaktion markierte extrazelluläre Core-Partikel .....	43
Abbildung 19	Stabilitätsuntersuchungen mit unterschiedlich markierten Core-Partikeln.....	46
Abbildung 20	Durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markierte intrazelluläre Core-Partikel nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation .....	74
Abbildung 21	Durch endogene Polymerasereaktion markierte intrazelluläre Core-Partikel nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation .....	75
Abbildung 22	Durch HBV-Erststrangsynthese markierte intrazelluläre Core-Partikel nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation.....	76
Abbildung 23	Durch HBV-Zweitstrangsynthese markierte intrazelluläre Core-Partikel nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation.....	77
Abbildung 24	Durch HBV-DNA-Gesamtsynthese markierte intrazelluläre Core-Partikel nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation.....	78

### 7.3 Verzeichnis der Diagramme

Diagramm 1	Verteilung intrazellulärer Core-Partikel im CsCl-Dichtegradienten .....	28
Diagramm 2	Verteilung intrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten nach Nycodenz-Dichtegradientensedimentation .....	29
Diagramm 3	Verteilung intrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten nach Dichtegradientenflotation und –sedimentation .....	30
Diagramm 4	Verteilung extrazellulärer Core-Partikel über den Dichtegradienten .....	31
Diagramm 5	Verteilung von durch endogene Proteinkinase C-Reaktion markierten intrazellulären Core-Partikeln über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	33
Diagramm 6	Verlauf der endogenen Proteinkinase C-Aktivität und der endogenen Polymerase-Aktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	35
Diagramm 7	Verteilung der spezifischen HBV-Erststrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	37
Diagramm 8	Verteilung der spezifischen HBV-DNA-Zweitstrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	38
Diagramm 9	Verteilung der spezifischen HBV-DNA-Gesamtsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	39
Diagramm 10	Zusammenstellung der Verläufe der verschiedenen endogenen Enzym- aktivitäten über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	41
Diagramm 11	Verteilung intra- und extrazellulärer Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	51
Diagramm 12	Verlauf der Proteinkinase C-Aktivität und der Polymerase-Aktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	53
Diagramm 13	Hypothesen zum Zeitpunkt der endogenen Phosphorylierung .....	55
Diagramm 14	Radioaktive Markierung nach verschieden durchgeführten endogenen Polymerase-Reaktionen bei intrazellulären Core-Partikeln .....	56
Diagramm 15	Radioaktive Markierung nach verschieden durchgeführten endogenen Polymerase-Reaktionen bei extrazellulären Core-Partikeln .....	56
Diagramm 16	Verlauf der HBV-DNA-Erststrang- und –Zweitstrangsyntheseaktivität über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	59
Diagramm 17	Summarische Darstellung des Verteilung der verschiedenen Enzymaktivitäten sowie der intrazellulären Core-Partikel über den Nycodenz-Dichtegradienten .....	61
Diagramm 18	Stabilitätsassays mit intrazellulären Core-Partikeln .....	63
Diagramm 19	Summarische Darstellung von Genomreifung, Core-Partikel-Stabilität, Phosphorylierung und Verteilung über den Dichtegradienten .....	66
Diagramm 20	Verteilung der viralen Enzymaktivitäten über den Dichtegradienten, Darstellung zum Ablesen der fehlenden Enzymaktivitäten .....	79

---

**7.4 Verzeichnis der Literatur****Adam E. J. and Adam S. A. (1994):**

Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope.

J. Cell Biol., 125, 547-555

**Adam S. A., Marr R. S. and Gerace L. (1990):**

Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors.

J. Cell Biol., 111, 807-816

**Albin C. and Robinson W. S. (1980):**

Protein kinase activity in hepatitis B virus.

J. Virol., 34, 297-302

**Baer G. S. and Dermody T. S. (1997):**

Mutations in reovirus outer-capsid protein sigma3 selected during persistent infections of L cells confer resistance to protease inhibitor E64.

J. Virol., 71, 4921-4928

**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

**Beames B. and Lanford R. E. (1993):**

Carboxy-terminal truncations of the HBV core protein affect capsid formation and the apparent size of encapsidated HBV RNA.

Virology, 194, 597-607

**Bergelson J. M., Cunningham J. A., G. D., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L. and Finberg R. W. (1997):**

Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.

Science, 275, 1320-1323

**Birnbaum F. and Nassal M. (1990):**

Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein.

