

Angefertigt am  
Fachbereich 08 - Biologie und Chemie  
in Zusammenarbeit mit dem  
Fachbereich 11 - Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

# **Die Rolle der Zytokeratine 8 und 18 bei der Hepatitis B Virusinfektion**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche  
- Biologie -  
der Justus-Liebig Universität Gießen

vorgelegt von  
**Dirk Schröder**  
Dipl.-Ing. Biotechnologie (FH)  
Gießen 2014

Die vorliegende Arbeit wurde an der Justus-Liebig-Universität Gießen, Medizinische Klinik II, Abt. Gastroenterologie, Gaffkystr. 11, 35392 Gießen im Forschungslabor der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Elke Roeb durchgeführt.

Dekan: **Prof. Dr. Holger Zorn**

Gutachter: **Prof. Dr. rer. nat. Michael Martin**  
**Prof. Dr. med. Elke Roeb, MA**

## Inhaltsverzeichnis

		Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Hepatitis B Virus .....	1
1.1.1	Prolog.....	1
1.1.2	Taxonomie .....	1
1.1.3	Epidemiologie und Übertragung.....	2
1.1.4	Pathogenese .....	4
1.1.4.1	Akute Hepatitis B .....	4
1.1.4.2	Chronische Hepatitis B.....	5
1.1.5	Genomaufbau und Transkripte .....	7
1.1.5.1	Genomaufbau.....	7
1.1.5.2	Transkripte.....	9
1.1.6	Virusmorphologie .....	10
1.1.7	Viraler Lebenszyklus des Hepatitis B Virus.....	12
1.1.7.1	Zelluläre Bindung, Aufnahme und Transport von HBV und cccDNA-Bildung .....	12
1.1.7.2	Replikation .....	14
1.1.8	HBV-Oberflächenproteine.....	16
1.1.8.1	Das kleine Oberflächenprotein (SHBs).....	18
1.1.8.2	Das mittlere Oberflächenprotein (MHBs).....	19
1.1.8.3	Das große Oberflächenprotein (LHBs) .....	19
1.1.9	Das X-Protein des Hepatitis B Virus .....	23
1.2	Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen .....	24
1.2.1	Mikrofilamente (Aktin) .....	24
1.2.2	Mikrotubuli.....	26
1.2.3	Intermediärfilamente.....	27
1.2.4	Keratine.....	30
1.2.4.1	Allgemeines .....	30
1.2.4.2	Biologische Funktionen von Keratinen .....	31
1.2.4.3	Keratin-assoziierte Proteine.....	33
1.2.4.4	Keratin –Pathogen-Interaktionen.....	34
1.2.4.5	Dynamik des Keratinfilament-Netzwerks .....	35
1.2.4.6	Posttranslationale Modifikationen von Keratinen .....	37
1.2.5	Der Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure .....	39

1.3	Zielsetzung der Arbeit .....	41
<b>2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>43</b>
2.1	Geräte und technische Hilfsmittel .....	43
2.2	Verbrauchsmaterial: .....	45
2.3	Chemikalien und Reagenzien .....	45
2.4	Medien und Zusätze für Zellkultur .....	47
2.5	Rekombinante Proteine (human) und Peptide .....	47
2.6	shRNA für RNA-Interferenz .....	48
2.7	Enzyme .....	48
2.8	Kits.....	48
2.9	Antikörper.....	49
2.10	Plasmide.....	50
2.11	Primer .....	53
2.12	Primäre Zellen .....	54
2.13	Zelllinien.....	54
2.14	Bakterienstämme .....	55
2.15	Puffer, Lösungen und Medien .....	56
2.15.1	Allgemeine Puffer und Lösungen .....	56
2.15.2	Protein-Gelelektrophorese .....	57
2.15.3	Western Blotting.....	59
2.15.4	Medien .....	60
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>61</b>
3.1	Zellkultur .....	61
3.1.1	Kulturbedingungen der Zellen .....	61
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	61
3.2	Klonierungen der lentiviralen Plasmide .....	62
3.2.1	Amplifikationen zu klonierender Gensequenzen.....	62
3.2.2	Restriktionsenzym-Behandlungen und Aufreinigungen.....	63
3.2.3	Ligation und Transformation.....	64
3.2.4	Verifizierung der Bakterienklone .....	65
3.3	Herstellung von lentiviralen Vektoren.....	65
3.4	Lentivirale Transduktionen.....	66
3.5	Selektion transduzierter / transfizierter Zellen (Klonpicking).....	68
3.6	Echtzeit-PCR .....	68
3.6.1	Prüfung auf lentivirale RNA.....	68

3.6.2	Relative Quantifizierung von CK18-RNA .....	69
3.7	Collagen-Beschichtungen .....	69
3.8	Immunfluoreszenz-gekoppelte Antikörper-Färbungen und Mikroskopie .....	69
3.9	Selektive Depolymerisierungen von Zytoskelett-Komponenten .....	70
3.10	Western-Blotting .....	70
3.10.1	Herstellung von Zelllysaten für SDS-PAGE .....	70
3.10.2	Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	71
3.10.3	Semi-Dry Blotting .....	71
3.11	Konfokale Mikroskopie .....	72
3.12	Proximity Ligation Assay .....	72
3.13	Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie .....	74
3.14	Transfektionen und Transformationen .....	74
3.14.1	Herstellung von LHBs/HBx-transgenen AML-12-Zellen .....	74
3.14.2	Transfektion zur Expression eines Golgi-Markers .....	75
3.14.3	Expression von CK18 und BiP in NIH3T3 Zellen .....	75
3.14.4	RNA-Interferenz gegen CK18 .....	76
3.15	<i>In-vitro</i> HBV-Infektionen von primären Hepatozyten aus Tupaia .....	76
3.15.1	Einfluss von extrazellulärem Zytokeratin 8 und 18 .....	76
3.15.2	Einfluss von Okadainsäure (OA) .....	77
3.16	ELISA .....	77
3.17	Harnstoff-Assay .....	78
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>79</b>
4.1	Klonierung der lentiviralen Vektoren, Herstellung von infektiösen Lentiviren und Transduktionen .....	79
4.1.1	mCherry .....	79
4.1.2	HBV-Oberflächenprotein-Sequenzen SHBs, LHBs und LHBs/HBx .....	80
4.2	Zeitverlauf der LHBs-Expression in lentiviral transduzierten Huh7- und NIH3T3-Zellen .....	80
4.3	Intrazelluläre Verteilung von SHBs und LHBs in HBs-transgenen Zelllinien .....	81
4.4	HBsAg-Verteilung in Lebern von HBV-Patienten und HBs-transgener Mäuse .....	82
4.5	Subzelluläre Lokalisierung von LHBs .....	83
4.6	Untersuchung zur Glykosylierung von LHBs und intrazelluläre LHBs- Verteilung .....	85
4.7	Quantifizierung von sekretierten und intrazellulären HBs-Proteinen .....	86
4.8	Untersuchungen zur Interaktion von LHBs mit Zytoskelett-Komponenten .....	88

4.8.1	Einfluss von Okadainsäure auf die intrazelluläre Verteilung von Zytokeratinen und LHBs .....	88
4.8.2	Einfluss von Cytochalasin D auf die intrazelluläre Verteilung von $\beta$ -Aktin und LHBs.....	90
4.8.3	Einfluss von Nocodazol auf die intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli und LHBs.....	91
4.9	Einfluss von Cytochalasin D auf die Zytokeratin-Struktur .....	93
4.10	Einfluss von Okadainsäure auf die Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums.....	94
4.11	Untersuchungen zur partiellen ER-Komprimierung nach OA-Behandlung.....	95
4.12	Zytokeratin-Profil von LHBs/HBx-transgenen Zelllinien.....	96
4.13	Untersuchungen zur Kolo-kalisation von LHBs mit Zytokeratin 8 und 18 .....	97
4.13.1	Konfokale Mikroskopie .....	97
4.13.2	Proximity Ligation Assay .....	98
4.14	Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) .....	100
4.15	Expression von CK18 und BiP in NIH3T3 (LHBs/HBx)-Zellen.....	101
4.15.1	CK18-Expression und LHBs-Verteilung in NIH3T3-Zellen .....	101
4.15.2	BiP-Expression und LHBs-Verteilung in NIH3T3-Zellen .....	102
4.16	RNA-Interferenz gegen CK18 .....	104
4.16.1	Überprüfung des CK18-Knockdown auf RNA- und Protein-Ebene .....	104
4.16.2	CK18-Knockdown und LHBs-Verteilung in Huh7-Zellen .....	105
4.17	Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der CK8/18 – LHBs-Interaktion ...	107
4.17.1	Einfluss von extrazellulärem CK8/18-Protein auf die HBV-Infektion in vitro..	107
4.17.2	Einfluss von Okadainsäure auf die HBV-Infektion.....	108
4.17.3	Einfluss von Okadainsäure auf die HBsAg-Sekretion.....	110
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>112</b>
5.1	Expression und Verteilung von LHBs und SHBs.....	112
5.2	Untersuchungen zur Interaktion von LHBs mit dem Zytoskelett.....	114
5.3	Zytokeratinprofil und Untersuchungen zur Kolo-kalisation und Interaktion von LHBs und Zytokeratin 8 und 18 .....	116
5.4	Untersuchungen zur LHBs-Aggregatbildung .....	119
5.5	Untersuchungen zum Einfluss von Zytokeratinen auf die HBV-Infektion und Sekretion .....	121
5.5.1	Einfluss von extrazellulärem Zytokeratin 8 und 18.....	121
5.5.2	Einfluss von Okadainsäure .....	123
5.6	Limitationen der Arbeit .....	127
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick .....	127

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>163</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>166</b>
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	166
10.2	Tabellenverzeichnis .....	167
10.3	Plasmidkarten .....	168
10.4	Einklonierte Sequenzen der HBV-Oberflächenproteine .....	171
10.4.1	LHBs/HBx-Insert.....	171
10.4.2	LHBs-Insert .....	172
10.4.3	SHBs-Insert.....	172
10.5	Einklonierte mCherry-Sequenz .....	173
10.6	Interaktion von LHBs mit dem Zytoskelett bei AML-12-Zellen (LHBs/HBx).....	174
10.7	Proximity Ligation Assay .....	176
<b>11</b>	<b>Publikationsbeteiligungen und Kongressbeiträge .....</b>	<b>177</b>
11.1	Publikationsbeteiligungen.....	177
11.2	Kongressbeiträge und publizierte Abstracts: .....	178
11.3	Nicht publizierte Abstracts und sonstige Kongressbeiträge: .....	179
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>180</b>
<b>13</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>181</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Hepatitis B Virus

### 1.1.1 Prolog

Trotz weltweiter Impfkampagnen stellen Hepatitis B Virus (HBV)-Infektionen immer noch ein großes Gesundheitsproblem der Menschheit dar. HBV-Infektionen können akute und chronische Leberentzündungen (Hepatitis) auslösen, die über Leberfibrose und Zirrhose zu totalem Leberversagen oder einem hepatozellulären Karzinom (HCC) führen können. Mehr als 240 Mio. Menschen weltweit (Ott et al., 2012) sind chronische und damit lebenslange HBV-Träger und mehr als 620.000 sterben jährlich an den Spätfolgen (Lavanchy, 2012). Insbesondere Menschen aus Entwicklungsländern sind aufgrund fehlenden Impfschutzes und mangelnder Medikamentenversorgung immer noch stark gefährdet. HBV ist ca. 50- bis 100fach infektiöser als das menschliche Immundefizienz-Virus (HIV). Ein Heilmittel gegen HBV existiert bisher noch nicht und aufgrund von Resistenzbildungen gegen Medikamente bzw. Unverträglichkeiten stellt eine Impfung gegen HBV den z.Zt. besten Schutz dar. Hauptrisikofaktoren für chronische Infektionen sind die perinatale Mutter-Kind-Übertragung und Personen mit einer nur ineffizienten Immunantwort gegen HBV. Eine weitere Verbesserung von Impfstoffen und Medikamenten durch Forschung und Entwicklung ist daher wünschenswert.

### 1.1.2 Taxonomie

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist der Prototyp aus der Familie der hepatotropen DNA-Viren (Hepadnaviren). Hepadnaviren sind kleine umhüllte, nicht-lytische Viren, deren Erbinformation im Gegensatz zu Hepatitis-RNA-Viren (z.B. Hepatitis A und C) als DNA vorliegt. Sie besitzen einen ausgeprägten Lebertropismus, sind verhältnismäßig artspezifisch und können akute und chronische Infektionen im Wirt hervorrufen. Sie werden in zwei Genera eingeteilt: Die Avihepadnaviren infizieren Vögel wie Enten, Störche und Reiher. Der bekannteste Vertreter ist hier das Hepatitis B Virus der Pekingente (DHBV) (Mason et al., 1980), welches aufgrund eines einfach verfügbaren *in vitro* Infektionssystems schon vor Jahrzehnten auch sehr wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Molekularbiologie und des



Lebenszyklus des ähnlichen HBV lieferte. Daneben sind das *Heron* Hepatitis B Virus (HHBV) des Graureihers (Sprengel et al., 1988), das *Stork* Hepatitis B Virus (STHBV) der Weisstorchs (Pult et al., 2001) und andere bekannt. Im Vergleich zu den Orthohepadna- fehlt den Avihepadnaviren das X-Gen sowie eine dem mittleren Oberflächenprotein (MHBs) entsprechendes Gen. Dem zweiten Genus werden die Orthohepadnaviren zugeordnet, die Säugetiere infizieren und zuerst in Menschen entdeckt wurden (HBV) (Dane et al., 1970). Ähnliche Viren aus dieser Art findet man auch in Primaten wie Gorillas (GoHBV) (Grethe et al., 2000), Orang-Utans (OuHBV) (Warren et al., 1999), Schimpansen (ChHBV) (Vaudin et al., 1988), Gibbons (GiHBV) (Norder et al., 1996), Wollaffen (WMHBV) (Lanford et al., 1998) sowie in verschiedenen Nagetieren wie z.B. nordamerikanischen Waldmurmeltieren (WHV) (Summers et al., 1978) und einigen Erdhörnchenarten (Familie *Sciuridae*). Erst kürzlich wurden auch dem HBV verwandte Viren in bestimmten Fledermausarten entdeckt (Drexler et al., 2013). Das HBV des Menschen wird unterteilt in z.Zt. 10 Genotypen (A bis J), die sich in mehr als 8% der Nukleotide ihres Genoms unterscheiden (Liu and Kao, 2013). Eine weitere Unterteilung in mehr als 20 Subgenotypen wird bei Nukleotidunterschieden von mehr als 4% vorgenommen. Daneben wird HBV in vier verschiedene Haupt-Serotypen (adr, adw, ayr und ayw) eingeteilt, die sich durch bestimmte Aminosäuren (AS) in der immunologisch sehr wichtigen Determinante A des kleinen Oberflächenproteins (SHBs) definieren. Die Haupt-Serotypen werden weiter in Sub-Serotypen eingeteilt, die man bestimmten geographischen Regionen zuordnen kann.

### 1.1.3 Epidemiologie und Übertragung

Das HBV ist weltweit verbreitet. Hochrechnungen zufolge haben zwei Milliarden Menschen serologische Anzeichen einer durchgemachten bzw. noch bestehenden HBV-Infektion (EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 2003). Die verschiedenen Genotypen treten in bestimmten geografischen Regionen gehäuft auf. So ist z.B. Genotyp A überwiegend in Mitteleuropa, Genotyp D in Süd- und Osteuropa sowie in Rußland, Indien und Nordafrika, Genotyp E in Westafrika, Genotyp F in Südamerika und die Genotypen B und C bevorzugt in China, Südostasien und Australien zu finden. Trotz eines seit etwa 30 Jahren verfügbaren effizienten HBV-Impfstoffs (McAleer et al., 1984) und weltweiter Impfkampagnen sind immer noch mehr als 240 Mio. Menschen (Ott et al., 2012) chronische und damit lebenslange HBV-Träger und mehr als 620.000 (Lavanchy, 2012) sterben jährlich an den Spätfolgen.

Chronische HBV-Infektionen sind mit mehr als 8% der Bevölkerung besonders hoch in Regionen wie Südostasien und Zentral- und Westafrika (Ganem and Prince, 2004). Weltweit die meisten chronischen HBV-Infektionen verursacht die perinatale Mutter-Kind-Übertragung des Virus. Insbesondere bei Müttern, die für das Hepatitis B „e“-Antigen (HBeAg) positiv sind, liegt die Übertragungsrate bei durchschnittlich über 90%, während sie bei HBeAg-negativen Müttern < 5% beträgt. Insbesondere Frauen der Genotypen B und C Ostasiens bleiben bis ins gebärfähige Alter HBeAg-positiv, daher ist die Übertragung hier vorwiegend vertikal. Das HBeAg ist plazentagängig und erzeugt eine Immuntoleranz gegen das HBV (Chisari and Ferrari, 1995). Dagegen findet die Übertragung in Afrika und dem Mittelmeerraum überwiegend horizontal im Kindesalter statt (Hadziyannis, 2011). In den Industrieländern ist die chronische HBV-Rate von < 1% hauptsächlich durch parenterale und sexuelle Übertragung des Virus bedingt (Marcellin, 2009).

HBV wird überwiegend durch Blut und bei Sexualkontakten übertragen. Reiner Schleimhautkontakt als Eintrittspforte ist allerdings 100 bis 1000 Mal ineffizienter als echte Hautverletzungen, da Speichel, Sperma und Vaginalsekret nur ca. ein Tausendstel der Virusmenge des Blutserums enthalten. Die Übertragungsgefahr ist weiterhin stark von der Virenkonzentration im Blut abhängig, die bei einem HBV-Träger je nach der Krankheitsphase, in der er sich befindet, sehr unterschiedlich ist. So können sich in einer akuten hochvirämischen Phase bis zu  $10^9$  infektiöse Viren/ml Blut befinden, während bei medikamentöser Behandlung bzw. voller Immunkontrolle u.U. kaum infektiöse Viren nachweisbar sind. Da das Virus Eintrocknen gut verträgt und auch relativ hitzestabil ist, sind insb. Nadelstichverletzungen und Mehrfachverwendung von Injektionsnadeln bei medizinischen Personal und Drogenabhängigen mit einem hohen Übertragungsrisiko verbunden. Infektionen über HBV-kontaminierte Blutprodukte oder durch Organtransplantationen sind auch in Deutschland aus der Vergangenheit bekannt, aber in den letzten Jahren durch routinemäßige und ausgedehnte Kontrollen bis auf wenige Ausnahmen reduziert worden. In Ländern mit wenigen hohen Gesundheits- und Hygienestandards ist das Übertragungsrisiko aber weit höher einzustufen. Ein weiterer möglicher Übertragungsweg von HBV, insb. in tropischen Endemiegebieten, ist der über blutsaugende Insekten (Zheng et al., 1995). In bis zu einer von 200 Stechmücken bzw. auch in Bettwanzen wurden Hepatitis B-Viren gefunden (Wills et al., 1976; Wills et al., 1977).

Ein nicht zu unterschätzendes Risiko stellt die wie bei Retroviren ähnlich hohe Mutationsrate bei HBV dar, die es den Viren ermöglichen kann, einen vorhandenen Impfschutz zu unterlaufen (sog. *Escape*- Mutanten). Trotzdem gehört eine Impfung gegen HBV mit zum

besten Schutz gegen eine Infektion. Es gibt allerdings Risikofaktoren, die eine schwache Immunantwort bewirken können. Dazu gehört z.B. Übergewicht, fortgeschrittenes Alter, Rauchen, Diabetes, HIV-Infektion (Gerlich et al, 2012). Auch gibt es Personen, deren Immunantwort per se schwach oder fehlend ist, und als „low“ oder „non-responder“ bezeichnet werden.

Ein eingeschränktes Immunsystem ist daher ein bedeutender Risikofaktor für eine HBV-Infektion und für weitere Übertragungen.

### **1.1.4 Pathogenese**

#### **1.1.4.1 Akute Hepatitis B**

Das HBV gelangt nach Eintritt in den Körper mit dem Blut in die Leber und infiziert die dort ansässigen Hepatozyten. Es ist nicht unmittelbar zytopathogen. Die Pathogenese und Bekämpfung der Viren ist bei einer akuten Hepatitis-B hauptsächlich durch die zellulären Abwehrmaßnahmen des adaptiven Immunsystems bedingt. Diese unterteilen sich in eine zytopathische Wirkung, die zum Untergang von infizierten Hepatozyten führt und einer nicht-zytopathischen Wirkung, bei der die Zellen nicht geschädigt werden (Guidotti and Chisari, 2006). Eine starke, polyklonale und multispezifische Aktivierung von T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) und zytotoxischen ( $CD8^+$ ) T-Zellen ist für eine effiziente Eliminierung der Hepatitis B-Viren notwendig (Chisari et al., 2010). Die zytotoxischen T-Zellen erkennen über ihren spezifischen T-Zellrezeptor die mit MHC-Klasse I-Molekülen im Komplex präsentierten HBV-Peptide auf der Zelloberfläche von infizierten Hepatozyten und induzieren in ihnen über die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen (Proteasen aus intrazellulären Granula) Apoptose. Eine Freisetzung von antiviralen und pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interferon gamma ( $INF-\gamma$ ), Tumor-Nekrosefaktor alpha ( $TNF-\alpha$ ), Interleukin 1 beta ( $IL-1\beta$ ) und Interleukin 6 ( $IL-6$ ) wird daraufhin ausgelöst (Guidotti and Chisari, 2001).  $INF-\gamma$  bewirkt u.a. eine nicht-zytopathische Hemmung der viralen Replikation und Expression in benachbarten Hepatozyten (Guidotti et al., 1996). Der Erkennung durch das angeborene Immunsystem kann sich das HBV wirkungsvoll entziehen (Wieland et al., 2004). Folgende Besonderheiten des HBV tragen dazu bei: episomale Form des HBV-Genoms (cccDNA) im Zellkern der Wirtszelle, 5'-gekapselte und polyadenylierte virale mRNA, „verborgene“ Replikation innerhalb viraler Nukleokapsid-Partikel (Seeger and Mason, 2000). Dadurch unterbleibt eine Induktion von

IFN- $\alpha/\beta$  und einer Vielzahl von Interferon-induzierenden Genen mit weiteren antiviralen Wirkungen. In etwa 95% der Fälle heilt eine Akute Hepatitis B innerhalb von zwei bis drei Wochen vollständig aus und bewirkt eine lebenslange Immunität gegen HBV. Geringe HBV-DNA-Mengen im Serum und in mononukleären Blutzellen können jedoch oft noch Jahre später mit empfindlichen Methoden, wie z.B. PCR nachgewiesen werden (Rehermann et al., 1996) und kennzeichnen den Begriff der okkulten HBV-Infektion (Raimondo et al., 2007). Eine Reaktivierung von HBV kann in einigen Fällen bei Immunsuppression wie z.B. nach Transplantationen und bei Chemotherapien auftreten.

#### 1.1.4.2 Chronische Hepatitis B

Von einer chronischen Hepatitis B (CHB) spricht man, wenn HBV-Oberflächenproteine (HBsAg) länger als sechs Monate im Blutserum nachweisbar sind. Sie tritt auf, wenn das Immunsystem die Virusinfektion nicht vollständig beherrschen kann. Verantwortlich hierfür ist eine zu schwache und nur oligoklonale antigen-spezifische Aktivierung von T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) und zytotoxischen ( $CD8^+$ ) T-Zellen (Chisari et al., 2010). Dies führt zusätzlich zu einer eingeschränkten B-Zell-Aktivierung und humoralen Immunantwort. Auch eine zu späte Aktivierung von T-Helferzellen, die durch eine zu geringe Infektionsdosis verursacht sein kann, trägt zur HBV-Persistenz bei (Asabe et al., 2009). Mehrere Studien zeigten weiter, dass das Fehlen einer frühen T-Helferzellen-Aktivierung zu einer Inaktivierung, Toleranz und Apoptose von zytotoxischen T-Zellen führte (Bertolino et al., 2002; Crispe, 2003; Isogawa et al., 2005) Weiterhin können T-Suppressor-Zellen (Treg), die man häufig im Blut oder in der Leber chronisch HBV-Infizierter findet, eine Inhibierung der  $CD8^+$  Funktionen bewirken (Fu et al., 2007).

Bei chronisch Infizierten werden oftmals zu geringe Konzentrationen an neutralisierenden Antikörpern gegen das Hepatitis B Virus gefunden. Diese spielen jedoch eine wichtige Rolle bei der Virenbekämpfung. Sie komplexieren mit freien Viren, machen sie dadurch besser erkennbar für Fresszellen und blockieren die Bindung und Aufnahme von infektiösen Viren bei Hepatozyten. Dadurch unterbleibt bei chronisch Infizierten auch eine wirkungsvolle Beseitigung von subviralen Partikeln, denen eine tolerogene Rolle bei hohen Serumkonzentrationen nachgesagt wird und neutralisierende Antikörper gegen HBV-Oberflächenproteine abfangen können. Die sehr hohe Mutationsrate des HBV erzeugt zudem fortlaufend Virusvarianten, von denen einige durch Veränderung von B- und T-Zell-Epitopen

der Immunabwehr entgehen können und einen Selektionsvorteil gegenüber dem Wildtyp-Virus besitzen. Dies fördert die Virusausbreitung im Infizierten und häufig auch die HBV-Persistenz (Guidotti and Chisari, 2006; Wieland and Chisari, 2005). Auch einige HBV-Proteine tragen hierzu bei. Am häufigsten etablieren Neugeborene von HBeAg-positiven HBV-infizierten Müttern eine CHB. HBeAg ist plazentagängig und führt beim Neugeborenen zu einer immunologischen Toleranz gegen das HBeAg und das Hepatitis B Core Antigen (HBcAg) von HBV (Chisari and Ferrari, 1995). Grundsätzlich fördert eine perinatale Infektion bzw. eine Infektion im Kleinkindalter eine Immuntoleranz gegen das HBV. So tritt Chronizität bei bis zu 90% der infizierten Neugeborenen auf, 20 bis 30% bei Kindern zwischen 1 und 5 Jahren, 6% bei Kindern zwischen 5 bis 15 Jahren und nur bei 1 bis 5% bei Erwachsenen (Lavanchy, 2004). Möglicherweise trägt auch das X-Protein von HBV (HBx) zu einem chronischen Infektionsverlauf bei. Es wurde berichtet, das HBx die zelluläre Proteasomaktivität hemmen kann und somit zu einer verringerten Antigenprozessierung und –präsentierung bei infizierten Hepatozyten führen könnte (Hu et al., 1999).