J. Virol., 64, 3319-3330

**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

**Bosem M. E., Harris R. and Atherton S. S. (1990):**

Optic nerve involvement in viral spread in herpes simplex virus type 1 retinitis.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 31, 1683-1689

**Bottcher B., Wynne S. A. and Crowther R. A. (1997):**

Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy [see comments].

Nature, 385, 88-91

**Breau W. C., Atwood W. J. and L.C. N. (1992):**

Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the Simian Virus 40 receptor.

J. Virol., 66, 2037-2045

**Brunetti C. R., Burke R. L., Hoflack B., Ludwig T., Dingwell K. S. and Johnson D. C. (1995):**

Role of the mannose-6-phosphate receptors in herpes simplex virus.

J. Virol., 69, 3517-3528

**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

**Bui M., Whittaker G. and Helenius A. (1996):**

Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleo-proteins.

J. Virol., 70, 8391-8401

**Charlton C. A. and Volkman L. E. (1993):**

Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation.

Virology, 197, 245-254

**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

**Dales S. and Chardonnet Y. (1973):**

Early events in the interaction of adenovirus with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movements of the inoculum.

Virology, 56, 465-483

**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

**Davis L. I. (1995):**

The nuclear pore complex.

Annu. Rev. Biochem., 64, 865-896

**Dingwall C. and Laskey R. A. (1991):**

Nuclear targeting sequences--a consensus? [see comments].

Trends Biochem. Sci., 16, 478-481

**Dworetzky S. I. and Feldherr C. M. (1988):**

Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes.

J. Cell. Biol., 106, 575-584

**Eckhardt S. G., Milich D. R. and McLachlan A. (1991):**

Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus.

J. Virol., 65, 575-582

**Feitelson M. A., Marion P. L. and Robinson W. S. (1982):**

Core particles of hepatitis B virus and ground squirrel hepatitis virus. II. Characterization of the protein kinase reaction associated with ground squirrel hepatitis virus and hepatitis B virus.

J. Virol., 43, 741-748

**Fourel I., Hantz O., Cova L., Allaudeen H. S. and Treppe C. (1987):**

Main properties of duck hepatitis B virus DNA polymerase: comparison with the human and woodchuck hepatitis B virus DNA polymerases.

Antiviral Res., 8, 189-199

**Gallina A., Bonelli F., Zentilin L., Rindi G., Muttini M. and Milanese G. (1989):**

A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids.

J. Virol., 63, 4645-4652

**Gerelsaikhon 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. 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

**Goldfarb D. S., Garipey J., Schoolnik G. and Kornberg R. D. (1986):**

Synthetic peptides as nuclear localization signals.

Nature, 322, 641-644

**Goldman M. J. and Wilson J. M. (1995):**

Expression of alpha-v-beta-5 integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway.

J. Virol., 28, 415-416

**Goto Y., Yamashita T., Arens M., Takahashi T. and Hashimoto T. (1984):**

Characterization of hepatitis B virus DNA polymerase.

Jpn. J. Med. Sci. Biol., 37, 9-18

**Greber U. F., Suomalainen M., Stidwill R. P., Boucke K., Ebersold M. W. and Helenius A. (1997):**

The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry.

Embo J., 16, 5998-6007

**Hantz O., Ooka T., Vitvitski L., Pichoud C. and Treppe C. (1984):**

Comparison of properties of woodchuck hepatitis virus and human hepatitis B virus endogenous DNA polymerases.

Antimicrob. Agents Chemother., 25, 242-246

**Hatton T., Zhou S. and Standing D. N. (1992):**

RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication.

J. Virol., 66, 5232-5241

**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

**Hess G., Arnold W. and Meyer zum Büschenfelde K.-H. (1980):**

Inhibition of Hepatitis-B-Virus DNA Polymerase by Phosphonoformate.  
J. Med. Virol., 5, 309-316

**Hess G., Arnold W. and Meyer zum Buschenfelde K. H. (1981):**

Demonstration and partial characterization of an intermediate HBcAG (Dane particle) population.  
J. Med. Virol., 7, 241-250

**Hruska F. J., Clayton D. A., Rubenstein J. L. R. and Robinson W. S. (1977):**

Structure of hepatitis b Dane particle DNA before and after Dane particle polymerase reaction.  
J. Virol., 21, 666-672

**Hruska J. F. and Robinson W. S. (1977):**

The proteins of hepatitis B Dane particle cores.  
J. Med. Virol., 1, 119-131

**Huang S., Endo R. I. and Nemerow G. R. (1995):**

Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery.  
J. Virol., 69, 2257-2263

**Huovila A. P., Eder A. M. and Fuller S. D. (1992):**

Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment.  
J. Cell Biol., 118, 1305-1320

**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

**Kalderon D., Richardson W. D., Markham A. F. and Smith A. E. (1984):**

Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen.  
Nature, 311, 33-38

**Kann M., Bischof A. and Gerlich W. H. (1997):**

In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome.  
J. Virol., 71, 1310-1316

**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. (1997):**

Hepatitis B.

in: Collier, L., Balows, A., Sussman, M.:

Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections., 9<sup>th</sup> ed.