Eine CHB verläuft je nach Alter bei Infektion, Aktivität der HBV-Replikation und der Immunabwehr individuell sehr unterschiedlich und in verschiedenen Phasen (Mutimer and Ye, 2011). Durch kontinuierliche Zyklen aus Schädigung und Zerstörung von Hepatozyten, daraus entstehenden Entzündungs- und einsetzenden Regenerationsprozessen kann es nach Jahren oder Jahrzehnten zur Entstehung von Leberfibrose, Zirrhose und einem hepatozellulären Karzinom (HCC) beim chronisch Infizierten kommen (Chisari et al., 2010; Stauffer et al., 2012). Etwa 3 bis 8% von ihnen entwickeln ein HCC (El-Serag and Rudolph, 2007; Fattovich, 2003).

Zahlreiche Studien konnten häufige Insertionen von Teilen der HBV-DNA in das zelluläre Genom bei Hepatozyten und Leberkrebszellen von chronisch Infizierten beobachten; teilweise in Genen, die in Signaltransduktionswegen, für die Zellteilung oder Apoptose (wie z.B. p53,  $\beta$ -Catenin) eine Rolle spielen (Ferber et al., 2003; Matsubara and Tokino, 1990; Minami et al., 2005; Murakami et al., 2005; Paterlini-Brechot et al., 2003; Saigo et al., 2008; Shafritz et al., 1981; Su et al., 2008; Yaginuma et al., 1987). Integrationen von HBV-DNA können zur Instabilität der Wirtszell-Chromosomen führen (Hsieh et al., 2011b), in dessen Folge es zu invertierten Duplikationen, Deletionen und chromosomalen Translokationen kommen kann (Tan, 2011). Auch der HBV-Genotyp und mutierte HBV-Varianten sind mit der Pathogenese eines progressiven Krankheitsverlaufs und HCC assoziiert (Fan et al., 2011; Fang et al., 2008b; Fang et al., 2008a; Kuang et al., 2004; Kusakabe et al., 2011; Tanaka et al., 2006; Yang et al., 2008; Yuan et al., 2009). Epigenetische Modifikationen, wie Hypo- und Hypermethylierungen

von Tumor-Suppressor-Genen wurden in Leberkrebszellen von HBV-Patienten vermehrt gefunden (Li et al., 2004; Su et al., 2008). Dem HBx-Protein scheint hierbei auch eine Rolle zuzukommen (Park et al., 2007). Zudem sind die transkriptionellen Transaktivator-Aktivitäten des HBx, der C-terminal verkürzten PräS2-Domäne des MHBs und der PräS-Domäne des LHBs mit der HCC-Entstehung assoziiert (s. Kapitel 1.1.8 und 1.1.9). Eine höhere HCC-Rate bei Männern wird mit der stärkeren Stimulierung der HBsAg-Expression, bedingt durch die Bindung der aktivierten Glukokortikoidrezeptoren an die GRE- (*Glucocorticoid-response-element*) Sequenzen im HBV-Genom, in Verbindung gebracht. Weiterhin wurde in chronisch HBV-Infizierten und HCC-Patienten ein höheres Maß an oxidativem Stress und verringerte Konzentrationen an antioxidativen Faktoren gefunden (Duygu et al., 2012; Marra et al., 2011; Tasdelen et al., 2012), was zur Verstärkung der Fibrose und auch zur HCC-Entstehung beiträgt (Aravalli et al., 2013; Mormone et al., 2011).

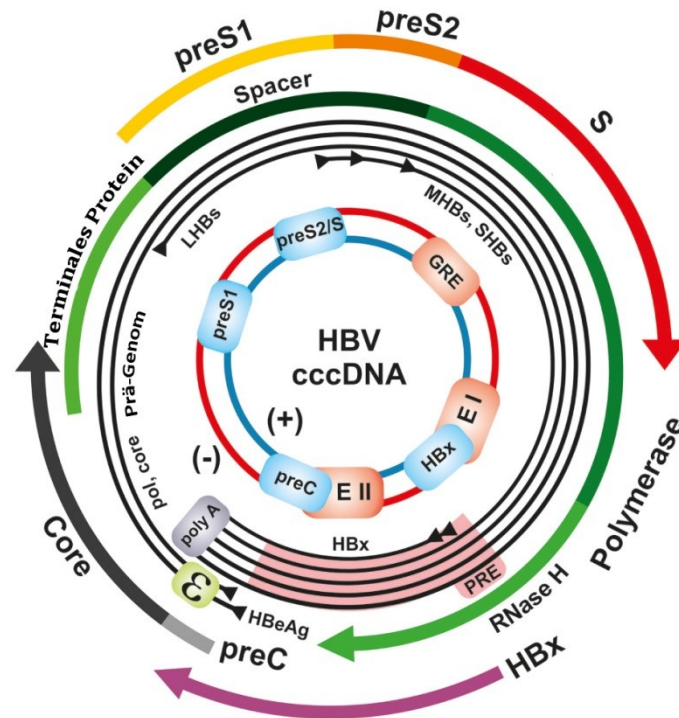
## 1.1.5 Genomaufbau und Transkripte

### 1.1.5.1 Genomaufbau

Das HBV besitzt im Vergleich zu anderen DNA-Viren (z.B. Adeno- und Herpesviren) ein sehr kleines Genom. Durch die Nutzung von teilweise überlappenden offenen Leserahmen (ORF) und Expression verschiedener Proteine innerhalb eines ORF's (über mehrere Start-Kodons) besitzt es jedoch eine sehr hohe Informationsdichte.

Die zirkuläre DNA liegt teilweise doppelsträngig vor. Der komplette sog. Negativstrang (ca. 3,1 – 3,3 kb, abhängig vom Genotyp) ist vollständig proteinkodierend (Summers et al., 1975). Das 5'- und 3'-Ende dieses Stranges weist eine terminale Redundanz von ca. 8-10 Nukleotiden auf. Mit dem 5'-Ende ist die Primer-Domäne der HBV-Polymerase kovalent verbunden (Gerlich and Robinson, 1980). Der nichtkodierende und unvollständige Plusstrang ist über komplementäre Basenpaarung mit dem Negativstrang verbunden. Typisch für ihn ist ein in der Länge variables 3'-Ende (ca. 1,7 – 2,8 kb), mit dem nichtkovalent ein weiteres Molekül der viralen Polymerase assoziiert ist. Sein 5'-Ende trägt eine 17 bis 19 bp lange 5'-gecappte RNA-Primersequenz aus der prägenomischen RNA (pg-RNA) (Seeger et al., 1986). Negativ- und Plusstrang weisen mit sich und untereinander keine kovalente Nukleotidverbindung auf. Die Zirkularität des Genoms ergibt sich durch kohäsive Basenpaarung von ca. 240 bp zwischen den 5'-Enden beider Stränge. In diesem Bereich

befindet sich die o.g. terminale Redundanzsequenz, wodurch sich an dieser Stelle eine sehr kurze Dreisträngigkeit des Genoms ausbildet (Will et al., 1987). Weiterhin befinden sich in diesem Bereich zwei 11 bp lange direkte Wiederholungssequenzen (*direct repeats*) DR1 und DR2, die eine sehr wichtige Rolle bei der Virusreplikation einnehmen. Weitere Sequenzen wie die Polyadenylierungssequenz sowie cis-aktive Sequenzen wie z.B. das für die Replikation essentielle Epsilon ( $\epsilon$ )-Signal bestehen. Der Negativstrang beinhaltet vier ORF's, die für folgende HBV-Proteine kodieren: 1) Kapsid-Protein (HBc) oder auch HBcAg genannt und seine sezernierte Form das HBe-Protein bzw. HBeAg; 2) Polymerase (P-Protein) mit den verschiedenen Domänen / Funktionen (Primer (TP), Spacer, Reverse Transkriptase, DNA-Polymerase/RNaseH); 3) Oberflächenproteine (HBs) und 4) X-Protein (HBx). Die Expression der Proteine wird durch mind. vier Promotoren, zwei Enhancer (Tang et al., 2001), ein *Glucocorticoid responsive element* (GRE) und das *Negative regulating element* (NRE) reguliert. Diese bewirken über die Bindung von ubiquitären (z.B. *nuclear factor 1* (NF1), *specificity protein 1* (Sp1), *activator protein 1* (AP1) und leberspezifischen Transkriptionsfaktoren (z.B. CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine (C/EBP), *hepatocyte nuclear factor* (HNF) 1, 3, 4 und 6) eine hepatozyten- und differenzierungsspezifische Transkription und Replikation (Moolla et al., 2002).



**Abbildung 1: Genom-Struktur des Hepatitis B Virus (HBV)**

Die doppelsträngige HBV cccDNA enthält Promotoren (blau), Transkriptionsverstärker (E I, E II; *glucocorticoid-response-element* (GRE), orange) zur Expression der vier offenen Leserahmen (ORF). Die spezifischen Transkripte (schwarze Kreise) sind 5'-gecappt und haben ein gemeinsames polyadenyliertes Ende (poly A). Während der Genom-Replikation werden Boten-RNAs (mRNA) mit Überlänge gebildet (präRNA), die in Nukleokapside verpackt und in DNA umgeschrieben oder in Kapsidproteine (*Core*, schwarz) und HBV-Polymerase (grün) translatiert werden. Eine andere Überlängen-mRNA wird zur Translation des *preC/Core* Proteins verwendet, das im weiteren Verlauf in das sekretierte HBV e-Antigen (HBeAg) umgewandelt wird. Die HBV-Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs und das HBx-Protein werden von subgenomischen mRNAs translatiert. ε (Enkapsidierungssignal) in der präRNA; PRE (Posttranskriptionelles Regulatorelement). Weitere Details im Fließtext. Modifiziert aus „The Molecular Virology of Hepatitis B Virus“, (Glebe and Bremer, 2013).

### 1.1.5.2 Transkripte

Die o.g. vier offenen Leserahmen (ORF) werden durch die zelleigene RNA-Polymerase II zur Transkription in verschiedenen Leserastern abgelesen. Die Transkripte haben ein unterschiedliches 5'-, aber das gleiche 3'- Ende. Sie besitzen wie zelluläre RNA alle eine 5'-Cap-Struktur und sind am 3'-Ende polyadenyliert (Ganem and Varmus, 1987). Splicing-Stellen sind zwar vorhanden, werden aber nicht zur Produktion infektiöser Viren benötigt. Das posttranslatorische regulatorische Element (PRE) reduziert das RNA-Splicing und fördert über zelluläre Transportfaktoren den mRNA-Transport ins Zytoplasma (Huang and Liang, 1993). Mit etwa 3,5 kb ist die prä-Kapsid-RNA das längste Transkript und dient der Translation des



HBeAg. Die prägenomische mRNA (pgRNA) ist mit ca. 3,3 kp etwas kleiner und umfasst das gesamte Genom plus einer terminalen Redundanz von ca. 120 bp am 3'-Ende, welche zusätzliche Sequenzelemente enthält, die wichtig für die Replikation sind (Beck and Nassal, 2007). Die pgRNA hat zwei wichtige Funktionen: Zum einen dient sie der Translation des HBV-*Core*-Proteins (HBcAg) und der viralen Polymerase, zum anderen als Vorlage bei der reversen Transkription während der Replikation. Für Letzteres spielt die am 5'-Ende der pgRNA befindliche Haarnadelschleife (*Epsilon signal*) als Verpackungssignal eine wichtige Rolle. Die Expression der Oberflächenproteine und des HBx-Proteins erfolgt an kleineren Transkripten. Das große Oberflächenprotein (LHBs) wird von einer 2,4 kb langen subgenomischen RNA translatiert, das mittlere (MHBs) und kleine (SHBs) Oberflächenprotein von zwei etwa 2,1 kb großen RNA's und das HBx-Protein von einer RNA mit 0,7 kb Länge.

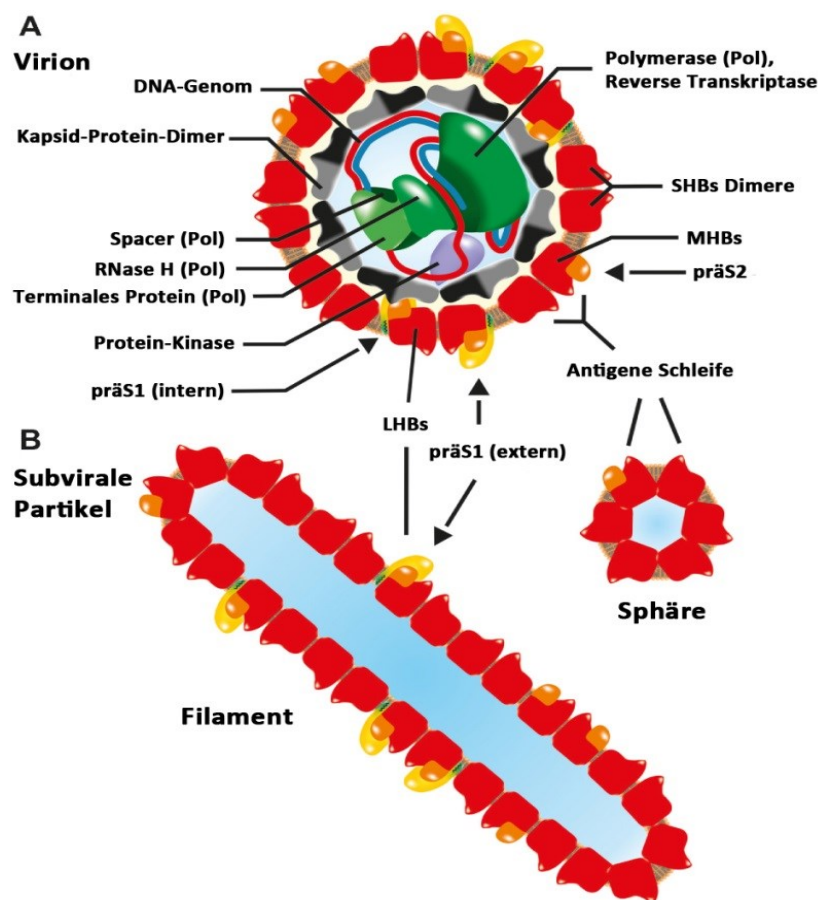
### 1.1.6 Virusmorphologie

Das Hepatitis B Virus gehört zu den umhüllten Viren. Es erscheint im Kryo-Elektronen-Mikroskop unter nativen Bedingungen als sphärisches Partikel mit einem Durchmesser von 52 nm (Dryden et al., 2006). Im wasserfreien Zustand ist es mit ca. 42 – 47 nm etwas kleiner (Dane et al., 1970). Die Virushülle besteht aus den drei Oberflächenproteinen, die in unterschiedlichen Anteilen in eine von der Wirtszelle abstammenden Lipiddoppelschicht eingebettet sind (Heermann et al., 1984; Seitz et al., 2007). Das SHBs ist am stärksten vertreten. Das MHBs macht nur ca. 5% und das LHBs nur ca. 1% der Oberflächenproteine aus.

Die Virushülle umgibt das ikosaedrische Kapsid, das einen Durchmesser von ca. 36 nm besitzt. Es besteht aus 120 HBc-Dimeren mit einer T4-Symmetrie. Teilweise existieren auch Kapside mit 90 HBc-Dimeren mit einer T3-Symmetrie, die mit 32 nm kleiner sind. Die Kapsidproteine assemblieren eigenständig zu Nukleokapsiden über ihre sog. *assembly*-Domäne (N-terminale 1- 151 AS). Die Protamin-Domäne (C-terminale 34 AS), die reich an Arginin-Resten ist, ist essentiell für das Verpacken der pgRNA und der viralen Polymerase (Gallina et al., 1989; Zlotnick et al., 1997).

Innerhalb des Kapsids befindet sich das partiell doppelsträngige DNA-Genom zusammen mit der Polymerase sowie der zellulären Proteinkinase C und Chaperonen. Neben den infektiösen Viren werden nichtinfektiöse subvirale Partikel exprimiert, die nur aus den in die

Lipiddoppelschicht eingebetteten Oberflächenproteinen bestehen und in einem bis zu  $10^4$  fachen Überschuss gebildet werden. Die rundlichen sphärischen Partikel haben einen Durchmesser von ca. 22 nm und enthalten als Virusproteine hauptsächlich SHBs und in geringen Mengen MHBs. Die filamentären Partikel besitzen bei etwa gleichem Durchmesser eine unterschiedliche Länge und bestehen fast ausschließlich aus SHBs und MHBs. In beiden Partikelformen ist LHBs nur in geringen Mengen (Filamente) bis sehr geringen Mengen (Sphären) vertreten.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Hepatitis B Virus und der subviralen Partikel**

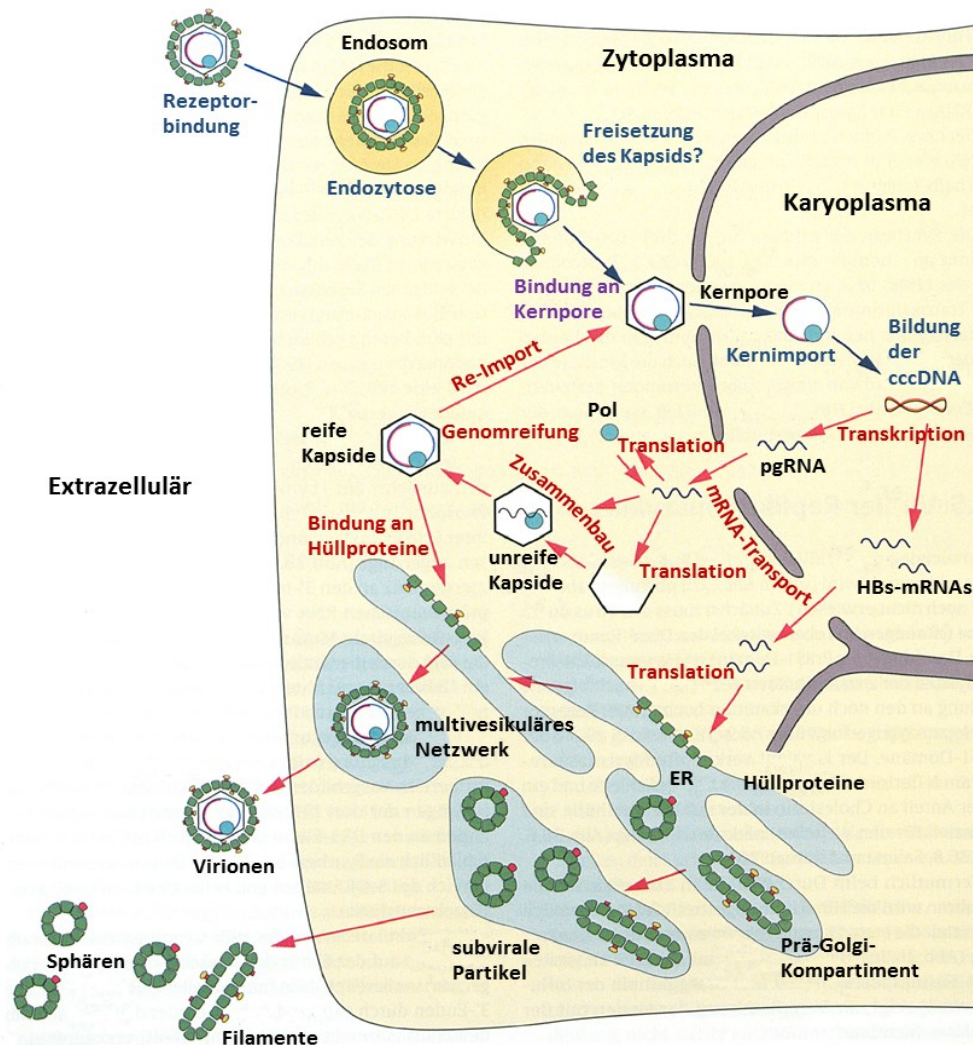
(A) Das Virion enthält das partiell doppelsträngige DNA-Genom assoziiert mit der viralen Polymerase und seinen drei katalytischen Domänen (grün). Innerhalb des Nukleokapsids, bestehend aus 120 Kapsid-Protein-Dimeren, befindet sich auch eine zelluläre Proteinkinase (lila). Die Virushülle besteht aus den drei HBV-Oberflächenproteinen SHBs, MHBs und LHBs, die in eine vom ER stammende Lipidschicht (braun) eingelagert sind. Die S-Domäne (rot) befindet sich in allen Oberflächenproteinen, die präS2-Domäne (orange) im MHBs und LHBs und die präS1-Domäne (gelb) nur im LHBs. (B) Die nicht-infektiösen subviralen Partikel (rundliche Sphären, längliche Filamente) enthalten kein Nukleokapsid und unterscheiden sich in ihrem LHBs-Anteil. Weitere Details im Fließtext. Modifiziert aus „The Molecular Virology of Hepatitis B Virus“, (Glebe and Bremer, 2013).

## 1.1.7 Viraler Lebenszyklus des Hepatitis B Virus

### 1.1.7.1 Zelluläre Bindung, Aufnahme und Transport von HBV und cccDNA-Bildung

Die initiale Bindung und Anreicherung des HBV erfolgt mit niedriger Affinität an Heparansulfat-Proteoglykane auf der Zellmembran der Hepatozyten (Leistner et al., 2008; Schulze et al., 2007; Sureau and Salisse, 2013). Die Anheftung wird möglicherweise durch zusätzliche, aber nicht essentielle Faktoren wie z.B. humanes Serumalbumin, Fibronectin und Transferrin unterstützt (Budkowska et al., 1995; Gagliardi et al., 1994; Machida et al., 1984). Die hochaffine Bindung erfolgt danach durch die extern ausgerichtete präS1-Domäne des LHBs mit hoher Affinität an den spezifischen Rezeptor NTCP (*sodium taurocholate cotransporting polypeptide*) (Yan et al., 2012). Die ersten 75 AS und die Myristylierung an Gly2 von präS1 sind für die Rezeptorbindung essentiell (Blanchet and Sureau, 2007; Bruss et al., 1996b; Gripon et al., 1995). Die TM1-Domäne sowie die antigene Haarnadelschleife zwischen TM2 und TM3 sind ebenfalls entscheidend für die initialen Infektionsschritte (Lepere-Douard et al., 2009; Sureau and Salisse, 2013). Für den Eintritt in die Zelle wird für HBV wie bei HCV eine Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle nach Rezeptor-Bindung angenommen (Blanchard et al., 2006; Cooper and Shaul, 2006; Huang et al., 2012). Die TM1-Domäne, die allgemeinen viralen Fusionsdomänen ähnelt, könnte danach die pH-unabhängige Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma durch eine Fusion mit der Endosomenmembran bewirken (Berting et al., 1995; Lepere-Douard et al., 2009). Die genauen Mechanismen sind allerdings weitestgehend noch unverstanden. Das Nukleokapsid wird danach über Mikrotubuli aktiv zum Zellkern transportiert (Rabe et al., 2006). Über die im phosphorylierten C-terminalen Bereich des HBcAg liegende exponierte Kernlokalisierungssequenz (NLS) wird in einer Importin- $\alpha/\beta$ -vermittelten Weise der Weitertransport in die Kernporen bewerkstelligt (Kann et al., 1999). Nach der Destabilisierung des Nukleokapsids findet die Freisetzung des viralen Genoms in das Karyoplasma statt (Rabe et al., 2003). Nach Abspaltung des am Negativstrang kovalent gebundenen P-Proteins und des RNA-Oligonukleotids am Plusstrang wandelt die zelluläre DNA-Polymerase mit Hilfe von zellulären Faktoren die partiell doppelsträngige, nicht ligierte *relaxed circular* DNA (rcDNA) des HBV in eine zirkuläre, kovalent geschlossene cccDNA (*covalently closed circular DNA*) um (Kock and Schlicht, 1993; Kock et al., 2010). Diese wird mit Histonen und anderen Proteinen komplexiert und liegt anschließend episomal im Zellkern in einer stabilen Minichromosom-ähnlichen Struktur vor (Bock et al., 1994). Eine Integration der viralen DNA

in die Wirtschromosomen ist im Gegensatz zu den Retroviren für den HBV-Lebenszyklus nicht notwendig. Zufällige Integrationen von subgenomischer viraler DNA sind jedoch häufig.



**Abbildung 3: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus (HBV)**

Nach Rezeptorbindung (NTCP) von HBV an einen Hepatozyten, vermutlich endozytotischer Aufnahme und Entfernung der HBV-Oberflächenproteine wird das Nukleokapsid über Mikrotubuli an den Zellkern transportiert. In der Kernpore zerfällt die Kapsidhülle und setzt das HBV-Genom frei. Nach Entfernung der viralen Polymerase wird es durch zelluläre Faktoren in eine kovalent geschlossene zirkuläre cccDNA umgewandelt und mit zellulären Histon- und anderen Proteinen als eine Art episomales Minichromosom umhüllt. Die zelluläre Polymerase II transkribiert davon die prä- und subgenomischen mRNAs (pgRNA und HBs-mRNAs), die ins Zytosol transportiert werden. Von letzteren werden am Endoplasmatischen Retikulum (ER) die drei HBV-Oberflächenproteine zur Umhüllung von reifen Nukleokapsiden bzw. zur Bildung und Sekretion von subviralen Partikeln translatiert. Zur viralen Replikation werden von der pgRNA die Kapsidproteine und virale Polymerase translatiert, die danach zusammen die pgRNA und zelluläre Proteine verpacken und ein unreifes Nukleokapsid bilden. Nach reverser Transkription und Genomreifung wird das nun reife Nukleokapsid entweder zum Kern zurückgeleitet und füllt den cccDNA Pool auf (Re-Import) oder wird mit den Oberflächenproteinen umhüllt und über multivesikuläre Partikel sekretiert. Die subvirale Partikel und das HBe-Protein (HBe nicht eingezeichnet) verlassen dagegen über den normalen Sekretionsweg (ER-Golgi) die Zelle. Das virale Regulatorprotein HBx wird nur geringfügig exprimiert und verbleibt intrazellulär (nicht eingezeichnet). Weitere Details im Fließtext. Modifiziert nach Schäfer S, Glebe D, Gerlich WH, 2010.

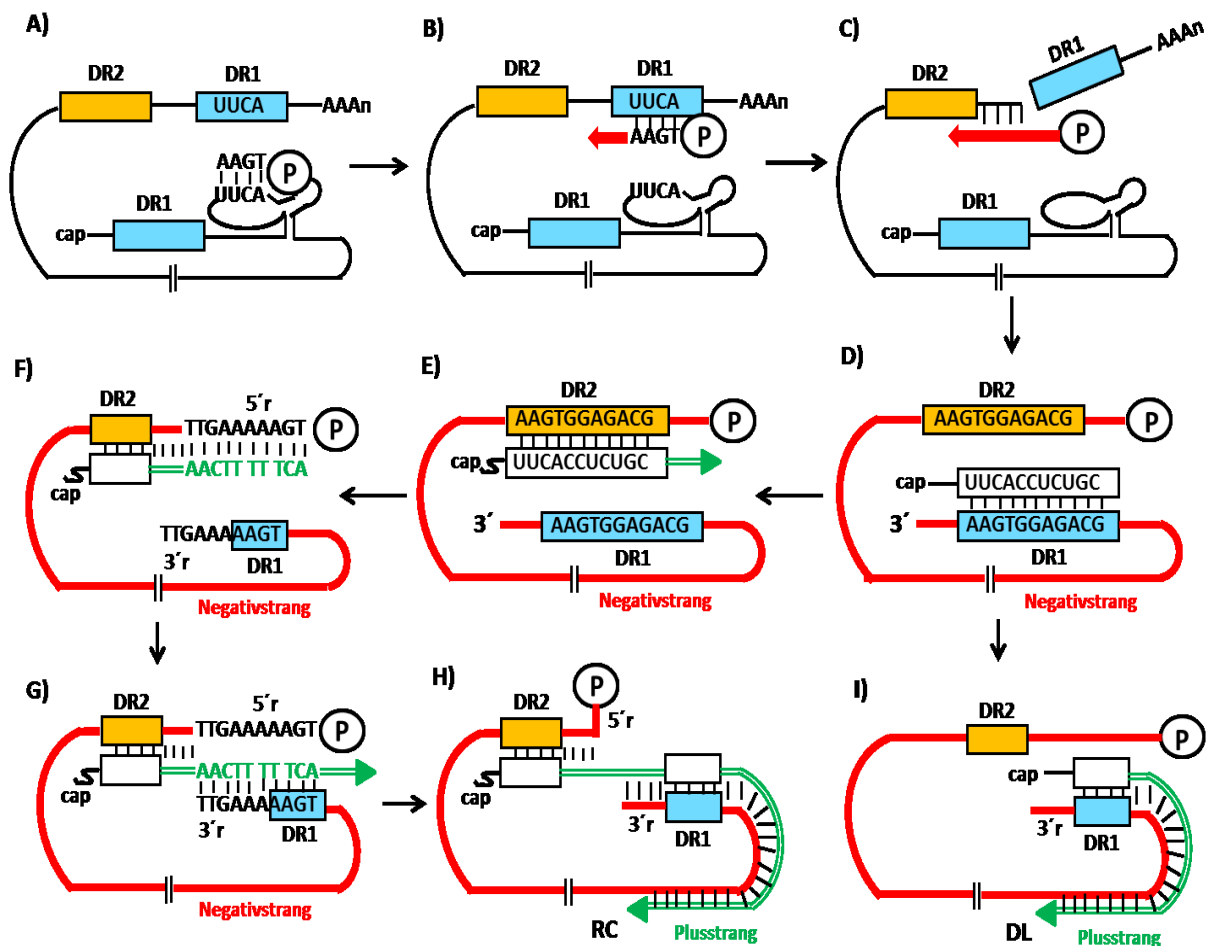
### 1.1.7.2 Replikation

Die im Zellkern persistierende cccDNA besitzt keinen Replikationsstartpunkt und wird daher ausschließlich über reverse Transkription und intrazellulären Re-Import vervielfältigt (Tuttleman et al., 1986).

Der Negativstrang der cccDNA dient als Matrize für die Transkription aller viralen mRNA's durch die zelluläre RNA-Polymerase II im Zellkern (Rall et al., 1983), die anschließend in das Zytoplasma exportiert werden. Ein *Splicing* erfolgt bei bis zu 10% der Transkripte, ist aber für die Translation der viralen Proteine nicht notwendig (Preiss et al., 2008; Rosmorduc et al., 1995). Die Translation von den Oberflächenproteinen LHBs, MHBs und SHBs sowie dem HBe-Protein findet an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt, die des HBc-Proteins, Polymerase und X-Proteins (HBx) dagegen an freien Ribosomen im Zytoplasma.

Von der prägenomischen RNA (pgRNA) werden die Kapsidproteine und die virale Polymerase translatiert (Will et al., 1987). Daneben dient pgRNA als Matrize für die Replikation des HBV-Genoms (Abb. 4). Die pgRNA enthält am 5'-Ende eine Sekundärstruktur, das sog. Epsilon ( $\epsilon$ )-Signal. Die Primer-Domäne der viralen Polymerase lagert sich daran mit Hilfe von Chaperonen (Hsp90, Hsp23) an und synthetisiert an die Hydroxylgruppe seines Tyrosins 63 etwa drei bis vier komplementäre DNA-Nukleotide mittels Reverser Transkription (Bartenschlager et al., 1990; Wang and Seeger, 1992; Wang and Seeger, 1993). Die Bildung des pgRNA/Polymerase -Komplexes induziert währenddessen den Zusammenbau der Kapsidproteine zu einem Nukleokapsid, in dessen der Komplex verpackt wird (Bartenschlager and Schaller, 1992). Das Verpacken und die nachfolgende DNA-Synthese ist abhängig von Phosphorylierungen der Kapsidproteine an bestimmten Serin-Resten (Gazina et al., 2000; Melegari et al., 2005). Die Polymerase mit dem kurzen DNA-Primer wird an die am 3'-Ende der pgRNA liegende komplementäre DR1-Wiederholungssequenz verschoben und synthetisiert vollständig den DNA-Negativstrang über Reverse Transkription mit der pgRNA als Vorlage (Nassal and Rieger, 1996; Wang and Seeger, 1993). Dabei wird die pgRNA über die RNaseH-Funktion der viralen Polymerase bis auf ein ca. 18 bp langes RNA-Oligonukleotid an ihrem 5'-Ende abgebaut (Loeb et al., 1991; Radziwill et al., 1990). Dieses enthält die DR1-Sequenz und wird zusammen mit der Polymerase an die am 5'-Ende des Negativstranges befindliche komplementäre DR2-Sequenz verschoben, wo es als Primer für die anschließende DNA-Plusstrangsynthese dient (Will et al., 1987). Die partielle Doppelsträngigkeit des HBV-Genoms ergibt sich hierbei aus der DNA-

Synthese von der DR2-Sequenz zum 5'-Ende des Negativstrangs. Daraufhin wird das 3'-Ende des Plusstrangs über eine ca. 8 bp lange komplementäre Nukleotidsequenz an das 3'-Ende des Negativstranges verlagert (Will et al., 1987). Von dort erfolgt die zum Negativstrang komplementäre, aber unvollständige Synthese des Plusstrangs (Landers et al., 1977).



**Abbildung 4: Reverse Transkription des Hepatitis B Virus**

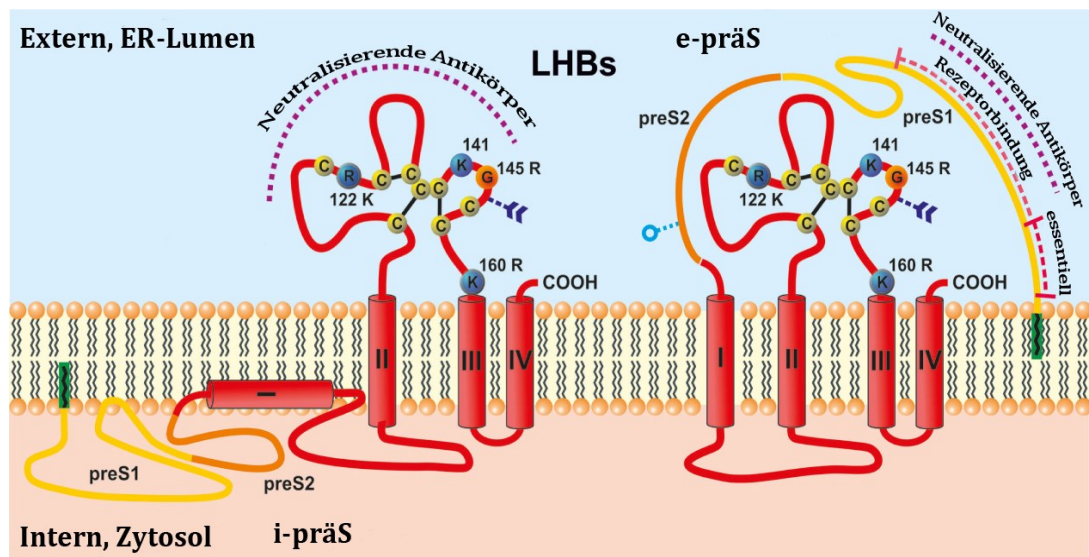
(A) Initiierung der Negativstrang-DNA-Synthese. Anlagerung der Primer-Domäne der viralen Polymerase (Pol) an die ε-Signalstruktur der pgRNA und Synthese von ca. vier DNA-Nukleotiden über reverse Transkription. (B) Verlagerung des Tetra-Nukleotids und viralen Polymerase an einen komplementären Bereich der DR1-Sequenz am 3'-Ende der pgRNA und Start der Negativstrang-DNA-Synthese (dicke rote Linie). (C) Elongation der Negativstrang-DNA und Degradation der pgRNA durch RNase H-Aktivität der Pol. (D) Vervollständigung der Negativstrang-DNA und Verbleib eines ca. 18 bp langes gecapptes RNA-Oligonukleotids am 3'-Ende. (E) Verlagerung des Oligonukleotids von der DR1- der Negativstrang-DNA an die komplementäre DR2-Sequenz und Start der Plusstrang-DNA-Synthese (grüne Doppellinie), bis zum 5'-Ende der Negativstrang-DNA. (F) Zirkularisierung: Durch Anlagerung der DR1-Sequenz der Negativstrang-DNA an das komplementäre Ende der Plusstrang-DNA, (H) Vervollständigung der Plusstrang-DNA zu einer relaxten zirkulären Form (RC) des Genoms. (I) Bei keiner Oligonukleotid-Verlagerung (siehe D) zu E)), wird eine doppelsträngige lineare Form (DL) des Genoms synthetisiert. Modifiziert nach "cis-Acting sequences that contribute to the synthesis of relaxed-circular DNA of human hepatitis B virus" (Liu et al., 2004).

Nach der Replikation des viralen Genoms innerhalb der Nukleokapside, werden diese mit den viralen Oberflächenproteinen umhüllt und die fertigen Viren über Multivesikuläre Körperchen (*multivesicular bodies*) von der Wirtszelle freigesetzt (Lambert et al., 2007). Nicht umhüllte Nukleokapside werden dagegen intrazellulär zu den Kernporen zurückgeleitet und füllen unabhängig einer erneuten Infektion den Pool an cccDNA (ca. 10 – 50 Genome) auf (Levrero et al., 2009). Die subviralen Partikel werden über den konstitutiven Sekretionsweg via Golgi-Apparat bzw. ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) sekretiert (Lambert et al., 2007).

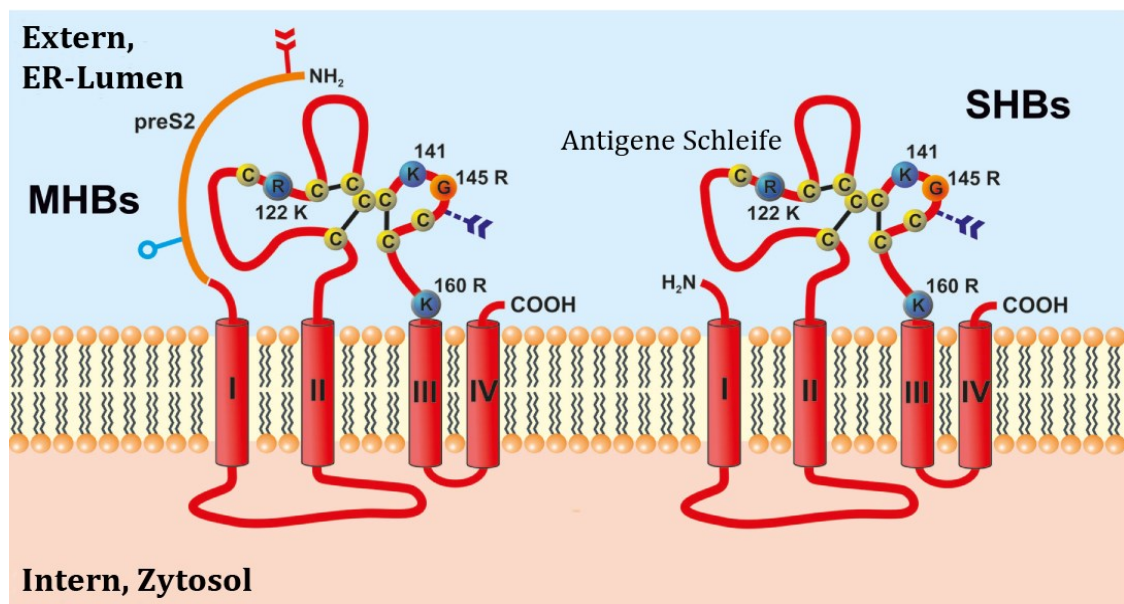
### 1.1.8 HBV-Oberflächenproteine

Sowohl das Hepatitis B Virion als auch die subviralen Partikel bestehen aus den drei HBV-Oberflächenproteinen. Das kleinste von ihnen wird als SHBs, das mittelgroße als MHBs und das große als LHBs bezeichnet. Sie werden ausgehend von drei verschiedenen Startkodons innerhalb eines Leserahmens (ORF) im gleichen Leseraster kodiert. Da sie ein gemeinsames Stoppkodon verwenden, besitzen sie alle das gleiche C-terminale Ende. Somit ergibt sich ihre unterschiedliche Länge nur aus den verschiedenen langen N-terminalen Proteindomänen. Nach ihrer Translation am rauhen Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle (Bruss, 2007) erfolgt eine teilweise unterschiedliche Proteinmodifizierung. Sie sind integrale Multipass-Membranproteine, da sie über ihre gemeinsame S-Domäne mehrfach in der ER-Membran verankert sind (Eble et al., 1987) (Abb. 5). Das Immunsystem ist in der Lage gegen jedes Oberflächenprotein neutralisierende Antikörper zu bilden. Nachfolgend werden sie detailliert beschrieben.

**A**



**B**



**Abbildung 5: Membran-Topologie der HBV-Oberflächenproteine (HBs)**

(A) Das große HBs Protein (LHBs), bestehend aus vermutlich vier Transmembran (TM)-Domänen (I – IV) und die duale Topologie seiner präS1- und präS2-Domänen (i-praS: Intern zytosolisch; e-praS: Extern zytosolisch). Die S-Domäne enthält die externe antigene Schleife mit dreidimensionaler Konformation durch Disulfidbrückenbindungen von acht konservierten Cysteinresten (C; gelb). Die serologischen Subtyp-Determinanten K/R (d/y) an Position 122 und K/R (w/r) an Position 160 innerhalb der antigenen Schleife sowie positiv geladene AS an Position 122 (R) und 141 (K) sind eingezeichnet. Die AS-Mutation an Position 145 (G145R) stellt eine der häufigsten Immun-Fluchtmutanten dar. Die N-terminale Glykosylierungs-Position an AS 146 innerhalb der S-Domäne sowie B-Zell-Epitope für neutralisierende Antikörper innerhalb der antigenen Schleife und der präS1-Domäne sind angezeigt. (B) Die präS2-Domäne des MHBs wird im ER-Lumen N-glykosyliert an AS 4 und O-glykosyliert an T37 (außer bei Genotyp A). Weitere Details im Fließtext. Modifiziert aus „The Molecular Virology of Hepatitis B Virus“, (Glebe and Bremer, 2013).



### 1.1.8.1 Das kleine Oberflächenprotein (SHBs)

Das SHBs ist das Hauptoberflächenprotein (*major surface protein*) und ist sowohl im Virus als auch in den subviralen Partikeln im Vergleich zum MHBs und LHBs am stärksten vertreten. Eine Besonderheit von SHBs ist, dass es ohne weitere virale Produkte in der Lage ist, aus mehreren seiner Moleküle im ERGIC-Kompartiment subvirale Partikel zu bilden, die von Zellen sekretiert werden (Huovila et al., 1992; Persing et al., 1985). Diese Eigenschaft wird seit den frühen 1980er Jahren für die industrielle Produktion eines effizienten und sicheren HBV-Impfstoffes in Hefezellen genutzt (Dubois et al., 1980; McAleer et al., 1984).

SHBs wird von einer ca. 2,1 kb langen mRNA transkribiert und umfasst 226 Aminosäuren (AS) (Abb. 6 A). Die Transkription wird vom PräS<sub>2</sub>/S-Promoter gesteuert, der nicht leberspezifisch ist (Pourcel et al., 1982). Etwa jedes zweite SHBs-Molekül ist zur Hälfte an einem Asparaginrest (Asn146) N-glykosyliert (Peterson et al., 1982), wodurch sich Molekulargewichte von 24 bzw. 27 kDa ergeben. SHBs wird während der Translation über mind. zwei Transmembran (TM)-Domänen in die ER-Membran integriert. Computerbasierte Analysen sagen vier TM-Domänen voraus, die über zwei zytosolische und eine im ER-Lumen gelegene hydrophile Schleife miteinander verbunden sind (Berting et al., 1995) (Abb. 5 B). Für einen Bereich (AS 56 – 80) in der zytosolischen Schleife (AS 23 – 79) wurde eine effiziente Bindung an das HBV-Kapsid nachgewiesen (Poisson et al., 1997). In der externen Schleife zwischen TM2 und TM3 (AS 99 – 161) liegt die antigene Determinante A (~ AS 121 – 147), die das Hauptepitop für neutralisierende Antikörper darstellt. Sie ragt im Virus und in den subviralen Partikeln nach außen. Die externe Schleife hat acht konservierte Cystein-Reste, die über intra- und intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und eine dreidimensionale Struktur bewirken. Die verschiedenen Serotypen von HBV werden durch den Austausch von AS Lys/Arg an Position 122 (d/y) und an AS 160 Lys/Arg (w/r) innerhalb der externen Schleife festgelegt. Die positiv geladenen AS Arg (122) und Lys (141) tragen während der Infektion hauptsächlich zur Interaktion mit den negativ geladenen Heparinsulfat-Proteoglykanen auf der Plasmamembran von Hepatozyten bei (Leistner et al., 2008; Sureau and Salisse, 2013). Ein AS-Austausch an Position 145 (Gly/Arg) stellt eines der häufigsten Mutationen dar, die einen sog. *immune escape* des Virus bewirken.

### 1.1.8.2 Das mittlere Oberflächenprotein (MHBs)

Die Funktion des MHBs ist noch nicht bekannt. Obwohl es in HBV und den anderen Orthohepadnaviren hoch konserviert ist, scheint es weder für die Virenssekretion, Bildung von subviralen Partikeln noch für die Infektiosität von HBV oder HDV nötig (Glebe and Urban, 2007). Zudem fehlt MHBs in Avihepadnaviren vollständig. Als Bestandteil von LHBs spielt die präS2-Domäne jedoch eine wichtige Rolle beim Nukleokapsid-Zusammenbau des HBV (Ni et al., 2010). Weiterhin wurde eine Bindung der präS2-Domäne an polymeres humanes Albumin gezeigt, was möglicherweise die initiale Viren-Anheftung an Hepatozyten unterstützt (Machida et al., 1984; Persing et al., 1985).

Für C-terminal verkürzte MHBs-Formen (MHBs(t)), die durch Deletionen infolge von Virus-DNA-Integrationen in das zelluläre Genom entstehen können (insb. bei HCC), wurden transkriptionelle Aktivatorfunktionen nachgewiesen (Caselmann et al., 1990; Kekule et al., 1990). Die Aktivatorfunktionen basieren auf der zytosolischen Orientierung der präS2-Domäne (Hildt et al., 2002). MHBs(t) löst eine Proteinkinase C (PKC)-abhängige Aktivierung des c-Raf-1/Erk2 Signalwegs aus, das wiederum eine Voraussetzung für die MHBs(t)-abhängige Aktivierung von AP-1 and NF- $\kappa$ B und tumorfördernd ist (Hildt et al., 2002).

Das MHBs wird ebenso wie das SHBs von einer ca. 2,1 kb langen mRNA transkribiert und umfasst 281 AS. Seine Transkription wird wie beim SHBs von einem nicht leberspezifischen PräS2/S-Promoter reguliert (Pourcel et al., 1982). MHBs besteht aus der SHBs-Sequenz (S-Domäne) und einer weiteren 55 AS langen präS2-Domäne am N-terminalen Ende (Abb. 5 B und 6 A). Die Topologie der S-Domäne ist dem des SHBs identisch (Abb. 5). Die präS2-Domäne wird bei der Translation in das ER-Lumen transloziert und ist immer an Asn4 N-glykosyliert sowie auch teilweise an Thr37 O-glykosyliert (außer bei Genotyp A) (Schmitt et al., 1999; Schmitt et al., 2004). Weiterhin ist es wie SBHs an der S-Domäne (hier Asn201) teilweise glykosyliert. Daher ergeben sich je nach Glykosylierungsgrad unterschiedliche Molekulargewichte von etwa 30, 33 und 36 kDa.

### 1.1.8.3 Das große Oberflächenprotein (LHBs)

Das LHBs wird von einer 2,4 kb mRNA transkribiert und besteht je nach Genotyp aus 389 bis 401 Aminosäuren (AS). Seine Transkription wird vom PräS1-Promoter gesteuert, der im Vergleich zum PräS2/S-Promoter zwar schwach, aber hoch leberspezifisch ist (Will et al.,

1987). LHBs besteht aus der S-, präS2- und der N-terminalen präS1-Domäne, wobei letztere je nach Genotyp aus 108, 118 oder 119 AS besteht. In seiner unglykosylierten Form beträgt das Molekulargewicht 39 kDa und 42 kDa bei einer Glykosylierung am Asparagin wie in der S-Domäne des SHBs. Weitere LHBs-Isoformen mit 48 und 51 kDa, bedingt durch zusätzliche N-Glykosylierungen, sind bekannt (Lambert and Prange, 2007). Optional kann es noch, an der gleichen Stelle wie das MHB, teilweise O-glykosyliert sein (Abb. 6 A). Eine für die Infektiösität essentielle Modifizierung stellt die N-terminale Myristylierung an Gly2 dar (Bruss et al., 1996b; Gripon et al., 1995). Zudem ist sie an der Retention des LHBs in der Zelle beteiligt (Prange et al., 1991). Jedoch auch ohne Myristylierung wird LHBs bei gleichzeitiger Abwesenheit anderer Virusproteine im ER (Kuroki et al., 1989) bzw. in einer Zwischenregion von ER und Golgi-Apparat (ERGIC) (Xu et al., 1997a) zurückgehalten.

Eine Besonderheit von LHBs liegt in der dualen Topologie der präS1- und präS2-Domäne im ER als auch im späteren Virus (Prange and Streeck, 1995) (Abb 5 A). Während der Translation liegen diese Domänen zunächst vollständig auf der zytosolischen Seite (*i-preS*-Topologie). Dies ist notwendig für den Zusammenbau der Kapsidproteine, Replikation und Umhüllung der Viren (Bruss and Vieluf, 1995; Bruss, 1997; Dyson and Murray, 1995). Eine Bindung des Chaperons Hsc70 an eine zytosolische Ankerdomäne (CAD) (s. Abb. 6 B) der präS1-Domäne ist für die zytosolische Ausrichtung verantwortlich (Lambert and Prange, 2003; Prange et al., 1999). Eine Domäne (AS 92 – 108, Genotyp D) am Übergang von präS1 zu präS2 ist essentiell für die Umhüllung der reifen Nukleokapside (Bruss, 1997). Etwa die Hälfte der LHBs-Proteine nimmt posttranslational die *e-preS*-Topologie ein. Es wird angenommen, dass das ER-Chaperon BiP zusammen mit einer TM2-Region der S-Domäne des LHBs an der Translokation der präS-Domänen in das ER-Lumen beteiligt ist (Awe et al., 2008; Lambert and Prange, 2001; Lambert et al., 2004). Diese Topologie ist unabdingbar für die Infektiösität der Viren, da dadurch die präS1-Domäne, welche die spezifischen Rezeptorbindungsstellen enthält, auf den Viren nach außen gerichtet vorliegt. Erst 2012 wurde der spezifische HBV-Rezeptor NTCP (*Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide*) auf Hepatozyten identifiziert (Yan et al., 2012).