Edward Arnold Ltd., London, U.K.



- 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., in press
- 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., 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
- Kartenbeck J., Stukenbrok H. and A. H. (1989):**  
Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmatic reticulum.  
J. Cell Biol., 109, 2721-2729
- 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. 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
- Köck J., Wieland S., Blum H. E. and von Weizsäcker F. (1998):**  
Duck Hepatitis B Virus Formed by N-Terminally Extended or C-Terminally Truncated Core-Proteins Disintegrate during viral DNA Maturation.  
J. Virol., 72, 9116-9120
- König S., Beterams G. and Nassal M. (1998):**  
Mapping of homologous interaction sites in the hepatitis B virus core protein.  
J. Virol., 72, 4997-5005
- Kristensson K., Lycke E., Roytta M., Svennerholm B. and Vahlne A. (1986):**  
Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubulular function an axonal flow (nocodazole, taxol, erythro-9-3-(2-hydroxynonyl)adenine).  
J. Gen. Virol., 67, 2023-2028
- Lackmann M., Ueckermann C., Engelmann K. and Koch G. (1987):**  
Properties of poliovirus associated protein kinase.  
Arch. Virol., 95, 1-16
- 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
- Lanier L. M., Slack J. M. and Volkman L. E. (1996):**  
Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH.  
Virology, 216, 380-388

- Leinbach S. S., Reno R. M., Lee L. F., Isbell A. F. and Boezi J. A. (1976):**  
Mechanism of Phosphonoacetate inhibition of herpesvirus-induced DNA-polymerase.  
*Biochemistry*, 15, 426-430
- Lin H. J., Kwan J. P., Wu P. C. and Chak W. (1983):**  
Phosphonoformic acid-inhibitable nucleotide incorporation as a measure of hepatitis B viral DNA polymerase activity.  
*J. Med. Virol.*, 12, 61-70
- Lu B., Taraporewala F., Stubbs G. and Culver J. N. (1998):**  
Intersubunit interactions allowing a carboxylate mutant coat protein to inhibit tobamovirus disassembly.  
*Virology*, 244, 13-19
- Luby-Phelps K. (1994):**  
Physical properties of the cytoplasm.  
*Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 3-9
- Lycke E., Kristensson K., Svennerhol B., Vahlne A. and Ziegler R. (1984):**  
Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture.  
*J. Gen. Virol.*, 65, 55-64
- Machida A., Ohnuma H., Tsuda F., Yoshikawa A., Hoshi Y., Tanaka T., Kishimoto S., Akahane Y., Miyakawa Y. and Mayumi M. (1991):**  
Phosphorylation in the carboxyl-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody.  
*J. Virol.*, 65, 6024-6030
- Mao J. C.-H. and Robishaw E. E. (1975):**  
Mode of inhibition of herpes simplex virus DNA polymerase by phosphonoacetate.  
*Biochemistry*, 14, 5475-5479
- Maul G. G. (1977):**  
The nuclear and cytoplasmic pore complex. Structure, dynamics, distribution and evolution.  
*Int. Rev. Cytol. Suppl.*, 6, 75-186
- Maul G. G., Rovera G., Vorbrodt A. and J. A. (1978):**  
Membrane fusion as a mechanism of simian virus 40 entry into different cellular compartments.  
*J. Virol.*, 28, 936-944
- Miles B. D., Luftig R. B., Weatherbee J. A., Weihing R. R. and Weber J. (1980):**  
Quantitation of the interaction between adenovirus types 2 and 5 and microtubules inside infected cells.  
*Virology*, 105, 265-269
- Montgomery R. I., Warner M. S., Lum B. J. and Spear P. G. (1996):**  
Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family.  
*Cell*, 87, 427-436

**Nassal M. (1992):**

The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly.