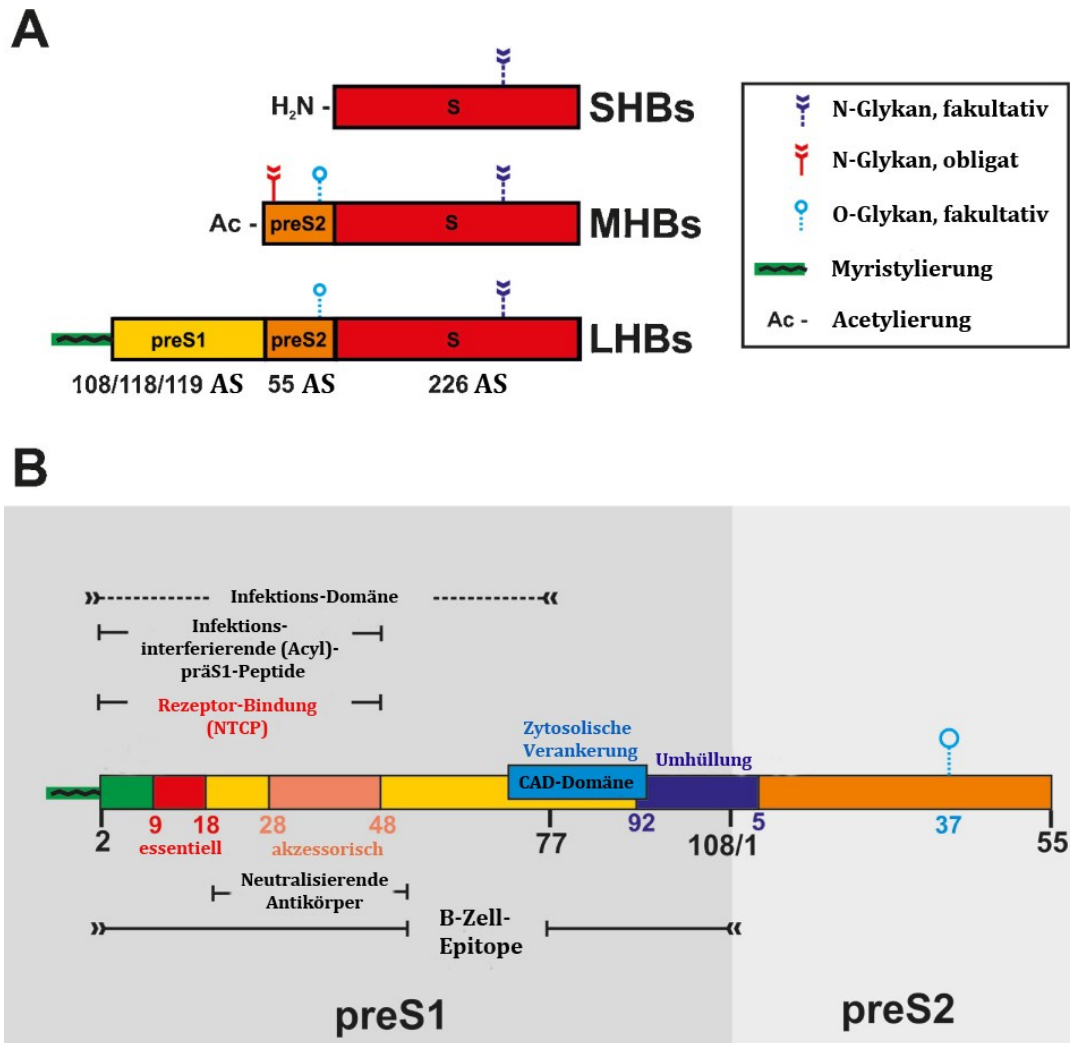
Durch Mutationsanalysen wurde festgestellt, dass die N-terminalen 75 AS der präS1-Domäne für die Infektion essentiell sind (Blanchet and Sureau, 2007). Den ersten 48 AS (essentiell AS 9 – 18, akzessorisch 28 - 48) wird eine Rezeptorbindungsaktivität zugewiesen, während die AS 49-75 bei der Infektion unterstützend wirken (Abb. 6 B, AS-Nummerierung für Genotyp D). Synthetische myristylierte präS1-Peptide (AS 2 – 48) sind bereits bei einstelligen nanomolaren Konzentrationen in der Lage, eine *in vitro* HBV-Infektion effektiv zu verhindern

(Glebe et al., 2005). Für LHBs wurden ebenso wie für MHBs(t) transkriptionelle Aktivatorfunktionen nachgewiesen, da etwa die Hälfte der präS1/S2-Domänen im Zytosol liegen. Damit kommt es wie beim MHBs(t) zu einer PKC-abhängigen Aktivierung des c-Raf-1/Erk2-Signalwegs mit nachfolgender Aktivierung von AP-1 and NF- $\kappa$ B, welche tumorfördernd sind (Hildt et al., 1996; Hildt et al., 2002). Durch Deletionen innerhalb der präS1/2-Domäne des LHBs wurde oxidativer und ER-Stress sowie DNA-Schädigungen in Hepatozyten induziert (Hsieh et al., 2004; Wang et al., 2003).

Im Gegensatz zu SHBs und MHBs, kann LHBs alleine keine subviralen Partikel (SVP) bilden und wird ohne SHBs und MHBs nicht sekretiert (Huovila et al., 1992; Ueda et al., 1991). Stattdessen wird es innerhalb des ER's bzw. ERGIC in Form von intraluminalem Partikeln zurückgehalten (Chisari et al., 1987; Molnar-Kimber et al., 1988; Nemeckova et al., 1994; Ou and Rutter, 1987; Persing et al., 1986; Xu et al., 1997a).

LHBs interagiert mit SHBs und Nukleokapsiden und kann dadurch eine dosisabhängige Inhibierung der Partikel- und Virenssekretion bewirken (Bruss and Ganem, 1991; Bruss et al., 1996a; Clayton et al., 2001; Persing et al., 1986). So führte die Überproduktion von LHBs in für HBs-Proteine transgenen Mäusen zu einer verminderten Sekretion von HBsAg ins Serum und somit zu einer toxischen Akkumulierung von HBsAg und LHBs im ER der Hepatozyten (Chisari et al., 1986). Die Folge waren schwere Leberschädigungen (auch Zelltod von einzelnen Hepatozyten), sekundäre Entzündungsprozesse und Hepatokarzinogenese (Chisari et al., 1987, Churin et al., 2014). Andererseits steigerte eine intrazelluläre Akkumulierung von LHBs die Expression von SHBs und MHBs über die Aktivierung ihres PräS2/S-Promotors und könnte somit über SVP-Bildung eine vermehrte LHBs-Sekretion bewirken (Xu et al., 1997b).

Zusätzlich zu der o.g. Interaktion von LHBs mit Hsc70 und SHBs ist auch eine Interaktion mit dem Chaperon Calnexin beschrieben (Xu et al., 1997a).



**Abbildung 6: HBV-Oberflächenproteine (HBs)**

(A) Die drei HBs-Proteine sind aus drei Domänen aufgebaut, S (rot), präS2 (orange), präS1 (gelb). PräS1 kodiert je nach Genotyp für 108 bis 119 Aminosäuren (AS). Es ist N-terminal am Gly2 myristyliert und kommt nur in LHBs vor. Die präS2-Domäne ist 55 AS lang und beim MHBs N-terminal acetyliert (Ac). Die S-Domäne (S) kodiert für 226 AS. N- und O-Glykosylierungen w.o. angegeben. (B) Schematische Struktur der für die Virusbildung und -infektiosität essentiellen präS1- und präS2-Domänen von LHBs. Essentiell für die Umhüllung der reifen Nukleokapside ist eine Domäne am Übergang von präS1 (AS 92 – 108) und präS2 (AS 1 – 5) (lila). Die potentiell hochaffine Rezeptorbindungsstelle innerhalb der Infektions-Domäne von präS1 wird unterteilt in eine essentielle (AS 9 – 18) und akzessorische (AS 28 – 48) Domäne (rot, orange; Numerierung für Genotyp D). Infektions-interferierende myristylierte präS1-Peptide überlappen mit der vermeintlichen Rezeptorbindungs-Domäne. Die Signaldomäne (AS 2 – 8) zur Myristylierung von Gly2 von präS1 ist eingezeichnet (grün). Ebenso B-Zell-Epitope und Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper in präS1. Die CAD-Domäne ist für die zytosolische Ausrichtung der präS-Domänen von LHBs verantwortlich (blau). Weitere Details im Fließtext. Modifiziert aus „The Molecular Virology of Hepatitis B Virus“, (Glebe and Bremer, 2013).

### 1.1.9 Das X-Protein des Hepatitis B Virus

Das X-Protein (HBx) von HBV ist das kleinste HBV-Protein (17 kDa, 154 AS). HBx ist kein Struktur-, sondern ein Regulatorprotein mit multifunktionalen Eigenschaften. Es wirkt als Transaktivator von HBcAg (Reifenberg et al., 1999), SHBs (Rossner et al., 1990), HBV-Enhancer (Spandau and Lee, 1988) und HBV-Promotoren (Nakatake et al., 1993). Zudem transaktiviert es eine Vielzahl von zellulären Promotoren, die mit Karzinogenese im Zusammenhang stehen: c-Jun (Twu et al., 1993), *Yes-associated protein* (YAP) (Zhang et al., 2012), *Heat shock protein 90 $\alpha$*  (HSP90 $\alpha$ ) (Li et al., 2010), *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) (Liu et al., 2010), Cyclin D1 (Park et al., 2006) und *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Majano et al., 2001). Weiterhin aktiviert HBx zahlreiche Signaltransduktionswege wie z.B. *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK) und *Phosphatidylinositide 3-kinases* (PI-3K)/Akt (Chung et al., 2004), *Stress-activated phosphokinase / c-Jun N-terminal kinase* (SAPK/JNK) (Diao et al., 2001), *p42/p44 mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) (Yoo, Oh, 2003); Wnt/ $\beta$ -Catenin (Hsieh et al., 2011a).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass HBx die HBV-Transkription und -Replikation verstärkt (Keasler et al., 2007; Leupin et al., 2005; Lucifora et al., 2011; Nakatake et al., 1993; Tang et al., 2005; Xu et al., 2002) und somit die Pathogenese hin zu Leberfibrose, Zirrhose und HCC fördert (Benhenda et al., 2009; Bouchard and Navas-Martin, 2011; Jin et al., 2001; Kim et al., 1991).

HBx aktiviert eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen wie z.B. *Nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) (Lucito and Schneider, 1992; Su and Schneider, 1996), *Activator protein 1/2* (AP-1/2) (Kekule et al., 1993), *Activating transcription factor 3* (ATF-3) (Tarn et al., 1999), *Transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1) (Yoo et al., 1996). HBx induziert Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress) (Cho et al., 2011; Li et al., 2007), anormale epigenetische Modifikationen der zellulären DNA (Andrisani, 2013; Park et al., 2007; Tian et al., 2013) und stimuliert die Zellteilung (Jung et al., 2007). Das HBx-Protein assoziiert mit Mitochondrien und löst über den Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials und Calcium-Freisetzung den Zelltod aus (Geng et al., 2012). Zudem wurde berichtet, dass das HBx-Protein die zelluläre Proteasomaktivität hemmen kann (Hu et al., 1999).

HBx bindet an das Tumorsuppressorprotein p53 und hemmt dessen Funktionen als Regulator des Zellzyklus, der Apoptose und DNA-Reparatur (Becker et al., 1998; Lee and Rho, 2000). Hinsichtlich Apoptose gibt es kontroverse Ergebnisse zu HBx. Es wurden hier stimulierende

(Chirillo et al., 1997; Kim and Seong, 2003; Terradillos et al., 2002) und inhibitorische (Diao et al., 2001; Gottlob et al., 1998; Shih et al., 2000) Effekte in verschiedenen zellulären Zusammenhängen gesehen.

Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 werden durch das HBx-Protein verstärkt (Lara-Pezzi et al., 1998; Lee et al., 1998).

## 1.2 Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen wird aus den Mikrofilamenten (MF), Mikrotubuli (MT), Intermediärfilamenten (IF) und den ihnen assoziierten Proteinen gebildet. Es ist ein filamentäres, dynamisches Proteinnetzwerk innerhalb der Zelle und hat eine Vielzahl von essentiellen Zellfunktionen. Es verleiht u.a. der Zelle ihre äußere Form, intrazelluläre Struktur und mechanische Stabilität und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung, -migration, -adhäsion und beim intrazellulären Transport von Proteinen und Organellen. Daneben ist es auch an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Diese Funktionen werden von den o.g. Komponenten auf unterschiedliche Art, Weise und Ausmaß wahrgenommen, teilweise in Interaktion untereinander. Die Proteine, aus denen MF, MT und IF aufgebaut sind, zählen zu den häufigsten Zellproteinen. Nachfolgend werden sie detaillierter beschrieben.

### 1.2.1 Mikrofilamente (Aktin)

Mikrofilamente (MF) oder auch Aktin-Filamente bestehen aus einer Helix von monomeren Aktin-Molekülen (globuläres oder g-Aktin), die jeweils 42 kDa groß sind. Sie haben bei einem Durchmesser von  $\sim 7$  nm eine Länge von  $\sim 30$  bis  $100 \mu\text{M}$ . MF kommen in allen Eukaryonten-Arten vor und Aktin ist in den meisten Zellen das häufigste Protein mit ca. 5% der Gesamtproteinmenge. In Skelettmuskelzellen ist Aktin sogar zu etwa 20% vertreten. MF sind am häufigsten unterhalb der Zellplasmamembran anzutreffen. Sie besitzen eine Polarität, da am Plus-Ende Aktin-Monomere polymerisieren und am Minus-Ende depolymerisieren. In Säugerzellen findet man mind. sechs verschiedene Aktin-Typen, die in drei Klassen eingeteilt werden:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin. Diese unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Eigenschaften. MF liegen meistens miteinander gebündelt oder quervernetzt vor. Die Polymerisierung von MF erfolgt unter ATP-Hydrolyse. Wie bei den MT ist sie nicht für die Filamentbildung

erforderlich, sondern schwächt die Bindungen in den MF ab und fördert so deren Depolymerisierung. Die Geschwindigkeit der Filamentbildung ist proportional zur Konzentration an freien Untereinheiten. Eine Besonderheit der MF ist der sogenannte Tretmühl-Mechanismus. Dabei werden Aktin-Untereinheiten am Plus-Ende angefügt und gleichzeitig welche am Minus-Ende entfernt, sodass die Gesamtlänge des MF etwa gleich bleibt. Eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen (ABP) regulieren den Auf- und Abbau der MF bzw. deren Erhalt. Das Protein Profilin z.B. fördert den Einbau von Aktin-Monomeren an das Plus-Ende der MF. Das Protein Cofilin und ADF (Aktin-depolymerisierender Faktor) binden dagegen an das Minus-Ende der MF und fördern die Depolymerisierung. Weitere ABP verknüpfen die MF untereinander (z.B. Filamin, Fimbrin, Spectrin,  $\alpha$ -Actinin), mit der Plasmamembran (z.B. Calmodulin, Fodrin) und mit Intermediärfilamenten (Fodrin) (dos Remedios et al., 2003). Zusätzliche Regulatoren der Polymerisierung und Verästelung sind u.a. Capping Proteine (z.B. CapZ, Tropomodulin) und der Arp 2/3-Komplex (Amann and Pollard, 2001; dos Remedios et al., 2003; Small et al., 2002). Das Protein Tropomyosin lagert sich an F-Aktin an und trägt zur Stabilisierung bei.

Posttranslationale Modifikationen von  $\beta$ -Aktin wie z.B. Arginylierung regulieren den normalen MF-Aufbau und fördern die Zellmigration (Karakozova et al., 2006).

MF tragen hauptsächlich durch die Verknüpfung mit Adhärenzverbindungen (Zelle – Zelle) und Fokalkontakten (Zelle – Extrazelluläre Matrix) zur mechanischen Stabilität, Formgebung und Adhäsion der Zelle bei (Small et al., 2002). Weiterhin dienen sie dem intrazellulären Transport z.B. von Vesikeln (Evans and Bridgman, 1995) sowie der Verankerung von z.B. Rezeptoren in der Plasmamembran. Durch Verlängerung der Aktinfilamente bilden sich bewegliche und dynamische Zellausstülpungen (spitze Filopodien, flächige Lamellipodien), die Zellmigration bzw. Stoffaustausch (Mikrovilli) ermöglichen. Wechselwirkungen zwischen Aktin und Myosin sind entscheidend für die Muskelkontraktion.

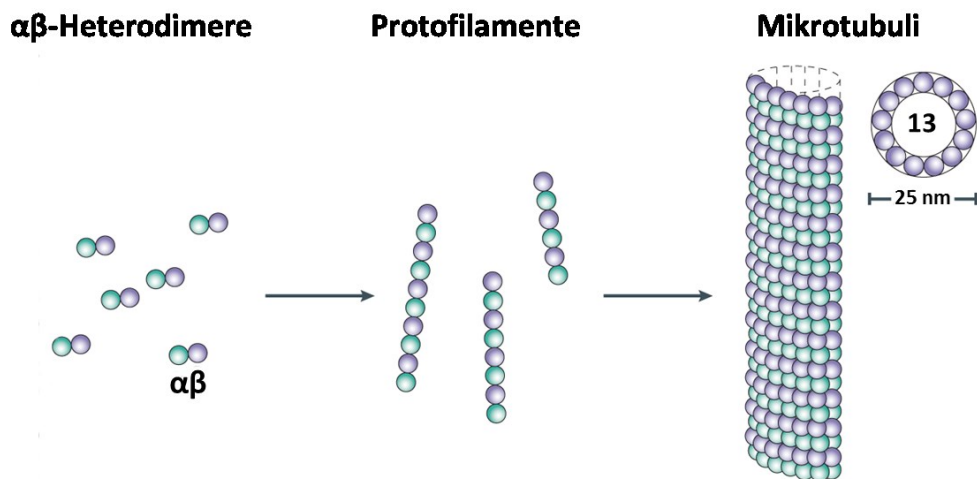
Wie bei den MT gibt es chemische Substanzen, die die Polymerisierung, den Erhalt und die Depolymerisierung fördern. Phalloidine (aus Knollenblätterpilz) binden an die Seiten der MF und wirken der Depolymerisierung entgegen. Dagegen heften sich Cytochalasine (aus Pilzen) an das Plus-Ende von Aktinfilamenten, blockieren eine weitere Polymerisierung und fördern somit die Depolymerisierung (Wodnicka et al., 1992). Beide Wirkstoffe sind zytotoxisch und können bei höheren Konzentrationen und Einwirkdauer zur Apoptose führen.



### 1.2.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) sind längliche Hohlzylinder mit einem äußeren Durchmesser von ca. 25 nm und einer Länge bis zu mehreren Mikrometern (Abb. 7). Sie sind aus meist 13 lateral zusammengelagerten Protofilamenten aufgebaut. Diese bestehen wiederum aus einer Aneinanderreihung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Heterodimeren. In der Regel findet die Nukleation der MT am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) bzw. Centrosom statt, das perinukleär gelegen ist. Dort befindet sich das  $\gamma$ -Tubulin, welches für die Keimbildung verantwortlich ist. Um den Zellkern besitzen die MT auch ihre größte Dichte. Das Minus-Ende der MT befindet sich am MTOC, wo es stabilisiert wird und relativ inaktiv vorliegt. Das Plus-Ende befindet sich am anderen Ende des MT und kann schnell wachsen. MT sind höchst dynamische Strukturen, gekennzeichnet durch einen raschen Auf- (Polymerisierung), Um- und Abbau (Depolymerisierung). Dies wird auch mit dem Begriff der dynamischen Instabilität bezeichnet (Mitchison and Kirschner, 1984). Ihre Halbwertszeit in der Zelle beträgt ca. 10 min. Sie können vom MTOC bis an die Zellperipherie reichen. Bei der Polymerisierung der MT bindet die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit des Tubulin-Heterodimers an das Plus-Ende an und hydrolysiert danach GTP zu GDP. Die Hydrolyse schwächt die Bindung. Erfolgt eine schnelle Anlagerung weiterer Tubulin-Heterodimere wächst der MT. Anderenfalls wird er instabil und kann schnell zerfallen. Sogenannte Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) können die MT gegen den Zerfall stabilisieren bzw. auch die Polymerisierung beschleunigen. Weitere Funktionen sind Bündelung und Quervernetzung von MT untereinander sowie Verbindung mit anderen Zellbestandteilen, z.B. den Intermediär- und Mikrofilamenten (Akhshi et al., 2014; Liao and Gundersen, 1998; Liem, 2013; Walczak and Shaw, 2010). Beispiele für MAP sind MAP-1, MAP-2, tau- sowie die Motorproteine (Bhat and Setaluri, 2007; Dehmelt and Halpain, 2005; Halpain and Dehmelt, 2006). Letztere bewegen sich ATP-abhängig an den MT entlang. Die Kinesine wandern meist in Richtung plus-Ende, die Dyneine dagegen zum Minus-Ende. Dies dient dem intrazellulären Transport von Proteinen, Vesikeln und Organellen (z.B. Golgi, ER) (de et al., 2012; Goldstein and Yang, 2000; Hirokawa, 1998). Das Nukleokapsid des HBV wird nach der Infektion über Mikrotubuli aktiv zum Zellkern transportiert (Rabe et al., 2006). Neben der mechanischen Stützfunktion bilden MT Teilungsspindeln bei der Mitose aus und wirken mit beim Aufbau der Zellpolarität und der Zellmigration (Etienne-Manneville, 2013; Inoue and Salmon, 1995; Siegrist and Doe, 2007). Die Bewegung von Cilien und Flagellen beruht ebenfalls auf MT und deren MAP im Axonem (Mohri et al., 2012). MT weisen *in vivo* posttranslationale Modifikationen wie z.B. Polyglutaminierungen und Polyglycylierungen auf

(Janke and Bulinski, 2011). Die Polymerisierung, Stabilisierung und Depolymerisierung von MT kann mit chemischen Substanzen beeinflusst werden (Amos, 2011). Dies wird u.a. in der Krebsmedizin angewandt (z.B. Mitosehemmer Taxol stabilisiert MT). Dagegen führen Substanzen wie Colchicin und Nocodazol in höheren Konzentrationen zu einer Depolymerisierung von MT, während sie in niedrigen Konzentrationen zu einer MT-Stabilisierung führen und einen Mitose-Arrest induzieren können (Jordan et al., 1992).



**Abbildung 7: Aufbau und Bildung von Mikrotubuli**

Heterodimere von  $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin-Proteinen lagern sich in einer Kopf- zu Schwanz-Anordnung zu Protofilamenten zusammen. Ca. 13 Protofilamente bilden durch laterale Anlagerung den röhrenförmigen Mikrotubuli. Modifiziert nach "Post-translational modifications regulate microtubule function" (Westermann and Weber, 2003).

### 1.2.3 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente (IF) liegen mit einem Durchmesser von ca. 10 nm zwischen den kleineren MF und größeren MT. Im Gegensatz zu diesen sind die IF eine heterogene, aus mehr als 70 verschiedenen Mitgliedern aufgebaute Proteinfamilie, die in sechs Subgruppen weiter unterteilt ist (Kim and Coulombe, 2007) (Tab. 1). Die Einteilung basiert auf Genstruktur und Sequenzhomologie innerhalb der zentralen Stabdomäne. Zytokeratine oder kurz Keratine stellen die größte Untergruppe der IF dar. IF besitzen eine unpolare Struktur und haben deshalb keine assoziierten Motorproteine, die sich an ihnen entlang bewegen können (Strelkov et al., 2003). Sie benötigen keine Nukleotide um aus kleineren Grundeinheiten Filamente zu bilden (Zackroff and Goldman, 1979). Ihre Molekülmassen reichen von 40 kDa (CK19) bis

240 kDa (Nestin). IF sind biochemisch sehr stabil und besitzen im Vergleich zu den MF und MT eine höhere Dehnbarkeit und Reißfestigkeit (Wagner et al., 2007). Sie bilden seilartige Proteinfasern, die mehrere 100 nm lang werden können und erstrecken sich überwiegend durch das gesamte Zytoplasma, wobei sie ihre größte Dichte i.d.R. um den Zellkern aufweisen. Eine Ausnahme bilden die Lamine, die die Innenseite der inneren Kernmembran auskleiden. Die zytoplasmatischen IF stellen über Desmosomen Zell-Zell-Verbindungen und über Hemidesmosomen Zell-Matrix-Kontakte her (Green et al., 2005; Kowalczyk and Green, 2013). Über IF-assoziierte Proteine (IFAP) sind sie untereinander und mit den MF und MT verknüpft (Chang and Goldman, 2004; Green et al., 2005). Dies bewirkt eine verstärkte Zelladhäsion, Ausbildung der Zellmorphologie, Zusammenhalt von Geweben und Organen und Schutz gegen mechanischen Stress.

Eine besonders hohe IF-Expression findet man in Zellen, die mechanischen Belastungen ausgesetzt sind. So z.B. die mehrschichtigen Keratine der Epidermis und Desmine der Muskelzellen. Daneben sind weitere bekannte IF die Glia-Filamente der Astrozyten und Schwann-Zellen sowie die Vimentin-Filamente der Fibroblasten. Tatsächlich aber kommen IF in allen Zelltypen vor. Jedoch exprimieren verschiedene Gewebe und Zelltypen verschiedene IF-Mitglieder bzw. unterschiedliche Kombinationen von ihnen (Omary et al., 2004). Da das typische Expressionsmuster auch i.d.R. in Tumorzellen erhalten bleibt, werden IF als Zell-, Gewebe- und Tumormarker z.B. in der Histopathologie verwendet.

Die Vielzahl von IF-Mitgliedern und der mit ihnen assoziierten IFAP sowie ihr Vorkommen auch in Zellen, die keinen oder wenig mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, weist auf weitere vielfältige Funktionen hin. Obwohl vielfach noch unerforscht, zeigen sie ihre Bedeutung in den ca. 80 humanen Krankheiten, die z.B. durch Mutationen in IF-kodierenden Genen bedingt sind (Eriksson et al., 2009; Omary, 2009; Paulin et al., 2011; Perrot and Eyer, 2009) (Tab. 1). So sind IF u.a. auch beteiligt in Prozessen wie Proteinsynthese und Zellwachstum (Kim et al., 2006; Ku et al., 2002b; Reichelt and Magin, 2002), Apoptose und Schutz vor zytotoxischen Einflüssen (Caulin et al., 2000; Inada et al., 2001; Sahlgren et al., 2006), Positionierung von Organellen (Mitochondrien, Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen, Zellkern) und Proteinlokalisierung (z.B. Membranproteine) (Toivola et al., 2005). Analog den MF und MT sind die IF für ihren Zusammenbau, Organisation, Funktion und Regulierung von einer Vielzahl von interagierenden Proteinen abhängig. Insbesondere die Plakin-Proteinfamilie mit Plektin und bullöses Pemphigoid-Antigen 1 (BPAG1) als bekannteste Vertreter, spielt bei der Vernetzung und Verankerung von IF mit MF und MT sowie mit Hemidesmosomen und Desmosomen eine wichtige Rolle (Jefferson et al., 2004).

Trotz Diversität besitzen die IF einen gemeinsamen monomeren Grundaufbau. Er besteht aus einer zentralen, linearen und konservierten  $\alpha$ -helikalen Stabdomäne, die eine Doppelwendel-Struktur (*coiled coil*) mit ca. 310 AS ausbildet. Sie ist aus sieben Tandem-Wiederholungs-Sequenzabschnitten (Heptaden-Wiederholungen) einer bestimmten Aminosäuren-Abfolge aufgebaut. Flankiert wird sie durch eine in Größe und Sequenz variable nicht-helikale N-terminale Kopf- und C-terminale Schwanz-Domäne, die i.d.R. aus der Oberfläche des Filaments herausragt. Posttranslationale Modifikationen und Interaktionen mit anderen Proteinen finden bevorzugt an diesen flankierenden Bereichen statt. Phosphorylierungen an Serin-Resten von IF spielen z.B. bei der Mitose eine wichtige Rolle, da sie einen vorübergehenden Zerfall der Kernlamine und Umstrukturierungen zytoplasmatischer IF bewirken.

*In vitro* bilden zwei Monomere durch parallele Anordnung ein polares Dimer aus, welches mit einem weiteren Dimer in lateral versetzter, anti-paralleler Ausrichtung ein apolares Tetramer bildet (Herrmann and Aebi, 2004; Kirmse et al., 2007). Diese assoziieren weiter lateral zu Protofilamenten und sog. *unit length filaments* (ULF) von 17 nm Durchmesser und 60 nm Länge. Durch longitudinale Anlagerungen der ULF entstehen lose gepackte Filamente von mehreren 100 nm Länge, die in weiteren Schritten zu einem Durchmesser von ca. 10 nm kompakt prozessiert werden (Colakoglu and Brown, 2009; Herrmann and Aebi, 2004; Winheim et al., 2011). *In vivo* wird eine ähnliche Filamentbildung vermutet. Im Gegensatz zu MF und MT wird zur Bildung von IF kein ATP oder GTP benötigt (Herrmann et al., 2007). Das IF-Netzwerk von Zellen ist nicht statisch, sondern einer ständigen Reorganisation und Umbau unterworfen, welche insbesondere bei der Mitose sehr deutlich wird (Chou et al., 2007; Kolsch et al., 2010; Leube et al., 2011; Windoffer et al., 2011).

**Tabelle 1: Übersicht der Intermediärfilament-Proteinfamilie**

Die IF-Proteinfamilie wird in sechs verschiedene Typklassen (Typ I – VI) eingeteilt. Ihre ungefähren Größen (kDa), hauptsächliches Vorkommen in Zelltypen und Geweben sowie Beispiele von mit ihr assoziierten Erkrankungen sind dargestellt. Modifiziert nach (Herrmann and Aebi, 2000; Hertel, 2011; Kim and Coulombe, 2007; Omary et al., 2006).

Typ	Proteine	Größe (kDa)	Vorkommen Zelltyp	Vorkommen Gewebe	Assoziierte Erkrankungen (Bsp.)
I	saure Keratine: CK9 - CK28 CK31 - CK40	40 - 64	Epithelzellen, Keratinocyten	Mukosa, Epidermis, Haare, Nägel,	Blasenbildende Erkrankungen der Haut
II	Basisch/neutrale Keratine: CK1 - 8, CK71 - 80 CK81 - 86	52- 68	Epithelzellen, Keratinocyten	Mukosa, Epidermis, Haare, Nägel,	erhöhtes Risiko/Schweregrad von Lebererkrankungen
III	Vimentin Peripherin GFAP Syncoilin Desmin	54 54 52 64 53	Fibroblasten, Endothel- und Hämatopoitische Zellen Astrozyten, Nerven- und Gliazellen Muskelzellen Muskelzellen	Bindegewebe, Blutgefäße, Nervensystem Nervensystem Muskeln Muskeln	unbekannt Amyotrophe Lateralsklerose Alexander Krankheit unbekannt Kardiomyopathie
IV	$\alpha$ -Internexin Neurofilament H, L, M Nestin Synemin- $\alpha$ , Synemin- $\beta$	66 61 - 110 240 180, 150	Nervenzellen Nervenzellen Nervenzellen Muskelzellen	Nervensystem Nervensystem Nervensystem Muskeln	unbekannt Charcot-Marie-Tooth Krankheit unbekannt unbekannt
V	Lamin A, B1, B2, C1, C2	62 - 78	ubiquitär	Kernlamina	Hutchinson-Gilford Progerie Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie
VI	Phakinin (CP49) Filensin (CP115)	47 94	Augenlinsen-Zellen	Augenlinsen	Grauer Star unbekannt

## 1.2.4 Keratine

### 1.2.4.1 Allgemeines

Keratine oder auch Zytokeratine (CK) sind die Intermediärfilamente der Epithelzellen. Mit insgesamt 54 Mitgliedern stellen sie die größte Untergruppe der IF dar. Davon gehören 28 zu den sauren Keratinen des Typs I und 26 zu den neutralen / basischen Keratinen des Typs II (Tab. 1). Anders als die übrigen IF, die aus Homodimeren aufgebaut sind, bilden die Keratine aus je einem Typ I und II-Keratin ein obligates Heterodimer-Paar aus (Fuchs and Weber, 1994). Keratine können in drei verschiedenen funktionellen Gruppen eingeteilt werden: 1) einfache Keratine, exprimiert in embryonalem Gewebe und einschichtigen Epithelgewebe wie Leber, Darm und Drüsenzellen, 2) mehrschichtige Keratine, exprimiert von Epithelzellen der Epidermis der Haut und 3) harte Keratine, die von Epithelzellen in Haaren und Nägeln

exprimiert werden (Haines and Lane, 2012). In einschichtigem Epithelgewebe werden normalerweise nur die Keratine CK7, CK8, CK18, CK19 und CK20 exprimiert. Dabei exprimieren Epithelzellen je nach Zelltyp und Differenzierungsstatus ein bis fünf verschiedene Keratin-Paare (Moll et al., 1982). Bestimmte Paarbildungen werden bevorzugt eingegangen; z.B. CK8 mit CK18 (einschichtige Epithelzellen wie z.B. Hepatozyten), CK5 mit CK14 (mehrschichtige Epithelzellen wie z.B. Keratinozyten) (Fuchs and Weber, 1994).

Die Keratine CK8 und CK18 sind die ersten Keratingene, die in Säugetier-Embryonen exprimiert werden (Lehtonen et al., 1983), und auch die einzigen Keratine, die von humanen und murinen Hepatozyten, Pankreasazinuszellen und Nierentubuli gebildet werden. Ein Epithelgewebe oder eine bestimmter Epithelzelltyp ist daher durch ein spezifisches Expressionsmuster von Keratinen charakterisiert (Moll et al., 1982).

Ein charakteristisches Kennzeichen von chronischen Leberkrankheiten, wie z.B. der Alkoholischen (ASH) und Nichtalkoholischen (NASH) Form der Steatohepatitis, sind die sog. Mallory-Denk-Körperchen (MDB) innerhalb von Hepatozyten, die überwiegend aus aggregierten CK8/18-Proteinen bestehen (Strnad et al., 2008).

CK8/18-Proteine liegen nicht nur intrazellulär in Hepatozyten vor, sondern lassen sich auch im menschlichen Blut nachweisen. Insbesondere im Blut von Patienten mit Lebererkrankungen, die zu Nekrose und Apoptose von Hepatozyten führen, lassen sich erhöhte Konzentrationen von CK8/18-Proteinen und CK18-Fragmenten nachweisen (Strnad et al., 2012).

#### **1.2.4.2 Biologische Funktionen von Keratinen**

Keratine weisen eine Vielzahl von Funktionen auf. Insbesondere im Verbund mit anderen IF, MF und MT sind sie für die Formgebung und mechanische Stabilität der Zelle bzw. eines Gewebes mitverantwortlich. Dies wird weiter verstärkt durch ihre intrazelluläre Bindung an Desmosomen und Hemidesmosomen, wodurch ein Kontakt mit benachbarten Zellen bzw. mit der Extrazellulären Matrix (ECM) hergestellt wird. Die Stabilisierungsfunktion von Keratinen (CK) wird augenscheinlich in genetisch bedingten Hautkrankheiten wie Epidermolysis bullosa und der Epidermolytischen Hyperkeratose, denen Mutationen in CK5/CK14 bzw. CK1/CK10 zugrundeliegen (Omary et al., 2004). Daneben sind Keratine wichtig für die normale Gewebe-Architektur als auch für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität von Epithelzellen (Ameen et al., 2001; Oriolo et al., 2007; Toivola et al., 2001). Das Protein *Fas-*

*binding factor 1* (Albatross) reguliert die Zellpolarität bei Epithelzellen durch Bindung mit CK8 und CK18 (Sugimoto et al., 2008).

Weiterhin können Keratine einen Einfluss auf die Zellmigration und –invasion insbesondere durch Modulierung der Aktivität von Proteinkinase C, Tyrosinkinase Src und der Fokalen Adhäsionskinase FAK nehmen (Bordeleau et al., 2010; Long et al., 2006; Osmanagic-Myers and Wiche, 2004; Pan et al., 2013; Rotty and Coulombe, 2012).

Keratine besitzen bereits durch ihre Fähigkeit, Phosphatgruppen bei Phosphorylierungsreaktionen abzufangen, einen indirekten Einfluss bei Signaltransduktionen (sog. „*phosphate sponge model*“) (Ku and Omary, 2006). Durch Interaktionen von Keratinen mit Kinasen wie z.B. Protein-Kinase B und C, c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und anderen zytoplasmatischen Proteinen wie z.B. 14-3-3-Proteinen ermöglicht es ihnen auch einen direkten Einfluss auf die Signalübertragung zu nehmen (He et al., 2002; Ku et al., 1998a; Ku et al., 2002b; Liao and Omary, 1996; Omary et al., 1992; Paramio et al., 2001). Durch ihre o.g. Phosphat-Pufferfunktion können sie vor Apoptose durch Stress-aktivierte Kinasen schützen, indem sie die Phosphorylierung von pro-apoptischen Substraten verhindern bzw. verringern. Desweiteren können CK8/18 eine TNF- und Fas-vermittelte Apoptose abschwächen (Caulin et al., 2000; Gilbert et al., 2001; Inada et al., 2001). Diese Eigenschaften von CK8/18 könnten auch ihre zytoprotektive Rolle bei Hepatozyten gegenüber zytotoxischen Substanzen wie Alkohol, Drogen, etc. erklären (Zatloukal et al., 2000). Eine zellprotektive Rolle von CK8/18 bei Hepatozyten konnte jedoch nicht in Pankreaszellen beobachtet werden (Toivola et al., 2000a; Toivola et al., 2000b). Dies spricht für die Möglichkeit, dass identische Keratine in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Funktionen wahrnehmen.

Weiterhin ist von Keratinen bekannt, dass sie einen Einfluss auf die Proteinexpression, Zellwachstum und –proliferation aufweisen (Depianto et al., 2010; Kim et al., 2006; Kim and Coulombe, 2010; Paramio et al., 1999; Vijayaraj et al., 2009). Insbesondere die Proteinkinasen B und C, mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und 14-3-3-Proteine sind hierin involviert (Pan et al., 2013).

Daneben nehmen Keratine auch eine wichtige Rolle bei der korrekten Lokalisierung von Membran-assoziierten Proteinen (z.B. Fas-Rezeptor, Desmoplakin, F-Aktin) sowie der Lokalisierung und Organisation von Organellen wie z.B. Mitochondrien und des Golgi-Apparats ein (Kumemura et al., 2004; Kumemura et al., 2008; Toivola et al., 2005).

Insbesondere die Keratine 8, 18 und 19 spielen auch eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung. So ist eine protektive Funktion von CK8 in der Aufrechterhaltung der

Plazentaschranke beschrieben (Jaquemar et al., 2003). CK18 und CK19 tragen essentiell zur Stabilität und Funktionen der Trophoblasten bei (Hesse et al., 2000).

Mehrere Studien zeigen zudem, dass Keratine, insb. CK8/18, einen Einfluss auf das Invasions- und Wachstumverhalten von Tumoren haben (Weng et al., 2012).

### 1.2.4.3 Keratin-assoziierte Proteine

Zu den Keratin-assoziierten Proteinen (KAP) zählen alle Proteine, die mit Keratinen interagieren und einen Einfluss auf deren Organisation und Funktion haben. Sie gehören zur Gruppe der Intermediärfilament-assoziierten Proteine (IFAP). Durch die zunehmende Identifizierung von Keratin-Funktionen in den letzten Jahren, stieg auch die Anzahl der entdeckten KAP an. Als bekannteste Vertreter sind hier die Mitglieder aus der Plakin-Genfamilie zu nennen. Die KAP Desmoplakin, Plakoglobin und Plakophilin vernetzen Keratinfilamente mit Desmosomen (Hofmann et al., 2000; Kouklis et al., 1994; Kowalczyk et al., 1994; Smith and Fuchs, 1998), währenddessen BPAG1 sie maßgeblich mit Hemidesmosomen verknüpft (Fuchs and Yang, 1999; Fuchs and Karakesisoglou, 2001). Das KAP Plektin dagegen spielt eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung von Keratinfilamenten mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli (Coulombe and Omary, 2002; Jefferson et al., 2004). So weisen Plektin-defiziente Zellen weniger Kreuzvernetzungen zwischen den drei Zytoskelett-Mitgliedern auf, was in einer größeren Anfälligkeit gegenüber Stress-induzierter Zerstörung des IF-Zytoskeletts sowie veränderter Signaltransduktion und Zellmigration resultiert (Osmanagic-Myers et al., 2006). Die beiden KAP Filaggrin (Dale et al., 1985) und Trichohyalin (Lee et al., 1993) sind an der Bündelung von Keratinfilamenten in Keratinozyten beteiligt. Keratin 8 bzw. 18 können an die zytoplasmatische Domäne des Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2) binden und die JNK-vermittelte Signalkaskade und NFκB-Aktivierung hemmen (Caulin et al., 2000). CK18 kann außerdem spezifisch die TNFR1-assoziierte Todesdomäne-Protein (TRADD) binden. Dadurch bindet TRADD nicht mehr an aktivierten TNFR1, wodurch TNF-induzierte Apoptose abgeschwächt wird (Inada et al., 2001). CK18 interagiert phosphorylierungsabhängig mit 14-3-3 Proteinen und moduliert den Mitose-Vorgang in Hepatozyten (Ku et al., 2002b; Liao and Omary, 1996). Als weitere Bindungspartner von Keratin 8 bzw. 18 sind das Hitzeschockprotein Hsp/c70 (Liao et al., 1995a), Hsp 27 (Kayser et al., 2013; Perng et al., 1999), das DnaJ/Hsp40-Hitzeschockprotein



Mrj (Izawa et al., 2000), Chaperon BiP/GRP78 (Liao et al., 1997) und *Fas-binding factor 1* (Albatross) (Sugimoto et al., 2008) bekannt.

#### 1.2.4.4 Keratin –Pathogen-Interaktionen

Bei einer Reihe von Bakterien, Viren und Parasiten sind Interaktionen ihrer Proteine mit Zytokeratinen der Wirtszelle bekannt. So sind Interaktionen von bakterien-spezifischen Proteinen, wie z.B. des Pet-Toxins von Enterobakterien mit CK8 (Nava-Acosta and Navarro-Garcia, 2013), einer Protease von *Chlamydomyxa pneumoniae* mit CK8 und CK18 (Dong et al., 2004; Savijoki et al., 2008) und eines porenbildenden Proteins von *Staphylococcus aureus* mit CK8 und CK10 (Haim et al., 2010; O'Brien et al., 2002) bekannt. Interessanterweise führte die Interaktion von CK6 und CK14 mit Membranproteinen des Bakteriums *Bartonella henselae* zu einer verstärkten Expression und Depolymerisierung dieser Keratine verbunden mit einer erhöhten Infektionsrate in HeLa-Zellen (Zhu et al., 2013). Auch bei Proteinen von Protozoen sind Interaktionen mit Keratinen in der Literatur beschrieben (Magdesian et al., 2001; Vilela and Benchimol, 2011).

Die Mehrzahl von beschriebenen Keratin-Interaktionen ist jedoch bei Viren zu finden. So führte die proteolytische Spaltung von CK7 und CK18 durch eine Adenovirus-Proteinase zur Zerstörung des Keratinnetzwerks in HeLa-Zellen, zu einer Förderung der Zellyse und Freisetzung von Viren-Nachkommen (Chen et al., 1993; Zhang and Schneider, 1994). Dagegen war die Interaktion des Nukleoproteins vom Lymphozytischen Choriomeningitis Virus (LCMV) mit CK1 mit einer Stabilisierung des Keratin-Netzwerks verbunden (Labudova et al., 2009). Über eine proteolytische Spaltung von CK8 durch eine virenspezifische Proteinase des humanen Rhinovirus und Coxsackievirus wird ebenfalls berichtet (Seipelt et al., 2000). Desweiteren sind Interaktionen des US2-Proteins von Herpes Simplex Virus Typ 2 mit CK18 (Goshima et al., 2001) und des phosphorylierten E1/4 Proteins des humanen Papillomvirus Typ 16 mit intrazellulären Keratinen (Wang et al., 2009) beschrieben. Interessanterweise verstärkte eine CK8-Überexpression die HBV-Replikation in einer Hepatoma-Zelllinie, währenddessen eine Herunterregulation von CK8 sie abschwächte (Zhong et al., 2014). Eine gesteigerte CK8-Expression wurde in einer Hepatitis C Virus (HCV)-RNA-transfizierten Hepatoma-Zelllinie beobachtet (Sun et al., 2013a). Eine CK8/18-Expression in der humanen Mastzelllinie HMC-1 konnte die Replikation des Respiratorischen-Synzytial-Virus (RSV) erhöhen, während sie durch Herunterregulierung von CK18 in A549-Zellen

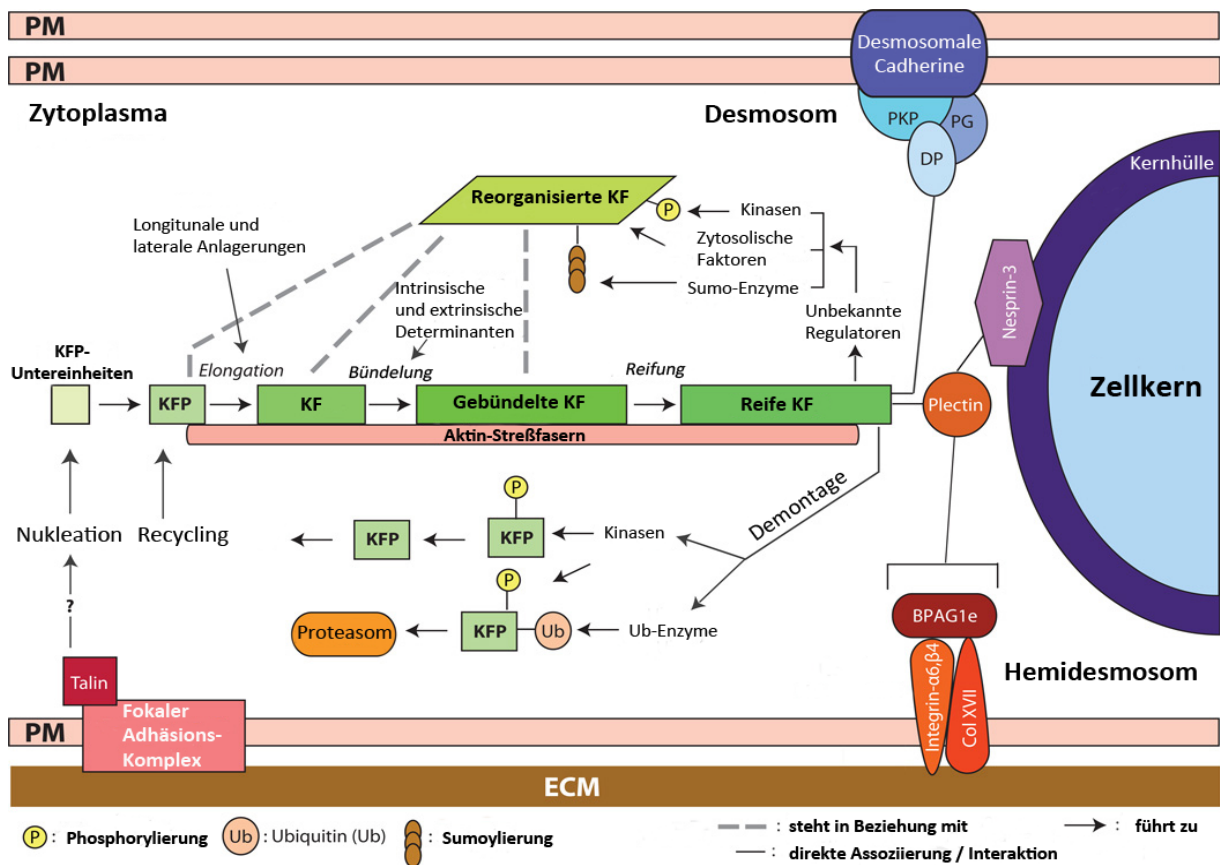
reduziert wurde (Shirato et al., 2012). Eine RSV-Infektion induzierte eine starke CK17-Expression in HEp-2 (humane Epitheliumzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms)-Zellen und anschließender Synzytien-Bildung (Domachowske et al., 2000).

Zusammenfassend zeigen einige der o.g. Keratin-Pathogen-Interaktionen einen direkten Einfluss von Keratinen auf die Infektion, Replikation oder Freisetzung der Pathogene aus den Wirtszellen. Interaktionen von Viren mit CK8 und CK18 sind häufig beschrieben, einige auch bei Hepatitis Viren. Jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen weitgehend unbekannt.

#### 1.2.4.5 Dynamik des Keratinfilament-Netzwerks

Das Keratinfilament-Netzwerk (KFN) ist kein statisches Gebilde, sondern besitzt eine hohe Dynamik (Chou et al., 2007; Sivaramakrishnan et al., 2009; Windoffer et al., 2011; Yoon et al., 2001), die hauptsächlich über Keratin-Phosphorylierungen gesteuert wird (Ku et al., 2002a; Menon et al., 2010; Omary et al., 2006; Woll et al., 2007). Die Restrukturierung des KFN kann grundsätzlich entweder durch Abbau und Neusynthese von Keratinen erfolgen oder durch Auseinander- und erneuten Zusammenbau von Keratin-Untereinheiten des bestehenden KFN (Abb. 8). Dies wird als Keratin-Zyklus bezeichnet (Leube et al., 2011). Die erste Möglichkeit wird durch Studien gestützt, die eine Keratin-Ubiquitinylierung und nachfolgende Degradation zeigen konnten (Ku and Omary, 2000; Rogel et al., 2010; Srikanth et al., 2010). Dieser Mechanismus erfolgt hauptsächlich bei erhöhtem Zellstress oder bei fehlgefalteten Keratinen (Jaitovich et al., 2008; Loffek et al., 2010; Na et al., 2010). Dagegen ist der Keratin-Zyklus des Auseinander- und Zusammenbaus unabhängig einer Protein-Neusynthese und Degradation (Kolsch et al., 2010). Er ist grundsätzlich permanent aktiv, wird aber z.B. bei der Zellmigration und Mitose hochreguliert (Kolsch et al., 2009; Ku et al., 1998a; Liao and Omary, 1996; Rolli et al., 2010). Mit fluoreszenz-markierten Keratinen konnte dieser Zyklus intrazellulär aufgeklärt werden. Er beginnt mit der Nukleation von Keratin-Untereinheiten in der Nähe von Fokaladhäsionen der Zellperipherie. Von dort erfolgt die KF-Elongation und der vorwiegend Aktin-abhängige Transport und anschließende Einbau in das periphere KFN (Kolsch et al., 2009; Werner et al., 2004). Von einem Mikrotubuli-abhängigem Transport von Keratinpartikeln wird jedoch auch berichtet (Liovic et al., 2003; Windoffer and Leube, 1999; Yoon et al., 2001). Inwieweit der Transport von Aktin-Motorproteinen wie z.B. Myosin bzw. Mikrotubuli-Motorproteinen (Kinesin und Dynein) abhängig ist, ist bisher noch nicht abschließend geklärt (Chang and Goldman, 2004; Helfand et al., 2003; Helfand et al., 2004;

Liovic et al., 2003; Rao et al., 2002). Die KF bündeln sich innerhalb des KFN und wandern weiter in Richtung Zellkern. Teilweise werden sie wieder zu löslichen Keratin-Untereinheiten demontiert und liegen dann diffus im Zytoplasma vor. Nach einer Rückführung zur Zellperipherie werden sie für einen neuen Keratin-Zyklus recycelt. Alternativ bilden sie eine stabile Umhüllung des Zellkerns aus oder werden an Desmosomen und Hemidesmosomen verankert (Windoffer et al., 2011). Eine weitere, jedoch indirekte Dynamik der Keratine (als auch IF) ergibt sich durch deren Verknüpfung mit dem MF- und MT-Zytoskelett durch sog. Linkerproteine wie z.B. Plektin oder BPAG1.



**Abbildung 8: Zusammenbau, Organisation und Regulierung von Keratin-Filamenten (KF)**

Die Nukleation und Zusammenbau der KF wird an der Zellperipherie in der Nähe von Fokalen Adhäsionen initiiert. Ihre Elongation, Bündelung und Reifung findet in einer zentripetal gerichteten, kontinuierlichen Bewegung statt. Eine Demontage und Reorganisation von reifen KF, vorwiegend in Zellkernnähe, führt die Keratinfilament-Vorläufer (KFP) über eine zentrifugale Bewegung zurück bis hin zur Zellperipherie, wo ein erneuter KF-Zyklus beginnt. Dieser Zyklus ist abhängig von Interaktionen von KF mit F-Aktin, weiteren Proteinen und posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen, Sumoylierungen und O-Glykosylierungen. KF sind teilweise an der Zellkern-Hülle via Plektin/Nesprin-3-Komplex, an Desmosomen via Desmoplakin (DP), Plakophilin (PKP) und Plakoglobin (PG) und an Hemidesmosomen via Plektin und BPAG1e gebunden. Nicht gezeigt sind die Interaktionen von KF mit Mikrotubuli. PM: Plasmamembran, ECM: Extrazelluläre Matrix. Modifiziert nach Pan et al., 2013.

#### 1.2.4.6 Posttranslationale Modifikationen von Keratinen

Die Kopf- und Schwanzregion der Keratine wird im Gegensatz zur zentralen Stabdomäne durch ihre freiere Zugänglichkeit häufig durch Phosphorylierungen und Glykosylierungen posttranslational modifiziert (Heins and Aebi, 1994; Omary et al., 2006). Mehrere spezifische Phosphorylierungsstellen an Serin-Resten z.B. bei CK8 (Ser23, Ser73, Ser431 und CK18 (Ser33, Ser52) sind in diesen flankierenden Regionen bekannt (Omary et al., 1998; Owens and Lane, 2003). Diese regulieren ihre Assoziierung mit zellulären Proteinen (Ku et al., 1998a; Omary et al., 2006), ihre Ubiquitinierung und Degradierung (Jaitovich et al., 2008; Ku and Omary, 2000) sowie ihr Zusammenbau und Organisation (Omary et al., 2006). p38 MAPK, Protein-Kinase C und MAPKAP-Kinasen wurden als beteiligte Kinasen beschrieben (Menon et al., 2010; Sivaramakrishnan et al., 2009; Woll et al., 2007).