J. Virol, 66, 4107-4116

**Nordenfelt E., Helgstrand E. and Öberg B. (1979):**

Trisodium phosphonoformate inhibits hepatitis B Dane particle DNA polymerase.

Acta path. microbiol. scand., 87, 75-76

**Nordenfelt E., Öberg B., E. H. and Miller E. (1980):**

Inhibition Of Hepatitis B Dane Particle DNA Polymerase Activity by Pyrophosphate Analogs.

Acta path. microbiol. scand., 88, 169-175

**Nycomed (1996):**

Centrifugation Techniques 1 - Nycodenz.

Density Gradient Media

**Öberg O. (1989):**

Antiviral Effects Of Phosphonoformate.

Pharmac. Ther., 40, 213-285

**Offensperger W. B., Walter E., Offensperger S., Zeschnigk C., Blum H. E. and Gerok W. (1988):**

Duck hepatitis B virus: DNA polymerase and reverse transcriptase activities of replicative complexes isolated from liver and their inhibition in vitro.

Virology, 164, 48-54

**Ohori H., Yamaki M., Onoder E., Yamada E. and Ishida N. (1980):**

Antigenic conversion from HBcAg to HBeAg by degradation of hepatitis B core particles.

Intervirology, 13, 74-82

**Petit M. A., Capel F., Dubanchet S. and Mabit H. (1992):**

PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes.

Virology, 187, 211-222

**Pollard D. T. (1995):**

Actin cytoskeleton - missing link for intracellular bacterial motility.

Curr. Biol., 5, 837-840

**Ratka M., Lackmann M., Ueckermann C., Karlins U. and Koch G. (1989):**

Poliovirus-associated protein kinase: destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn<sup>2+</sup>.

J. Virol, 63, 3954-3960

**Reich E. and Goldberg I. H. (1964):**

Actinomycin and nucleic acid function.

Progressive Nucleic Acids Research, 3, 183-234

**Reichelt R., Holzenburg A., Buhle E. L. Jr., Jarnik M., Engel A. and Aebi U. (1990):**

Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components.

J. Cell Biol., 110, 883-894

**Rickwood D. (1989):**

Centrifugation.

in: Rickwood-D; Hames-B. D.: a practical approach  
IRL Press, Oxford, U.K.

**Roizman B. and Sears A. E. (1996):**

Herpes viruses and their replication.

Fundamental virology, 1043-1107

**Sathananthan B., Rodahl E., Flatmark T., Langeland N. and Haarr L. (1997):**

Purification of herpes simplex virus type 1 by density gradient centrifugation and estimation of the sedimentation coefficient of the virion.

Apmis, 105, 238-246

**Scharli C. E. and Koch G. (1984):**

Protein kinase activity in purified poliovirus particles and empty viral capsid preparations.

J. Gen. Virol., 65, 129-139

**Schlegel A., Schaller J., Jentsch P. and Kempf C. (1993):**

Semliki Forest virus core protein fragmentation: its possible role in nucleocapsid disassembly.

Biosci. Rep., 13, 333-347

**Schlicht H. J., Bartenschlager R. and Schaller H. (1989):**

The duck hepatitis B virus core protein contains a highly phosphorylated C terminus that is essential for replication but not for RNA packaging.

J. Virol, 63, 2995-3000

**Seck T., Lingen M., Weise K. and Falke D. (1994):**

Evidence for a multistep mechanism for cell-cell fusion by herpes simplex virus with mutations in the syn 3 locus using heparin derivatives during fusion from within.

Arch. Virol., 136, 173-181

**Seifer M., Zhou S. and Standring 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

**Sells M. A., Zelent A. Z., Shvartsman M. and Acs G. (1988):**

Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions.

J. Virol, 62, 2836-2844

**Sherker A. H., Hirota K., Omata M. and Okuda K. (1986):**

Foscarnet decreases serum and liver duck hepatitis B virus DNA in chronically infected ducks.

Gastroenterology, 91, 818-824

**Shikata T., Karasawa T., Abe K., Uzawa T., Suzuki H., Oda T., Imai M., Mayumi M., Moritsugu Y. (1977):**

Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus.

J. Infect. Dis., 136, 571-576

**Sodeik B., Ebersold M. W. and Helenius A. (1997):**

Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus.

J. Cell Biol., 136, 1007-1021

**Southern E. M. (1975):**

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol., 98, 503-517

**Spear P. G. (1993):**

Entry of alpha herpesviruses into cells.