Keratin-Phosphorylierungen spielen die zentrale Rolle beim dynamischen Austausch von löslichen Keratin-Untereinheiten (z.B. Tetrameren) mit bereits polymerisierten Keratinfilamenten (Flitney et al., 2009; Ku et al., 2002a; Liao et al., 1995b; Sivaramakrishnan et al., 2009; Windoffer et al., 2004; Woll et al., 2007). Eine Keratin-Phosphorylierung verhindert die Filamentbildung *in vitro* und erhöht den Anteil löslicher Keratin-Einheiten (Strnad et al., 2001; Yano et al., 1991). Auch beim Mitose-Vorgang, korreliert eine verstärkte Keratin-Phosphorylierung mit vermehrtem Auftreten von löslichen Keratin-Untereinheiten (Klymkowsky et al., 1991; Ku et al., 2002b). Diese dynamische Reorganisation von Keratinen ist auch bedeutend für ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen (Flitney et al., 2009; Ridge et al., 2005; Sivaramakrishnan et al., 2009) und nicht-mechanischen Stress (Ku and Omary, 2006). So wurde in transgenen Mäusen mit eingeschränkter Keratin-Phosphorylierung eine erhöhte Apoptose von Hepatozyten nach Einsatz von Apoptose-induzierenden Substanzen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt (Ku et al., 1998b). Dies spricht für eine Apoptose-Schutzfunktion von Keratinen durch Wegfangen von Phosphorylierungen, die eigentlich von Stress-aktivierten Kinasen für pro-apoptische Substrate vorgesehen sind (sog. Phosphat-Schwamm-Modell) (Ku and Omary, 2006). Übermässig erhöhte Keratinphosphorylierungen führen jedoch zu einer KF-Reorganisation und KF-Granulatbildung (s. auch Kapitel 1.2.5).

Aus klinischer Sicht können permanente Veränderungen in der Organisation von Keratinen ihre Funktionen im Patienten beeinträchtigen. So treten z.B. Hyperphosphorylierungen und Mutationen von CK8/18 gehäuft bei diversen Lebererkrankungen auf und korrelieren mit einem schwereren Krankheitsverlauf. Beispiele sind hier die chronische Hepatitis B und C,

Primäre biliäre Zirrhose und akutes Leberversagen (Toivola et al., 2004; Zatloukal et al., 2004).

Durch die hohe Dynamik von Glykosylierungen durch Glykosyltransferasen werden allgemein zahlreiche Funktionen wie Protein-Phosphorylierungen, subzelluläre Lokalisierung, Protein-Protein-Interaktionen, Gen-Transkription und Proteindegradierung reguliert (Zachara and Hart, 2006). Glykosylierungen (*N*-Acetylglucosamin) von Keratinen an verschiedenen Serin-Resten sind ebenfalls bekannt; z.B. bei CK18 an Ser29, Ser30, and Ser48 (Ku and Omary, 1995). Insbesondere in der Phase des G2/M-Arrests wurde eine verstärkte Glykosylierung von CK8/18 beobachtet (Chou and Omary, 1993), die mit ihrer erhöhten Löslichkeit und nachfolgenden Degradierung durch das Proteasom einherging (Srikanth et al., 2010). Weiterhin wird der Glykosylierung von CK18 eine zytoprotektive Rolle zugewiesen, da Hypoglykosylierungen von CK18 zu vermehrter Apoptose in Mäuselebern durch Inaktivierung von Akt1-Kinase und Protein Kinase C führte (Ku et al., 2010).

Weiter sind Transglutamylierungen von einigen Typ II Keratinen in mehrschichtigen Epithelzellen beschrieben, die Verknüpfungen zu anderen Proteinen wie z.B. Loricrin, Involucrin und Envoplakin in der intrazellulären Seite der Plasmamembran herstellen und damit zur Zellstabilisierung beitragen (Candi et al., 1998; Omary et al., 1998).

Disulfidbrückenbildungen werden bei einigen Keratinen zu ihrer Stabilisierung (mangels Cystein-Resten nicht bei CK8/18) ausgebildet (Wang et al., 2000).

Acetylierungen wurden bei manchen Keratinen (z.B. CK8) ebenfalls nachgewiesen, wobei dessen Funktion noch unbekannt ist. Jedoch ist eine übermäßige Acetylierung wie bei einer Hyperphosphorylierung mit einem Zusammenbruch des Zytoskeletts assoziiert (Drake et al., 2009).

Eine Ubiquitinierung und Sumoylierung von Keratinen und nachfolgende Degradation im Proteasom wurde ebenfalls gezeigt (Jaitovich et al., 2008; Ku and Omary, 2000; Snider et al., 2011).

Weiterhin ist eine Caspase-vermittelte Degradation von Typ I Keratinen, z.B. CK18, CK19 beschrieben. Typ II Keratine scheinen aus bislang unbekanntem Gründen davon ausgenommen (Ku et al., 1997).

### 1.2.5 Der Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure

Die Okadainsäure (OA) wurde erstmalig aus dem marinen Schwamm *Halichondria okadai* isoliert, dem sie auch ihren Namen verdankt. Ursprünglich wird OA jedoch von marinen Algen wie z.B. *Dinophysis*- oder *Prorocentrum*-Arten produziert und kann sich in Muscheln und Seefischen soweit anreichern, dass es beim Verzehr zu einer Nahrungsmittelvergiftung beim Menschen kommt. OA ist eine wasserunlösliche Fettsäure mit tumorfördernden Eigenschaften (Fujiki et al., 1992). Sie zählt wie z.B. Orthovanadat und Calyculin A zu den sog. Phosphatase-Inhibitoren (Deery, 1993; Haystead et al., 1989). OA inhibiert sehr spezifisch die Serin- und Threonin-Protein-Phosphatasen PP1 (IC<sub>50</sub> = 15-20 nM; vollständig 1 µM) und PP2A (IC<sub>50</sub> = 0,1 nM; vollständig 1-2 nM) (Cohen et al., 1989), währenddessen PP2C, saure und basische Phosphatasen sowie Phosphotyrosin-Proteinphosphatasen kaum beeinflusst werden (Bialojan and Takai, 1988; Ishihara et al., 1989).

OA führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten etlicher intrazellulärer Proteine *in vitro* (Haystead et al., 1989; Reaven et al., 1993). Auch eine erhöhte Phosphorylierung von Keratinen (Kasahara et al., 1993; Paramio, 1999; Yatsunami et al., 1993; Yuan et al., 1998), Induzierung von Kinase-Aktivitäten (z.B. Proteinkinase C (PKC), p38, extrazellulär-signalregulierte Proteinkinase 1, 2 (ERK), c-Jun N-terminale Kinase (JNK), stressaktivierte Proteinkinase (SAPK), doppelsträngige RNA-abhängige Proteinkinase (PKR)) (Chen et al., 2000; Chen, 2011; Gopalakrishna et al., 1992; Westermarck et al., 1998; Yoon et al., 2006) und des NF-κB und Caspase-Signalwegs (Chen, 2011) wurde beschrieben. Bekannt ist auch seine p38-vermittelte Phosphorylierung von IF and IFAP (Chen et al., 2000; Cheng and Lai, 1998; Ku et al., 2002a). Bei Untersuchungen von OA auf die Reorganisation von Keratinen, kam es konzentrations- und zeitabhängig zum Anstieg ihres löslichen Anteils, zu einer Reorganisation des KF-Netzwerks, Verdichtung von KF um den Zellkern und Bildung von zytoplasmatischen und perinukleären Keratingranula (Blankson et al., 1995; Kasahara et al., 1993; Strnad et al., 2001; Yatsunami et al., 1993). Eine Überexpression bzw. Steigerung der p38-Kinaseaktivität führte in einer transgenen humanen epidermalen Tumorzelllinie A-431 zu ähnlichen Ergebnissen (Woll et al., 2007). Umgekehrt konnte die Keratin-Reorganisation, ausgelöst durch den Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat, durch pharmakologische als auch transkriptionelle Inhibierung der p38-Kinase-Aktivität verhindert werden (Strnad et al., 2003; Woll et al., 2007).

Darüberhinaus bewirkt OA eine Destabilisierung von Desmosomen und Fokalen Adhäsionen (Pasdar et al., 1995; Romashko and Young, 2004; Serres et al., 1997; Young et al., 2002),

führt zur Zellabrundung (Romashko and Young, 2004; Strnad et al., 2001) und beeinflusst die Zellmotilität (Harisi et al., 2009; Ruzsnavszky et al., 2013; Young et al., 2002).

Verschiedene Studien konnten auch einen Einfluss von OA auf die Organisation von anderen IF (Cheng et al., 2000; Eriksson et al., 1992; Lee et al., 1992; Sacher et al., 1992; Shea et al., 1993) als auch MF und MT (Fiorentini et al., 1996; Gliksman et al., 1992; Gurland and Gundersen, 1993) zeigen. Bei niedrigen OA-Konzentrationen waren jedoch keine signifikanten Veränderungen bei MF und MT feststellbar (Blankson et al., 1995; Strnad et al., 2001).

In OA behandelten Zellen wurde zunächst ein Rückgang von KF in der Zellperipherie und erst später in der perinukleären Region gesehen (Strnad et al., 2001). OA erhöht die Menge an löslichen Keratin-Einheiten in der Zelle, welche zusätzlich mit dem Löslichkeits-Kofaktor 14-3-3-Proteinen kolokalisiert sind (Liao and Omary, 1996; Strnad et al., 2001; Strnad et al., 2002).

OA bewirkt eine konzentrations- und inkubationszeit-abhängige reversible Fragmentierung des Golgi-Apparats und dadurch eine verminderte extrazelluläre Sekretion von Proteinen (Lucocq, 1992; Lucocq et al., 1995; Reaven et al., 1993; Sato et al., 1998; Tamaki and Yamashina, 2002; Waschulewski et al., 1996), ER-Golgi-Transport-Inhibierung (Davidson et al., 1992; Lucocq et al., 1991; Pryde et al., 1998) und Reduzierung der Protein-Synthese (Lucocq et al., 1991; Redpath and Proud, 1989). Vereinzelt ist jedoch auch eine durch OA verstärkte Sekretion von Proteinen beschrieben (da Cruz e Silva EF et al., 1995; Pshenichkin and Wise, 1995).

Eine konzentrations- und zeitabhängige Reduzierung der Zellproliferation und Induzierung von Apoptose in OA-behandelten Zellen wurde ebenfalls beobachtet (Fieber et al., 2012; Hanana et al., 2012; Haneji et al., 2013; Opsahl et al., 2013).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Pathogenese einer Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion beruht hauptsächlich auf den Folgen der Immunantwort des Wirtes gegen HBV-infizierte Hepatozyten. In früheren Studien mit transgenen Mäusen wurde jedoch gezeigt, dass auch die HBV-Oberflächenproteine direkt schwere Leberschädigungen (auch Zelltod von einzelnen Hepatozyten), sekundäre Entzündungsprozesse und Hepatokarzinogenese induzieren können (Chisari et al., 1987; Chisari et al., 1989). Die Expression dieser Proteine führte zu einer intrazellulären toxischen Akkumulierung und Aggregatbildung von LHBs und HBsAg im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Maushepatozyten (Chisari et al., 1986). Diese LHBs- und HBsAg-Aggregate finden sich auch innerhalb von humanen Hepatozyten bei chronisch mit HBV infizierten Patienten (Iwai et al., 1988). Ein charakteristisches Kennzeichen anderer chronischer Lebererkrankungen, wie z.B. die der alkoholischen (ASH) und nichtalkoholischen Form der Steatohepatitis (NASH), sind Mallory-Denk-Körperchen (MDB), die intrazelluläre und überwiegend hyperphosphorylierte Aggregate aus Zytokeratinen (CK) in Hepatozyten darstellen (Strnad et al., 2008). Bei der chronischen Hepatitis B und auch bei anderen Lebererkrankungen korreliert eine vermehrte CK18-Phosphorylierung mit einem schwereren Krankheitsverlauf (Shi et al., 2010; Toivola et al., 2004), da die zytoprotektiven und anti-apoptotischen Funktionen der Zytokeratine eingeschränkt sind (Strnad et al., 2012).

Vor diesem Hintergrund sollte ein für HBs-Proteine transgenes *in-vitro* Zellkulturmodell geschaffen werden. Damit sollte u.a. die Frage beantwortet werden, ob die intrazelluläre Verteilung der HBs-Proteine, insbesondere des LHBs, durch CK sowie andere Zytoskelett-Komponenten wie Mikrofilamente (MF) und Mikrotubuli (MT) beeinflusst wird. Dazu sollten die DNA-Sequenzen von SHBs und LHBs sowie des LHBs/HBx-Konstrukts, welches auch in o.g. HBs-transgenen Mäusen vorliegt, in lentivirale Vektoren separat voneinander kloniert werden. Nach Herstellung infektiöser Lentiviren sollten mit diesen die Hepatozyten-Zelllinien Huh7 und AML-12 sowie die Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 stabil transduziert werden. Das verwendete lentivirale System (Tet-On) sollte eine mit Doxzyklin (Dox) feinregulierbare Expression der HBs-Proteine erlauben, um etwaige toxische Effekte der Proteine zu kontrollieren. Mit Immunfluoreszenz-Färbungen sollte die subzelluläre Lokalisierung und Verteilung der HBs-Proteine analysiert werden. Ein möglicher Einfluss der CK, MF und MT hierauf sollte mit auf diese Komponenten selektiv depolymerisierend-wirkenden Substanzen wie Okadainsäure (OA), Cytochalasin D (CytoD) und Nocodazol (Noc) getestet werden. Etwaige Kolokalisationen und Interaktionen der HBs-Proteine mit dem Zytoskelett sollten



durch verschiedene Verfahren wie z.B. Konfokal-Mikroskopie und *Proximity Ligation Assay* bestätigt bzw. ausgeschlossen werden.

Zytokeratine weisen vielfältige Funktionen und Eigenschaften auf. Hier sind z.B. die Beteiligung an Signaltransduktionen, Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität von Epithelzellen, die eine wichtige Rolle bei der HBV-Infektion einnimmt (Schulze et al., 2012), die Dynamik von Keratinfilamenten (sog. Keratinzyklus) und die Verknüpfung mit MF und MT zu nennen. MT sind z.B. am Transport der HBV-Nukleokaspide zum Zellkern der Wirtszelle beteiligt (Rabe et al., 2006). Zudem sind eine Reihe von Keratin-Pathogen-Interaktionen, wie auch bei Hepatitis-Viren beschrieben, die einen direkten Einfluss von CK auf die Infektion, Replikation oder Freisetzung der Pathogene aus den Wirtszellen zeigen (Kapitel 1.2.4.4). CK8/18-Proteine liegen nicht nur intrazellulär in Hepatozyten vor, sondern lassen sich auch im menschlichen Blut nachweisen. Erhöhte Konzentrationen finden sich insbesondere in Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, die zu Nekrose und Apoptose von Hepatozyten führen (Strnad et al., 2012).

Vor diesem Hintergrund sollte der Einfluss von extrazellulären und intrazellulären CK8 und CK18 auf die HBV-Infektion und HBsAg-Sekretion durch *in vitro* HBV-Infektionsexperimente untersucht werden. Dazu sollte das in der HBV-Forschung etablierte HBV-Infektionssystem mit primären Hepatozyten, isoliert aus südostasiatischen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*), eingesetzt werden. Falls möglich, sollten diese Ergebnisse über eine spezifische Herunterregulierung von CK18 bzw. CK8 in z.B. HBV-infizierbaren Hepatozyten-Zelllinien mittels RNA-Interferenz bestätigt werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte und technische Hilfsmittel

#### Elektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Fa. Carl-Roth, Karlsruhe
CCD-Kamera Infinity2	Fa. Lumenera, Canada
Elektrophorese-Netzgerät Consort EV243	Fa. AlphaMetrix Biotech, Rödermark
Mikrowelle	Fa. Severin, Sundern
UV-Transilluminator LAMAG Reprostar 3	Fa. Omicron, England

#### ELISA

ELISA-Reader EL808 + Software Gen5 (Vers.1.05.11)	Fa. BioTek, Bad Friedrichshall
ELISA-Reader Fusion	Fa. Packard Bioscience, USA

#### PCR-Geräte

Thermocycler T3000	Fa. Biometra, Göttingen
Mastercycler gradient	Fa. Eppendorf, Hamburg
Real-time PCR, StepOnePlus (StepOne Software v2.2.2)	Fa. Applied Biosystems, USA

#### Mikroskopie

Phasenkontrastmikroskop DMIL	Fa. Leica, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop DMRB + UV (ebq 100)	Fa. Leica, Wetzlar
Digitalkamera	Fa. Nikon, Japan

#### UV-Spektroskopie

Fotometer NanoDrop 2000	Fa. Thermo Scientific, USA
Fotometer Picodrop	Fa. Biozym Scientific, Oldendorf

#### Waagen

Analysenwaage A200S	Fa. Sartorius, Göttingen
Tischwaage FA-1500-2	Fa. Faust, Schaffhausen

**Western Blotting**

Elektrophorese-Kammer Multigel	Fa. Biometra, Göttingen
Röntgenfilm-Entwicklungs-Gerät AGFA CP1000	Fa. AGFA, Mortsel (Belgien)
Semi-Dry-Fastblot B44	Fa. Whatman, Biometra

**Zellkulturgeräte /-einrichtungen**

Kryo-Einfrierbehälter	Fa. neo-lab, Heidelberg
Zentrifuge GS-6KR	Fa. Beckman, USA
Zell-Inkubator IG 150	Fa. JOUAN, Unterhachingen
Zellkultur-Sterilwerkbank HBB 2448	Fa. Heraeus Instruments, Hanau

**Sonstiges**

Autoklav 75S	Fa. HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Bakterienschüttler SI-300R	Fa. Lab.Companion / Jeio Tech
Homogenisierer Ultra-Turrax T8	Fa. IKA-Werke, Staufen
Konfokal-Mikroskop TCS SP5 X	Fa. Leica, Wetzlar
Kühl-Tischzentrifuge Mikro 200R	Fa. Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer	Fa. IKA-Werke, Staufen
pH-Meßgerät 632	Fa. Metrohm, Schweiz
Pipetten	Fa. Gilson, Middleton/USA
Pipettierhilfe	Fa. Integra Biosciences, Fernwald
ProteOn™ XPR36 Protein Interaction Array System	Fa. Bio-rad, USA
Reinstwasseranlage Milli-Q Biocel und Elix 3	Fa. Merck Millipore, Darmstadt
Rüttler Vibrax VXR basic	Fa. IKA-Werke, Staufen
Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf, Hamburg
Ultra-Zentrifuge + SW 41 Ti-Rotor	Fa. Beckman, USA
Vortexer (Kat. Nr. 7-2020)	Fa. neo-Lab, Heidelberg
Wippschüttler (Kat. Nr.444-0142)	Fa. VWR, Darmstadt
Zentrifuge CR422	Fa. JOUAN, Unterhachingen

## 2.2 Verbrauchsmaterial:

### Western Blotting

Blotting-Membran Immobilon-P	Fa. Millipore, Wiesbaden
Entwicklungsfilme CL-Xposure (5x7 inches)	Fa. Thermo Scientific, USA
Filmkassette Spezial 200 (18 x 24 cm)	Fa. Rego X-ray, Augsburg
Gel-Blotting Papier	Fa. VWR, Darmstadt

### Zellkultur

Deckgläser, rund, Ø12 mm	Fa. Langenbrinck, Emmendingen
Kryoröhrchen 2 ml	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Multiwellplatten 6-, 12-, 24- und 96-Well	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen, Ø 10cm und 15cm	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Standard-Objektträger	Fa. Langenbrinck, Emmendingen
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Ultrazentrifugations-Röhrchen (Polypropylen)	Fa. Beckman, USA
Zellschaber	Fa. Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugen-Röhrchen, 15 und 50 ml	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

### Sonstige Verbrauchsmaterialien

Glasbehälter (Bechergläser, Meßzylinder)	Fa. Schott, Mainz
Nunc MaxiSorp (96-Multiwell-Platten)	Fa. Thermo Scientific, USA
Petrischalen (Bakteriologie)	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl und 1000 µl	Fa. Sarstedt, Nürnberg
ProteOn Sample Vials	Fa. Bio-rad, USA
ProteOn GLM Sensor Chip	Fa. Bio-rad, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol p.A.	Fa. Sigma-Aldrich (33539)
4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Fa. Applichem (A1001,0010)

---

Agarose (Broad Range)	Fa. Carl Roth (T846.3)
Albumin ( <i>bovine</i> ), Fraktion V (ELISA <i>grade</i> )	Fa. Merck (126593)
Ampicillin	Fa. Carl Roth (HP62.1)
Complete Mini, EDTA- <i>free</i> Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Fa. Roche (11836170001)
Dithiothreitol	Fa. Carl-Roth (6908.3)
DNA-Längenmarker für Agarose-Gele	Fa. Fermentas (SM1293)
Einbettmedium für Immunfluoreszenz	Fa. Dako (S3023)
Essigsäure (100%), p.A.	Fa. Merck (1.00063.1011)
Ethanol 99,9%, vergällt	Fa. Berkel AHK (2522P)
Ethanol 99,9% p.A.	Th. Geyer (2246.2500)
Gel Auftragspuffer, blau (6X)	New England Biolabs (B7021S)
LB-Agar	Fa. Carl-Roth (X969.1)
LB-Medium	Fa. Carl-Roth (X968.1)
Methanol p.A.	Fa. Sigma-Aldrich (32213)
Methylammoniumchlorid	Fa. Merck (8.06020.0000)
Methylenblau	Fa. Merck (159270)
MgCl <sub>2</sub> Lösung (1 M)	Fa. Sigma-Aldrich (M1028)
Proteinlängenmarker für Western Blotting	Fa. Thermo F. Scientific (26620)
PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor Tabletten	Fa. Roche (04906845001)
Spectinomycin	Fa. AppliChem (A3834,0001)
Streptavidin-HRP (high sensitivity)	Fa. Thermo F. Scientific (21130)
TAE-Puffer-Konzentrat (50x)	Fa. GIBCO (24710-030)
TMB-Substrat für ELISA	Fa. RnD Systems (DY999)
Tween20	Fa. Sigma-Aldrich (P7949)
Xfect Transfection Reagent	Fa. Clontech (631317)

Falls nicht aufgelistet, stammten die Chemikalien / Reagenzien (Qualität mind. "reinst" oder „für die Molekularbiologie“) von der Fa. Carl-Roth, Karlsruhe; Fa. Merck, Darmstadt bzw. der Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen.

## 2.4 Medien und Zusätze für Zellkultur

Capsosfungin (Acetat)	Fa. Cancidas / MSD SHARP & DOHME, Haar
Collagen-I (rat tail)	Fa. Corning (354236)
Cytochalasin D	Fa. Sigma-Aldrich (C8273)
DMEM	Fa. PAN-Biotech (P04-3609)
DMEM Ø Phenolrot	Fa. PAN-Biotech (P04-03588)
DMEM/F-12 (1:1)	Fa. PAN-Biotech (P04-41252)
Doxyzyklin	Fa. Clontech (631311)
Fötales Kälberserum (Tetrazyklin-frei)	Fa. PAN-Biotech (P30-3602)
Geneticin-disulfat (G418)	Fa. Carl-Roth (0239.3)
Hepatozyten-Wachstumsmedium (HGM)	Med. Virologie, Gießen, AG Glebe
Nocodazol	Fa. Merck (487928)
Okadainsäure	Fa. Santa Cruz (sc-3513)
Okadainsäure (InSolution)	Fa. Merck (495609)
Penicillin / Streptomycin, 100x	Fa. PAN-Biotech (P06-07100)
Puromycin	Fa. Carl-Roth (0240.3)
RPMI 1640	Fa. Sigma-Aldrich (R8758)
Trypsin / EDTA, Ø Ca/Mg (10x)	Fa. PAN-Biotech (P10-023100)

## 2.5 Rekombinante Proteine (human) und Peptide

Keratin 8, 100 µg	Fa. PROGEN, Heidelberg (62213)
Keratin 18, 100 µg	Fa. PROGEN, Heidelberg (62217)

präS1-Peptid (N-terminal myristyliert)	Fa. Biosynthesis, USA
Aminosäure-Sequenz: Myr-GQNLSTSNPL	GFFPDHQLDP AFRANTANPD
WDFNPNKDTW PDANKVG SA WSHPQFEK	

Das N-terminale Glycin ist wie die präS1-Domäne des LHBs myristyliert (Myr). Die letzten zehn C-terminalen Aminosäuren sind ein Spacer (SA) sowie ein Strep-Tag (WSHPQFEK). Das präS1-Peptid wurde freundlicherweise von der AG Glebe (Med. Virologie, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt.

## 2.6 shRNA für RNA-Interferenz

KRT18 SureSilencing shRNA Plasmide Fa. Qiagen (KH00452P)

## 2.7 Enzyme

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Fa. Thermo F. Scientific (F530s)  
 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Fa. Life Technologies (11733-046)  
 Restriktionsenzym Mlu-I Fa. NEB (R0198S)  
 Restriktionsenzym Not-I Fa. NEB (R0189S)  
 Shrimp Alkaline Phosphatase Fa. Thermo F. Scientific (EF0511)  
 T4-DNA-Ligase Fa. Thermo F. Scientific (EL0011)

## 2.8 Kits

Endo-free Plasmid Maxi Kit Fa. Qiagen (12362)  
 Enzygnost 6.0 Fa. Siemens Heathcare (OPFM035)  
 Enzygnost, Zusatzreagenzien Fa. Siemens Heathcare (OUVP17)  
 iScript cDNA Synthese Kit Fa. Bio-rad, (170-8890)  
 Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression Syst. Fa. Clontech (632162)  
 QIAquick Gel Extraction Kit Fa. Qiagen (28704)  
 QIAquick PCR Purification Kit Fa. Qiagen (28104)  
 QIAprep Spin Miniprep Kit Fa. Qiagen (27104)  
 QIAamp Viral RNA Mini Kit Fa. Qiagen (52904)  
 RNeasy Mini Kit Fa. Qiagen (74104)

### Proximity Ligation Assay (PLA):

DUOLink InSitu PLA Probe  $\alpha$ -Mouse Plus Fa. Sigma-Aldrich (DUO92001)  
 DUOLink InSitu PLA Probe  $\alpha$ -Rabbit Minus (DUO92005)  
 DUOLink InSitu Wash Buffers, Fluorescence (DUO82049)  
 DUOLink InSitu Mounting Med with DAPI (DUO82040)  
 DUOLink InSitu Detection Reagent green (DUO92014)

## 2.9 Antikörper

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
β-Aktin (Kaninchen)	Fa. Cell Signaling (4970)
BiP/GRP 78 (N-20) (polyklonal Ziege)	Fa. Santa Cruz (sc-1050)
HBs-biotinyliert (monoklonal Maus)	Fa. Siemens Heathcare (Enzygnost 6.0)
HBsAg (monoklonal Maus), Klon HB5	Fa. EXBIO (11-329-C025)
HBsAg (polyklonal Ziege)	Fa. IMGENEX (IMG-80013)
HBsAg (polyklonal Kaninchen)	Fa. Fitzgerald (20-HR20)
HBsAg (monoklonal Maus), C20/02*	Med. Virologie, AG Glebe, JLU Gießen
LHBs (monoklonal Maus), MA18/07**	Med. Virologie, AG Glebe, JLU Gießen
Keratin K8 (polyklonal Meerschweinchen)	Fa. PROGEN (GP-K8)
Keratin K18 (monoklonal Maus)	Fa. PROGEN (61028)
PAN-Keratin (polyklonal Kaninchen)	Fa. Dako (Z062201-2)
Sec61β (polyklonal Kaninchen)	Prof. Zimmermann, Homberg
α-Tubulin (Maus)	Fa. Santa Cruz (sc-5286)
α-Tubulin (Kaninchen)	Fa. Cell Signaling (2144)

\* erkennt konformationsabhängig die a-Determinante von SHBs

\*\*erkennt konformationsunabhängig AS 31-34 von prä-S1 (Heermann et al., 1984)

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft
Alexa Fluor 555 goat α guinea pig IgG (H+L)	Molecular probes/Invitrogen (A-21435)
Alexa Fluor goat α mouse IgG, 488	Molecular probes/Invitrogen (A11017)
Alexa Fluor goat α mouse IgG, 568	Molecular probes/Invitrogen (A11019)
Alexa Fluor goat α rabbit IgG, 488	Molecular probes/Invitrogen (A11008)
Alexa Fluor goat α rabbit IgG, 568	Molecular probes/Invitrogen (A21069)
Alexa Fluor donkey α goat IgG, 488	Molecular probes/Invitrogen (A11055)
Alexa Fluor donkey α goat IgG, 568	Molecular probes/Invitrogen (A11057)
Anti Rabbit IgG HRP	Cell Signaling, (7074)
Anti mouse IgG HRP	Cell Signaling (7076)
goat α guinea pig IgG HRP	Santa Cruz (sc2438)



## 2.10 Plasmide

### pLVX Tight-Puro

In die *Multiple Cloning Site* (MCS) dieses lentivirale Transferplasmids (Bestandteils des Kits „Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression System“, Fa. Clontech), wurden die DNA-Sequenzen des mCherry-Proteins bzw. der HBV-Oberflächenproteine inkloniert. Vor der MCS sitzt das Tetrazyklin-Response-Element (TRE), das aus der Tetrazyklin-Operator-Sequenz (tet-O) und einem modifizierten CMV-Promotor besteht. Die Expression dieser Sequenzen wird über den Tetrazyklin-abhängigen transkriptionellen Transaktivator (tTA), kodiert von dem Regulatorplasmid pLVX Tet-On Advanced (s.u.), und Doxyzyklin (Dox) gesteuert. Dies erlaubt eine regulierbare Expression der Transgene durch verschiedene Dox-Konzentrationen (sog. „Tet-On“-System). Neben lentiviralen Sequenzen (z.B. *Rev responsive element* (RRE), *central polypurine tract* (cPPT), *woodchuck posttranscriptional regulatory element* (WRPE)) besitzt es zudem ein bakterielles und ein eukaryontisches Resistenzgen zur Selektion mit den Antibiotika Ampicillin und Puromycin.

### pLVX Tet-On Advanced

Dieses lentivirale Regulatorplasmid stammt ebenfalls aus dem Kit „Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression System“ und exprimiert konstitutiv einen Tetrazyklin-abhängigen transkriptionellen Transaktivator (tTA). Dieser bindet nur in Anwesenheit von Dox an die Tetrazyklin-Operator-Sequenz (tet-O) aus dem Plasmid pLVX Tight-Puro (s.o.) und führt daraufhin zur Expression des danach geschalteten Transgens. In Abwesenheit von Dox unterbleibt die Expression des Transgens. Neben lentiviralen Sequenzen (z.B. RRE, cPPT, WPRE) enthält es zur Selektion Resistenzgene gegen Ampicillin-, Geneticin (G418) und Hygromycin.

### Lenti-X-HTX-Verpackungsplasmide

Dieser Plasmid-Mix ist Bestandteil des Kits „Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression System“, Fa. Clontech und besteht aus sechs verschiedenen Plasmiden, deren genauer Aufbau, Sequenz und Mengenverhältnis dem Kunden aus kommerziellen Gründen nicht zugänglich gemacht werden. Die Plasmide enthalten u.a. virale regulatorische Sequenzen sowie für

Strukturproteine, reverse Transkriptase, Integrase und für das Hüllprotein des Virus (Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G)).

### **pCH9-3091**

Dieses Plasmid ist ein pBR322-Derivat mit CMV-Promoter und enthält ein 1,1faches Überlängenkonstrukt des kompletten HBV-Genoms vom Genotyp D (Serotyp ayw1, GenBankID: DQ464168.1, Junker-Niepmann et al., 1990). Das Plasmid wurde freundlicherweise von der AG Glebe (Med. Virologie, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt. Aus diesem Plasmid stammen die HBV-Oberflächen-Sequenzen, die in das lentivirale Transferplasmid pLVX Tight-Puro inkloniert wurden.

### **pCH9-3091\_ohne\_CMV**

Dieses Plasmid (5146 bp) ist ein Derivat des Plasmids pCH9-3091. Im Gegensatz zu diesem besitzt es keinen CMV-Enhancer und CMV-Promotor. Außerdem fehlt die prä-core-Sequenz. Die Expression der HBV-Oberflächenproteine und HBx wird damit ausschließlich durch den HBV-Promotor(en) bewirkt. Dies führt zu einer Expression dieser Proteine im natürlichen Verhältnis (persönliche Mitteilung von PD Dr. Glebe et al.).

### **pCH-9-HBV-LHBs(XXS)**

Dieses Plasmid ist bis auf je eine Basenmutation in den Startcodons der präS1- und präS2-Domäne des LHBs mit dem Plasmid pCH9-3091\_ohne\_CMV identisch. Dadurch exprimieren transfizierte Zellen nur das SHBs-, aber nicht das MHBs- und LHBs-Protein (persönliche Mitteilung von PD Dr. Glebe et al.).

### **pcZ mCherry**

Es handelt sich um das Plasmid pcDNA3.1+, das den mCherry-ORF in der MCS enthält. Es besitzt eine Zeomycin-Resistenz. Das Plasmid wurde freundlicherweise von der AG Glebe (Med. Virologie, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt und wurde zur Etablierung der

lentiviralen Transduktionen auf 293T Zellen eingesetzt. Die mCherry-Sequenz kodiert für ein monomeres rot-fluoreszierendes Protein mit einer max. Absorption bei 587 nm und max. Emission bei 610 nm. Es wird sehr schnell nach Transkriptionsstart gebildet und ist sehr photostabil (Shaner et al., 2004).

### **pEGFP-Golgi**

Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Form des Originalvektors pEYFP-Golgi von der Fa. Clontech (6909-1), bei dem die EYFP- gegen die EGFP-Sequenz aus dem pEGFP-1-Vektor (Kat. Nr. 6086-1, Fa. Clontech) über die Restriktionsschnittstellen Age I und Not I ausgetauscht wurde (durch PD Dr. Martin Roderfeld; eigene AG). Es kodiert für ein Fusionsprotein aus dem EGFP-Protein (max. Absorption/Emission: 484/510 nm) und der N-terminalen Region (81 AS) der humanen  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase (GT). Diese Region der GT enthält ein Membranverankerungs-Signalpeptid, dass das Fusionsprotein zu der transmedialen Region des Golgi-Apparats leitet und somit als Golgi-Marker dient (Teasdale et al., 1994).

### **pCMV BiP-Myc-KDEL-wt**

Dieses Plasmid wurde von der Fa. Addgene (Kat. Nr. 27164) bezogen. Es handelt sich um ein p-CMV-Plasmid (high copy), das die humane Sequenz des Proteins BiP (*Binding immunoglobulin protein*) zusammen mit einem sog. „Myc-tag“ und der ER-Lokalisationssequenz KDEL am carboxyterminalen Ende enthält. Es besitzt ein Resistenzgen für Ampicillin, aber keines zur Selektion in Säugetierzellen.

### **Keratin 18 (pcDNA3)**

Dieses Plasmid wurde von der Fa. Addgene (Kat. Nr. 18064) bezogen. Es handelt sich um ein Derivat des Plasmids pcDNA3 (Fa. Invitrogen), in das die humane Sequenz des Proteins CK18 inkloniert wurde. In Säugetierzellen führt es konstitutiv zur Expression von CK18. Neben einem bakteriellen Resistenzgen (Ampicillin) besitzt es zur Selektion in Eukaryonten ein weiteres für Neomycin (G418).

## SureSilencing shRNA Plasmide gegen CK18

Dieses Produkt von der Fa. Qiagen bestand aus insg. fünf verschiedenen Plasmiden: Vier mit einer *short hairpin* (sh)-RNA-Sequenz gegen CK18 und einem Negativ-Kontrollplasmid (NC) mit einer shRNA-Sequenz, die keine Zielsequenz im humanen Genom aufwies. Nur eine der Plasmide gegen CK18 (Nr. 2) wurde im Vorversuch als effektiv für einen CK18-Knockdown in Huh7-Zellen getestet. Alle Plasmide waren ausgestattet mit einem Ampicillin- und einem Puromycin-Resistenzgen.

shRNA-Sequenz Nr. 1  $\alpha$  CK18: 5'- ttcgaaataactgtggacaat -3'

shRNA-Sequenz Nr. 2  $\alpha$  CK18: 5'- gtactggtctcagcagattga -3'

shRNA-Sequenz Nr. 3  $\alpha$  CK18: 5'- cagagactggagccattactt -3'

shRNA-Sequenz Nr. 4  $\alpha$  CK18: 5'- cgacctggactccatgagaaa-3'

shRNA-Sequenz NC: 5'- ggaatctcattcgatgcatac -3'

## 2.11 Primer

Tabelle 4: Klonierungsprimer

Name	Anhang (5'-> 3')*	Genspezifische Sequenz (5'-> 3')
Cherry-tight fw	gtcgacgcgccgc	cctacgtctcatcagcatgg
Cherry-tight rev	gctagcacgct	ccactgtgctggatatctgc
Galibert-L-fw	gtcgacgcgccgc	agcatggggcagaatcttc
Galibert-X-rev	gctagcacgct	cttgaggcttgaacagtagg
Galibert-L-fw	gtcgacgcgccgc	agcatggggcagaatcttc
Galibert-SL-rev	gctagcacgct	cccatctctttgtttgtagg
Galibert-S-fw	gtcgacgcgccgc	caatctctcgaggattggg
Galibert-SL-rev	gctagcacgct	cccatctctttgtttgtagg

\* enthalten Restriktionsschnittstellen für Not-I bzw. Mlu-I

Tabelle 5: Sequenzierprimer

Name	Sequenz (5' -> 3')	Lokalisation
Lenti seq fw	gaacgtatgtcgaggtaggc	vor der MCS des pLVX-Tight Puro Plasmids
Lenti seq rev	acttgtagcgccaagtgc	nach der MCS des pLVX-Tight Puro Plasmids
S6-sense	tggatgtgtctgcggc	im S-ORF
Gali-Seq-rev	gaattagaggacaaacgggc	Ende S-ORF
Gali-Seq-fw	ttctcgccaacttacaaggc	vor X-ORF

Tabelle 6: Primer für Echtzeit-PCR

Name	Sequenz (5' -> 3')
RRE for	gttcttgggagcagcaggaa
RRE rev	aggtatctttccacagccagga
CK18 for	ggaagatggcgaggactttaatcttgg
CK18 rev	gtctcagacaccactttgcatccac
GAPDH for	aaaaacctgccaatatgatg
GAPDH rev	gtagccaaattcgttgcatac

## 2.12 Primäre Zellen

### Primäre Tupaia Hepatozyten (PTH)

Für die durchgeführten HBV-Infektionsversuche wurden PTH verwendet, die freundlicherweise von der AG Glebe (Med. Virologie, JLU Gießen) zur Verfügung gestellt wurden. Die PTH wurden aus den Lebern von südostasiatischen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) isoliert, die aus der Tupaiazucht der JLU Gießen stammten.

## 2.13 Zelllinien

### AML-12

Diese differenzierte, aber nicht transformierte Zelllinie stammt aus Hepatozyten einer *Transforming-growth-factor-alpha* (TGF- $\alpha$ )-transgenen (humane Sequenz), männlichen Maus (CD1-Stamm, MT42-Linie). Die Zellen weisen typische Eigenschaften von Hepatozyten auf wie z.B. Peroxisomen, Gallengang-ähnliche Strukturen und produzieren leberspezifische Proteine (z.B. Albumin,  $\alpha$ 1-anti-Trypsin, Transferrin). Neben niedrigen murinen TGF- $\alpha$

Mengen, produzieren sie hohe Mengen an humanen TGF- $\alpha$ . Eine Besonderheit ist, dass die Produktion leberspezifischer Proteine zwar mit der Zeit in Kultur zurückgeht, sich aber wieder durch Haltung in serumfreien Medium reaktivieren lässt (Wu et al., 1994).

### **Huh7**

Diese immortal wachsende Zelllinie wurde aus einem differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 57-jährigen männlichen Japaners gewonnen (Nakabayashi et al., 1982). Sie produziert ebenfalls gewisse Mengen an leberspezifischen Proteinen.

### **NIH3T3**

Diese immortale, aber nicht transformierte Standard-Fibroblasten-Zelllinie stammt aus embryonalen Maus-Fibroblasten. NIH steht für „National Institute for Health“, 3T3 steht als Abkürzung für die Aussaatbedingungen – alle **3** Tage Passagieren (**T**ransfer) mit **3** x 10<sup>5</sup> / 20 cm<sup>2</sup>), unter denen die damals noch primären Fibroblasten nach 20 bis 30 Generationen spontan zu einer unsterblich wachsenden Zelllinie mit stabiler Wachstumsrate etabliert wurden.

## **2.14 Bakterienstämme**

### **One Shot® Mach1™ T1 E. coli**

Diese chemisch kompetenten Bakterienzellen, ursprünglich von der Fa. Invitrogen (C8620-03), wurden von der AG Glebe für die dort stattgefundenen Klonierungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie zeichnen sich durch eine sehr hohe Teilungsrate (ca. 50 min) aus.

### **NEB 5-alpha kompetente E. coli**

Diese chemisch kompetenten Bakterienzellen von der Fa. New England Biolabs (Kat. Nr. C2988 J) wurden in der eigenen Arbeitsgruppe (AG Roeb) für die Klonierungen verwendet.

## 2.15 Puffer, Lösungen und Medien

Das verwendete Wasser (ddH<sub>2</sub>O) für die Puffer und Lösungen wurde von einer Reinstwasseranlage (Millipore) mit 0,2 µM Sterilfilter entnommen. Wenn nötig, wurden die Puffer und Lösungen autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

### 2.15.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

#### **DAPI-Lösung**

10 mM in ddH<sub>2</sub>O.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen: 5minütige Inkubation mit 10 µM DAPI in 1xPBS.

#### **10x PBS**

80 g NaCl (=1,37 M)

2 g KCl (=27 mM)

2,45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (=18 mM)

11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (=81 mM)

In ca. 900 ml ddH<sub>2</sub>O auflösen, ad 1L ddH<sub>2</sub>O. pH-Wert auf 7,4 einstellen mit 1 M HCl.

#### **1x PBS**

100 ml 10xPBS + 900 ml ddH<sub>2</sub>O.

Für Immunfluoreszenz: Zugabe von je 1 mM Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2</sup>

Für Antikörper-Inkubation und Waschen zusätzlich plus 0,1% TW20 (= PBS-T)

#### **ELISA-Beschichtungspuffer (NaPP)**

77,4 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

22,6 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1 L ddH<sub>2</sub>O (= pH-Wert 7,4)

**Methylenblaulösung**

0,02% in 1x TAE-Puffer

**1x Zell-Lysis-Puffer (ELISA)**

1% Triton-X-100 in 1x PBS

**2.15.2 Protein-Gelelektrophorese****1x Zell-Lysis-Puffer (Western Blotting)**

1% SDS

Je eine Tabelle "Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail" und "PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor" per 10 ml

**10x Elektrophorese Laufpuffer (SDS-PAGE)**

10 g SDS (=1% w/v bzw. 35 mM)

30,3 g Tris-base (=0,25 M)

144 g Glycin (=1,92 M)

ad 1 L ddH<sub>2</sub>O (pH 8,3; keine pH-Wert-Einstellung nötig)

**4x Tris-Cl / SDS, pH 6,8 (SDS-PAGE)**

6,05 g Tris-base (=0,5 M) in 40 ml ddH<sub>2</sub>O lösen

mit 1 N HCl auf pH 6,8 bringen

ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O

Lösung filtrieren (0,45 µm)

0,4 g SDS (=0,4%) zufügen

(4°C-Lagerung)



**6x SDS / Proteinproben-Puffer (SDS-PAGE)**

7 ml 4x Tris-HCl / SDS, pH 6,8 (s. vor)

3,8 g (~ 3 ml) Glycerin

1 g SDS (=10%)

0,93 g DTT (=0,6 M)

1,2 mg Bromphenolblau

ad 10 ml ddH<sub>2</sub>O

(aliquotiert bei -70 °C lagern)

**SDS-PAGE Trenngel-Lösung (12% PAA)**

8 ml Polyacrylamid (PAA)-Lösung

5 ml 4x Trenngelpuffer

7 ml ddH<sub>2</sub>O

Direkt vor dem Gießen 200 µl Ammoniumpersulfat (15% APS) und 20 µl TEMED zufügen.

**SDS-PAGE Sammelgel-Lösung (5,7% PAA)**

1,32 ml Polyacrylamid (PAA)-Lösung

1,66 ml 4xSammelgelpuffer

4 ml ddH<sub>2</sub>O

Direkt vor dem Gießen 80 µl Ammoniumpersulfat (15% APS) und 8 µl TEMED zufügen.

**4x Trenngelpuffer; pH 8,8 (SDS-PAGE)**

375 ml 2 M Tris/HCl; pH 8,8 (=1,5 M)

10 ml 20% SDS (=0,4%)

ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

(4°C-Lagerung)

**4x Sammelgelpuffer; pH 6,8 (SDS-PAGE)**

125 ml 2 M Tris/HCL, pH 6,8 (=0,5 M)

10 ml 20% SDS (=0,4%)

ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O

(4°C-Lagerung)

**2.15.3 Western Blotting****Anode 1-Puffer (Semi-Dry Blotting)**

75 ml 2 M Tris Base (=0,3 M)

100 ml Methanol (=20%)

ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 10,4; keine pH-Einstellung nötig)

(4°C-Lagerung)

**Anode 2-Puffer (Semi-Dry Blotting)**

6,25 ml 2 M Tris Base (=25 mM)

100 ml Methanol (=20%)

ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 10,4; keine pH-Einstellung nötig)

(4°C-Lagerung)

**Kathoden-Puffer (Semi-Dry Blotting)**

2,63 g ε-Amino-Caprone Säure (=40 mM)

100 ml MeOH (=20%)

250 µl 20% SDS (=0,01%)

ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O (pH 7,6; keine pH-Wert-Einstellung nötig)

(4°C-Lagerung)

**ECL-Entwicklungslösung A**

200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)

50 mg Luminol (Sigma A4685)

(4°C-Lagerung)

**ECL-Entwicklungslösung B**

11 mg para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma C9008)

in 10 ml DMSO lösen

(Lagerung bei RT im Dunkeln)

**Medium stripping buffer**

15 g Glycin

1 g SDS (=0,1%)

10 ml Tween 20

auf pH 2,2 einstellen (37% HCl)

ad 1L ddH<sub>2</sub>O

(4°C-Lagerung)

**2.15.4 Medien****Hepatozyten-Wachstumsmedium (HGM)**

500 ml DMEM ohne Phenolrot (Gibco, 21063-029)

5 ml ITS-Mix (Gibco, 41400-045)

1 g BSA Albumin Fraktion V, endotoxinarm (Roth, CP77.1)

5 ml Glutamax I (Gibco, 25030-024)

1 ml Gentamycin (Gibco, 15750-045)

10<sup>-7</sup> M Dexamethason (Sigma, D4902)

Vor Gebrauch noch Caspofungin (1:10000 verdünnen) hinzufügen (Fa. Cancidas, 50 mg Acetat-Form)

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Kulturbedingungen der Zellen**

Alle verwendeten Zellen (293T, AML-12, Huh7, NIH3T3, Primäre Hepatozyten von Tupaia (PTH) wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die 293T Zellen wurden in DMEM-Medium, die anderen Zelllinien in DMEM/F-12- bzw. RPMI 1640-Medium, jeweils supplementiert mit 10% FCS, gehalten. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen wurde diesen Medien prophylaktisch 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Dem Medium von lentiviral transduzierten bzw. mit lentiviralen Konstrukten transfizierten Zellen wurde zusätzlich 600 µg/ml Geneticin (G418) und 2 µg/ml Puromycin als Selektionsantibiotika zugefügt. Zur Expression der HBV-Oberflächenproteine (oder mCherry bei 293T Zellen) wurde zusätzlich für mind. zwei Tage 500 ng/ml Doxozyklin in das Medium gegeben. Während der Transfektionen wurde auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet. PTH wurden in Hepatozyten-Wachstumsmedium (HGM) kultiviert.

#### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Von noch nicht vollständig konfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium abgesaugt, einmal mit sterilem 1x PBS vorsichtig nachgespült und danach die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA in PBS-Puffer von der Petrischale abgelöst. Nach Zugabe von gleichem Volumen an Medium erfolgte eine Zentrifugation bei 300xg für 5 min. Das Zellpellet von einer T75 Zellkulturflasche wurde in einem vorgekühltem Gemisch aus 90% FCS/10% DMSO resuspendiert und die Zellsuspension in drei Kryoröhrchen zu je 1,5 ml pipettiert. Die Röhrchen wurden sofort danach in einem Kryo-Einfrierbehälter Ü/N bei -80°C langsam eingefroren (1°C/min). Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen danach in flüssigem Stickstoff überführt.

Nach maximal 15 Subkultivierungen wurden die Zellen verworfen und eingefrorene Zellen aus dem Stickstofftank entnommen. Die Kryoröhrchen wurden sofort in ein 37°C warmes Wasserbad unter Schwenken gehalten, bis gerade noch ein Eisstückchen innerhalb der Zellsuspension zu sehen war. Die Suspension wurde in ein Falcon-Röhrchen mit Medium

pipettiert und bei etwa 500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in Medium resuspendiert und in T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Bevor sie für Versuche verwendet wurden erfolgte eine Adaption an die Zellkulturbedingungen für mind. zwei Tage.

## 3.2 Klonierungen der lentiviralen Plasmide

### 3.2.1 Amplifikationen zu klonierender Gensequenzen

Aus dem Plasmid pCH9\_3091, das das gesamte HBV-Genom vom Genotyp D, Subtyp ayw (GenBankID DQ464168.1) enthält, wurden die Gensequenzen (s. Anhang) für das kleine (SHBs), das große (LHBs) und das große HBV-Oberflächenprotein zusammen mit dem X-Protein (LHBs/HBx) des HBV mit sequenzspezifischen Primern per PCR herausamplifiziert (Tab. 4, 7, 8, 9). Analog wurde vorgegangen für die mCherry-Sequenz aus dem Plasmid pcZ mCherry. Die Primer besaßen am 5'-Ende zusätzlich kurze angehängte Restriktionsschnittstellen-Sequenzen für die Enzyme Not-I und Mlu-I für die späteren Klonierungen in das lentivirale Transferplasmid (Tab. 4).

**Tabelle 7: PCR-Mastermix**

	<b>µl / Reaktion</b>
Wasser (PCR-grade)	29
5x Phusion HF-Puffer	10
dNTPs (10 nM)	1
Primer forw (10 pmol/µl)	3
Primer rev (10 pmol/µl)	3
DMSO	1,5
DNA	2
Phusion DNA Polymerase	0,5
	total: 50 µl

**Tabelle 8: PCR-Programm**

Zyklus-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen-Anzahl
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	10 s	35
Annealing	X°C	30 s	
Synthese	72°C	X s	
Finale Synthese	72°C	10 min	1

**Tabelle 9: Sequenzspezifische PCR-Bedingungen**

Primer 1	Primer 2	Produkt	Annealing (°C)	Synthese (s)
Cherry-tight forw	Cherry-tight rev	Cherry	65	20
Galibert-S-forw	Galibert-SL-rev	S-ORF	65	20
Galibert-L-forw	Galibert-SL-rev	L-ORF	65	30
Galibert-L-forw	Galibert-X-rev	L und X	64	45

Nach der PCR wurden je 3 µl der Amplifikate mit je 1 µl DNA-Probenpuffer vermischt und zusammen mit einem DNA-Längenmarker auf ein Agarosegel (1% + Ethidiumbromid) aufgetragen. Per Gelelektrophorese (75 V) wurden sie auf Größe und Menge überprüft.

### 3.2.2 Restriktionsenzym-Behandlungen und Aufreinigungen

#### Vektor

4 µg des lentiviralen Transfervektors pLVX Tight-Puro wurde mit je 1 µl der Restriktionsenzyme MluI und NotI und 2 µl *Fast Digest* Puffer in einem Volumen von 20 µl für 1 h bei 37°C restringiert. Danach erfolgte eine Enzym-Inaktivierung für 15 min bei 80°C. Zur Verhinderung einer Religation des Vektors wurde eine Dephosphorylierung der 5'-Phosphat-Enden für 1 h bei 37°C mit je 2,5 µl Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) und

10xSAP-Puffer im Anschluß vorgenommen. Danach erfolgte wieder eine Enzym-Inaktivierung für 20 min bei 80°C zusammen mit Gel-Auftragspuffer (6x).