Sem. Virol., 4, 167-180

**Stehle H., Yan Y., Benjamin T. L. and Harrison S. C. (1994):**

Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment.

Nature, 369, 160-163

**Stehle T. and S.C. H. (1996):**

Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments.

Structure, 4, 183-194

**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

**Topp K. S., Meade L. B. and LaVail J. H. (1994):**

Microtubule polarity in the peripheral processes of trigeminal ganglion cells: relevance for the retrograde transport of herpes simplex virus.

J. Neurosci., 14, 318-325

**Tuttleman J. S., Pourcel C. and Summers J. (1986):**

Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells.

Cell, 47, 451-460

**Ulrich P. P., Bhat R. A., Seto B., Mack D., Sninsky J. and Vyas G. N. (1989):**

Enzymatic amplification of hepatitis B virus DNA in serum compared with infectivity testing in chimpanzees.

J. Infect. Dis., 160, 37-43

**van der Lende T. R., Harmsen M. C. and Wessels J. G. (1994):**

Double-stranded RNAs and proteins associated with the 34 nm virus particles of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*.

J. Gen. Virol., 75, 2533-2536

**Volkman L. E. and Goldsmith P. A. (1985):**

Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody inhibition of entry by adsorptive endocytosis.

Virology, 143, 185-195

**Volkman L. E. and Goldsmith P. A. (1988):**

Resistance of the 64K protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus to functional inactivation by proteolysis.

Virology, 166, 285-289

**Whitbeck J. C., Peng C., Lou H., Xu R. L., Willis S. H., Deleon M. P., Peng T., Nicola A. V., Montgomery R. I., Warner M. S., Soulika A. M., Spruce L. A., Moore W.T., Lambris J. D., Spear P. G., Cohen P. G. and Eisenberg R. J. (1997):** Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to Hvev, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J. Virol.*, 71, 6083-6093

**Wingfield P. T., Stahl S. J., Williams R. W. and Steven A. C. (1995):** Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry*, 34, 4919-4932

**Yamada M. and Kasamatsu H. (1993):** Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting. *J. Virol.*, 67, 119-130

**Yu M. and Summers J. (1991):** A domain of the hepadnavirus capsid protein is specifically required for DNA maturation and virus assembly. *J. Virol.*, 65, 2511-2517

**Zhao L. J. and Padmanabhan R. (1988):** Nuclear transport of adenovirus DNA polymerase is facilitated by interaction with preterminal protein. *Cell*, 55, 1005-1015

**Zhou S. and Standring 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

---

## **Danksagungen**

Ich danke Herrn Prof. Dr. W.H. Gerlich für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Rahmenbedingungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. E. Jost danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor dem Fachbereich Biologie.

Herrn Dr. habil. M. Kann danke ich für die aktive Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Belangen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Paul Pumpens (Riga, Lettland) danke ich für die Herstellung und Überlassung rekombinant exprimierter Core-Partikel.

Allen Mitarbeitern des Instituts für medizinische Virologie danke ich für das kollegiale Arbeitsklima.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin versichere ich an Eides statt, daß die digitalisierten Abbildungen inhaltlich nicht verändert wurden. Die Originale wurden im Raum von Herrn Professor W. H. Gerlich, Institut für medizinische Virologie, Frankfurter Straße 107, 35390 Gießen hinterlegt. Die nachstehende Unterschrift bestätigt die Hinterlegung.

---

Andreas Bischof

---

Prof. Dr. W.H. Gerlich  
für die Hinterlegung der Originale



---

**Lebenslauf**

<b>Vorname</b>	Andreas
<b>Name</b>	Bischof
<b>Geburtstag, -ort</b>	27.07.1996, Mullingar/Irland
<b>Staatsangehörigkeit</b>	Deutsch
<b>Schulbildung</b>	1973 - 1977 Goethe-Grundschule in Limburg 1977 - 1986 Tilemann-Gymnasium in Limburg, Abschluß Abitur
<b>Studium</b>	1987 - 1994 Studium der Biologie 1987 - 1993 Ergänzungsstudium der angewandten Informatik beide an der Justus Liebig-Universität Gießen
<b>Promotion</b>	seit 1994 am Institut für medizinische Virologie der Justus Liebig-Universität Gießen
<b>Publikation</b>	Kann M., Bischof A. and Gerlich W.H. (1997): In Vitro Model for the Nuclear Transport of the Hepadnavirus Genome. Journal of Virology, Vol. 71 (2), p. 1310 - 1316