### **PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden mit dem gesamten restlichen Volumen (47 µl) mittels des QiaQuick PCR Purification Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit je 30 µl EB-Puffer eluiert. Danach erfolgte ein Doppel-Restriktionsverdau vom gesamten Eluatvolumen mit je 2 µl MluI und NotI sowie 4 µl NEB-Puffer 3.1 für 2 h bei 37°C. Die Enzyme wurden im Anschluss für 20 min bei 80°C zusammen mit Gel-Auftragspuffer (6x) inaktiviert.

### **Isolierung und Aufreinigung von restringiertem Vektor und PCR-Produkten**

Die gesamten Volumina an restringiertem Vektor und PCR-Produkten wurden auf einem 0,8% Agarosegel ohne EtBr aufgetragen und die DNA bei 50 V (PCR-Produkte) bzw. 75 V (Vektor) per Gelelektrophorese in TAE-Puffer für ca. 45 min aufgetrennt. Daran schloss sich eine Anfärbung für 15 min in 0,02% Methylenblaulösung an. Anschließend wurde das Gel solange in bidest. Wasser unter leichtem Schütteln entfärbt, bis die DNA-Banden deutlich zu erkennen waren. Diese wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, die Gelstücke mit dem dreifachen Volumen an Puffer QG (QIAquick Gel Extraktion Kit) versetzt und ca. 10 min bei 50°C schüttelnd im Thermomixer bis zur Auflösung inkubiert. Nach Zufügen und Vermischen eines einfachen Gel-Volumens an Isopropanol wurde die DNA mit dem QiaQuick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Elution erfolgte in je 30 µl EB-Puffer. Daran schloß sich zur Mengenabschätzung von Vektor und PCR-Produkten eine Gelelektrophorese (1% Agarose) an.

#### **3.2.3 Ligation und Transformation**

Zur Ligation wurden Vektor und PCR-Produkte in einem Mengenverhältnis (mol/mol) von ca. 1 zu 3 (Vektor zu PCR-Produkt) zu einem Volumen von 10 µl pipettiert, mit 2 µl Ligasepuffer (10x) und 1 µl T4 DNA Ligase versetzt und auf 20 µl Endvolumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die

Ligation erfolgte für 20 min bei RT. Ein Ligationsansatz ohne PCR-Produkt wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Anschließend wurden je 2 µl der Ligationsansätze in je 45 µl kompetente Mach1-Bakterien transformiert. Einer Inkubation auf Eis für 30 min schloss sich ein Hitzeschock für 40 s bei 42°C an. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden die Ansätze mit je 250 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Ampicillin versetzt und für 75 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Jeweils 20 µl und 200 µl pro Ansatz wurden auf LB-Agar-Platten (+ Ampicillin) ausplattiert und Ü/N bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien gepickt und in je 5 ml LB-Medium (+Ampicillin) im Reagenzglas unter Schütteln bei 37°C ca. 5 h inkubiert bis die Lösungen trüb waren. Es folgte eine Isolierung der Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit.

### 3.2.4 Verifizierung der Bakterienklone

Die isolierte Plasmid-DNA der Bakterienklone wurden mit den Restriktionsenzymen MluI und NotI wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben restringiert und auf einem Agarosegel (1%) aufgetrennt. Die Plasmid-DNA von je zwei Klonen der einzelnen Versuchsansätze, die sowohl Vektor als auch einkloniertes PCR-Produkt in der richtigen Länge zeigten, wurden zur Sequenzierung (je 30 µl mit 100 ng/µl) zu der Fa. GATC Biotech (Konstanz) geschickt. Die Sequenzierprimer (Tab. 5) wurden dort ebenfalls zur Synthese in Auftrag gegeben. Sequenzierte Sequenzen (mCherry, SHBs, LHBs, LHBs/HBx) wurden auf ihre Richtig- und Vollständigkeit mit den „Pairwise Sequence Alignment Tools“ der Internetseite „<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>“ (Stand September 2011) überprüft.

### 3.3 Herstellung von lentiviralen Vektoren

Hierzu wurde das „Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression System“ Kit der Fa. Clontech nach Produktanweisung verwendet. Dieses generiert infektiöse, replikationsinkompetente Lentiviren, die bei Transduktion das Transgen stabil ins Wirtsgenom der Zelle integrieren und danach eine mit Doxyzyklin induzierbare und regulierbare Transgen-Expression erlaubt (sog. Tet-On System). Eine Selektion transduzierter Zellen ist mit Puromycin und G418 möglich (Abb. 9).

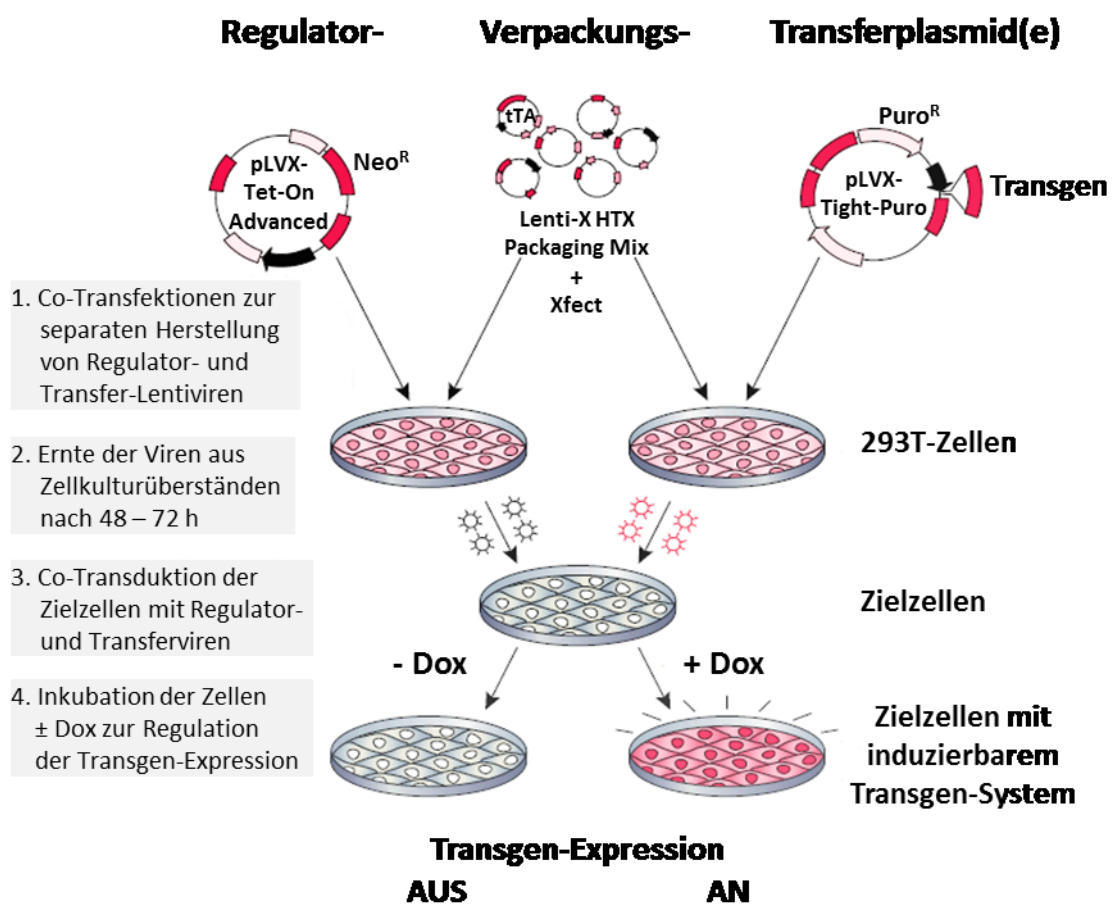


Dafür wurden der lentivirale Regulator-Vektor (Tet-On) und die Transfer-Vektoren hergestellt. Der Regulator-Vektor wurden mittels Cotransfektion des Plasmids pLVX Tet-On Advanced und der Verpackungsplasmide „Lenti-X HTX Packaging Mix“ auf 293T Zellen hergestellt (Abb. 9). Analog wurden die Transfer-Vektoren (Plasmid pLVX Tight-Puro plus inklonierte Transgen-Sequenzen für mCherry, SHBs, LHBs und LHBs/HBx) erzeugt. Zur Cotransfektion wurde das im Kit mitgelieferte Transfektionsreagenz Xfect bei 80% konfluenten 293T-Zellen, ausgesät in Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm), verwendet. Nach ca. 7 h erfolgte ein Mediumwechsel. Am Tag 2 und 3 der Cotransfektion wurden die infektiösen Lentiviren (Tet-On Regulator- und Transfer-Vektoren) durch Abnahme des Zellkulturüberstandes geerntet. Dieser wurde bei 500xg für 10 min zentrifugiert und anschließend durch einen 0,45  $\mu$ m Spritzenfilter filtriert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Danach erfolgte eine vierstündige Ultrazentrifugation in einem Beckman SW41 Ti-Rotor bei 15.000 rpm, 4°C unter Vakuum, überschichtet auf 3 ml einer 20%igen Saccharose-Lösung. Nach Entfernen des Überstandes wurden die pelletierten Viren in ca. einem hundertsten Teil des Ausgangsvolumens mit DMEM-Medium ohne Zusätze versetzt. Die Resuspendierung erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren auf Eis, der sich eine Aliquotierung in 10  $\mu$ l Volumina und -80°C Lagerung anschloss, sofern sie nicht gleich für Transduktionen verwendet wurden. Insbesondere die Ultrazentrifugations-Bedingungen und anschließende Resuspendierung der Viren wurden zunächst mit dem mCherry- und Regulator-Lentivirus für eine nachfolgende Transduktion auf 293T-Zellen optimiert.

### 3.4 Lentivirale Transduktionen

Die Transduktionen fanden in Multi-Well-Zellkultur-Platten (24-Well-Format) statt, in denen am Vortag 293T-, Huh7- bzw. NIH3T3-Zellen mit einer Konfluenz von ca. 75% ausgesät wurden. Zu 300  $\mu$ l DMEM (0.5% FCS, ohne Pen/Strep) pro Well wurden je ca. 25  $\mu$ l an Regulator- und Transfer-Virus hinzupipettiert und bei 1600xg für 30 min (nach Optimierung) zentrifugiert. Im Einzelnen wurden folgende transgene Zellen erzeugt: 293T-Zellen mit mCherry-Sequenz, Huh7- und NIH3T3-Zellen jeweils separat mit SHBs, LHBs- und LHBs/HBx-Sequenz. Nach Ü/N-Inkubation im Inkubator wurden die Zellen mit DMEM-Medium (+ 10% FCS) gewaschen und unter Zugabe von Puromycin (2  $\mu$ g/ml) und G418 (600  $\mu$ g/ml) ins Medium auf transduzierte Zellen selektioniert. Zur Optimierung der Transduktion wurden zunächst 293T-Zellen verwendet, die mit mCherry- und Regulator-

Lentiviren transduziert wurden. Um die Transduktions- und Expressionsrate abzuschätzen, wurden die transduzierten Zellen auf Collagen-beschichteten Glasplättchen in Multi-Well-Zellkultur-Platten ausgesät und die Transgenexpression mit 500 ng/ml Doxzyklin induziert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen fixiert und die Expression der HBV-Oberflächenproteine mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörperfärbungen im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Die mCherry-Expression entsprechend transduzierter Zellen konnte direkt ohne zusätzliche Antikörperfärbung im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.



**Abbildung 9: Schematischer Ablauf der lentiviralen Herstellung, Transfektion und Transduktion**

Separate Herstellung der Regulator- und Transferviren über Co-Transfektionen von Verpackungsplasmid-Mix mit Regulator- bzw. Transferplasmid in 293T Verpackungszellen. Ernte der Viren nach zwei bis drei Tagen nach Cotransfektion aus den Zellkulturüberständen. Co-Transduktionen der Zielzellen mit Regulator- und Transferviren für ca. 8 h. Induktion und Regulation der Transgen-Expression durch Dox-Zugabe in das Medium ± vorherige Antibiotika-Selektion mit Puromycin und Geneticin (G418). Weitere Details zur lentiviralen Herstellung, Transfektion und Transduktion im Text. Abkürzungen: tTA (Tetrazyklin-abhängiger transkriptioneller Transaktivator), Neo<sup>R</sup> (Neomycin (G418)-Resistenzgen), Puro<sup>R</sup> (Puromycin-Resistenzgen). Modifiziert aus Produktanweisung des „Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression System“, Fa. Clontech („Protocol No. PT5144-1, Version No. PR0Y3747“).

### 3.5 Selektion transduzierter / transfizierter Zellen (Klonpicking)

Zur Erhöhung des Anteils HBs-exprimierender Zellen, wurden die bereits mit Puromycin und G418 selektierten Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen, einem sog. Klonpicking unterworfen. Dabei wurden die Zellen stark verdünnt auf Petrischalen (Ø 15cm) ausgesät, damit sich einzelne Zellklone bilden konnten. Diese wurden mittels Pipette unter Zuhilfenahme eines Mikroskops von der Schale abgenommen und in einzelne Wells einer 24-MWP pipettiert. Nach ca. zweiwöchiger Zellvermehrung wurde die einzelnen Zellklone mittels Immunfluoreszenz auf die jeweilige HBs-Protein-Expression überprüft. Klone mit einer hohen Expressionsrate und -stärke wurden weiter vermehrt und bis zur Verwendung in flüssigen Stickstoff gelagert.

### 3.6 Echtzeit-PCR

#### 3.6.1 Prüfung auf lentivirale RNA

Vor einer Überführung lentiviral-transduzierter Zellen aus dem Labor mit Sicherheitsstufe S2 in ein S1-Labor wurden Zellkultur-Überstände bereits mehrfach gesplitteter Zellen auf lentivirale RNA untersucht. Dazu wurde RNA aus drei Tage alten Zellkultur-Überständen (je 140 µl / Probe) mittels des QIAamp Viral RNA Mini-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Zur Vermeidung von RNA-Verlusten wurde die beiliegende *Carrier*-RNA eingesetzt. Im Anschluss wurden 15 µl RNA-Eluat / Probe mittels des iScript cDNA Synthese Kits nach Produktanweisung in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Proben wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und mit je 30 µl EB-Puffer eluiert. In einer Echtzeit-PCR („Real-Time PCR“) wurden je 4 µl / Probe auf die lentivirale RRE (*Rev Responsive Element*)-Sequenz mit spezifischen Primern (Tab. 6) untersucht: Amplifikationsprogramm: 95°C 5 min (1 Zyklus), 95°C 10 s, 62°C 20 s, 72°C 15 s (45 Zyklen). Schmelzkurven-Analyse: 95°C 1 min, 55°C 30 s, +3°C/s bis 95°C 30 s. Als Echtzeit-PCR-Reaktionsmix wurde der Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG mit 500 nM Rox nach Herstellerangabe mit je 0,2 µM *forward*- und *reverse*-Primer in einem 12,5 µl Reaktionsansatz pro Probe verwendet. Rox diente als Referenz-Farbstoff zum Normalisieren der Fluoreszenzsignale. Die sog. „Cut-off“-Grenze wurde bei einem Schwellenwert-Zyklus (CT-Wert) von 30 festgesetzt. CT-Werte >30 wurden als negativer Nachweis von lentiviraler RNA gewertet und die Zellen durften in das S1-Labor überführt werden.

### 3.6.2 Relative Quantifizierung von CK18-RNA

Die relative Quantifizierung von CK18-RNA in Huh7-Zellen, die mit shRNA-Plasmiden gegen CK18 transfiziert waren (Kapitel 3.14.4), wurde mittels Echtzeit-PCR vorgenommen. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen mittels des RNeasy-Mini-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Zur restlosen Beseitigung von DNA wurde ein DNase-Verdau direkt auf den Säulen durchgeführt. Die RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser pro Säule eluiert und die Konzentration und Reinheit am NanoDrop-Spektrometer nach der 260/280-Methode ermittelt. Im Anschluss wurde je 1 µg der RNA zu cDNA mittels des iScript cDNA Synthese Kits nach Produktanweisung umgeschrieben. In einer Echtzeit-PCR wurden je 2 µl der cDNA-Proben mit sequenzspezifischen Primern gegen CK18 und gegen das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (beide human; Tab. 6) untersucht. Ausser der Temperatur für das „Primer-Annealing“ wurden die gleichen Bedingungen und das gleiche Programm für die Amplifikation und die Schmelzkurven-Analyse im vorherigen Kapitel 3.6.1 verwendet. Die „Annealing“-Temperaturen betragen 63°C für CK18 und 55°C für GAPDH. Die relative cDNA-Menge an CK18 der Proben im Vergleich zur Kontrolle wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelt:  $2^{-((\text{Ct-Wert (CK18)} - \text{Ct-Wert (GAPDH) Probe}) - (\text{Ct-Wert (CK18)} - \text{Ct-Wert (GAPDH) Kontrolle}))}$ .

### 3.7 Collagen-Beschichtungen

Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden sterile Glasplättchen vor der Zellaussaat mit Collagen-I (aus Rattenschwanz) als Anheftungshilfe beschichtet. Dazu wurden diese mit einer 0,3 mg/ml Collagenlösung für ca. 10 min bei RT in 24-MWP inkubiert. Nach Entfernen der Lösung erfolgte darauf die Zellaussaat.

### 3.8 Immunfluoreszenz-gekoppelte Antikörper-Färbungen und Mikroskopie

Auf Collagen-I-beschichteten Glasplättchen wurden die jeweiligen Zellen  $\pm$  zu testende Substanzen ausgesät und inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Zellen 1x mit PBS (+ je 1 mM  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 10 min bei -20°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Zugabe der Primärantikörper gegen die nachzuweisenden Proteine in geeigneten Verdünnungen in PBS-T. Die Inkubation erfolgte

entweder Ü/N bei 4°C oder für mind. eine Stunde bei 37°C. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-T für je ca. 5 min wurden geeignete Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper in 1:1000 Verdünnungen unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie die Primärantikörper zu den Zellen gegeben. Bei Doppelfärbungen wurden die Primärantikörper getrennt voneinander inkubiert, dagegen die Sekundärantikörper meistens gemeinsam. Nach 1x Waschen mit PBS-T erfolgte eine Zellkernfärbung mit DAPI für 5 min in PBS-T, der weitere drei Waschschritte folgten. Bevor die Färbungen mit Fluoreszenz-Einbettmedium auf Glasobjektträger eingebettet wurden, erfolgte ein letzter Waschschritt in PBS ohne TW20. Nach Trocknung Ü/N wurden die Objektträger gesäubert und Aufnahmen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie angefertigt.

### **3.9 Selektive Depolymerisierungen von Zytoskelett-Komponenten**

Zur Analyse von potentiellen Interaktionen von LHBs mit Filamenten von Zytokeratinen (CKF), Mikrotubuli (MT) und Mikrofilamenten (MF) wurden diese selektiv mit depolymerisierenden Substanzen zerstört. Für CKF wurde Okadainsäure (OA), für MT Nocodazol (Noc) und für MF Cytochalasin D (CytoD) eingesetzt.

Dazu wurden AML-12, Huh7 und NIH3T3 Zellen (LHBs-exprimierend) mit folgenden Substanzkonzentrationen und Inkubationszeiten versetzt: 5 nM OA (Fa. Santa Cruz) für 16 h, 2.5 µM Noc für 16 h und 1 µg/ml CytoD für 2 h. Für HBV-Infektionsexperimente wurde Okadainsäure (InSolution) der Fa. Merck in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

### **3.10 Western-Blotting**

#### **3.10.1 Herstellung von Zelllysaten für SDS-PAGE**

Die zu analysierenden Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und dann mit 1% SDS-Lysepuffer direkt in der MWP oder Petrischale lysiert. Für eine Vertiefung einer 12er-MWP wurden z.B. 200 µl Puffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers verwendet. Die Lysate wurden bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen mit dem Ultra Turrax-Homogenisator homogenisiert. Im Anschluss wurden die relativen Proteinmengen an einem NanoDrop-Gerät nach der 280 nm-Methode bestimmt und die Proben mit 6xSDS-Proteinprobenpuffer versetzt.

Danach wurden die Proben im Thermomixer bei 95°C für 10 min unter Rütteln denaturiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.10.2 Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Hierzu wurden zur Herstellung eines Gels zwei Glasplatten, die durch einen Abstandshalter (1 mm) und einem Silikonband zur Abdichtung getrennt waren, aufeinandergesetzt. Der Zwischenraum wurde mit Trenngel-Lösung (12% Polyacrylamid) bis ca. 1,5 cm unterhalb der oberen Glaskanten befüllt. Zur Glättung der Flüssigkeitsoberfläche wurde tropfenweise etwas Isopropanol darauf pipettiert. Nach Polymerisation des Gels (ca. 15 min) wurde das Isopropanol mit ddH<sub>2</sub>O weggespült und die Sammelgel-Lösung (5,7% Polyacrylamid) auf das Trenngel gegossen. Ein Gelkamm wurde zur Ausbildung von Probenaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisierung (ca. 30 min) wurde ein farbiger Proteinlängen-Marker sowie ca. 40 µg Gesamtprotein/Probe in die Probenaschen des SDS-PAGE-Gels pipettiert. Die Proteinauftrennung in der Gelelektrophorese-Apparatur war nach ca. 80 min bei 130 V abgeschlossen. Direkt im Anschluss erfolgte ein Semi-Dry Blotting.

### 3.10.3 Semi-Dry Blotting

Der Transfer der im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde mittels Semi-Dry Blotting durchgeführt. Dazu wurde zunächst Folgendes nacheinander auf die Metallplatte des Semi-Dry-Geräts aufgeschichtet: zwei Blotting-Papiere (getränkt in Anoden-Lösung 1), ein Blotting-Papier (getränkt in Anoden-Lösung 2), eine in Methanol hydratisierte PVDF-Membran, das SDS-Gel und abschließend drei Blotting-Papiere (getränkt in Kathoden-Lösung). Beim Zusammenbau war es wichtig, Luftblasen zwischen den Schichten zu vermeiden bzw. diese vorsichtig herauszudrücken. Nach Aufsetzen des Deckels erfolgte das Blotting der Proteine auf die Membran für 1 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup>. Nach Waschen der Membran in PBS-T wurden unspezifische Bindungsstellen für ca. 1 h in 5% Magermilchpulver in PBS-T geblockt. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte für einige Stunden bei RT oder Ü/N bei 4°C unter leichter Schwenkbewegung. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit einem gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Nach drei Waschschritten mit PBS-T wurde

die Membran in eine Röntgenfilmkassette gelegt und mit 4 ml ECL-Lösung für 5 min lichtgeschützt inkubiert. Dazu wurden 4 ml ECL-Entwicklungslösung A mit 1,2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) und 0,4 ml ECL-Entwicklungslösung B vermischt. Nach Abgießen der Lösung wurde sofort eine transparente Folie luftblasenfrei aufgelegt. In der Dunkelkammer erfolgte die Belichtung von Röntgenfilmen mit je nach Signalstärke unterschiedlichen Zeiten. Die Entwicklung der belichteten Filme erfolgte danach automatisch in einer Entwicklungsmaschine.

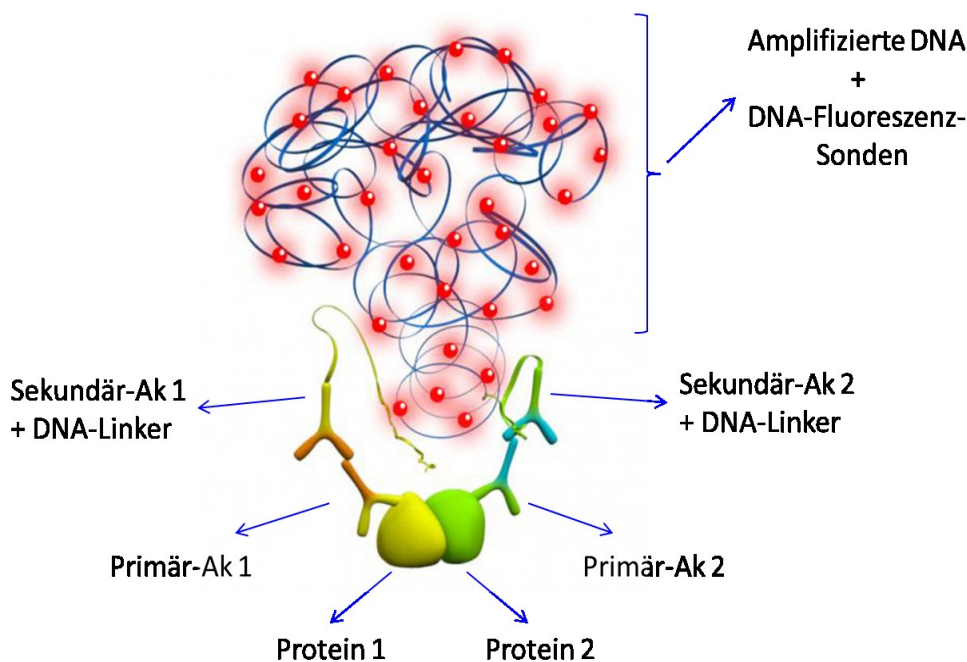
### 3.11 Konfokale Mikroskopie

Zur Analyse von Protein-Kolokalisationen wurden Immunfluoreszenz (IF)-Doppelfärbungen u.a. mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Diese Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Oleg Pak aus der AG Weissmann, Gießen an einem Leica TCS SP5 X konfokalem Fluoreszenz-Mikroskop durchgeführt. Im Gegensatz zur herkömmlichen Mikroskopie, die nur zweidimensionale Betrachtungen erlaubt, lassen sich mit konfokaler Mikroskopie Präparate und Zellen auch dreidimensional in der Tiefe (Z-Achse) untersuchen. Die fokussierte Darstellung von einzelnen Schichtebenen wird durch die Verwendung einer im Durchmesser variablen Lochblende ermöglicht. Darüber- und darunterliegende Ebenen können so ausgeblendet werden. Dies ermöglicht es, Protein-Kolokalisationen zu detektieren, da hier keine Signale aus anderen Tiefenschichten miterfasst werden. Falsch-positive Befunde wie bei normaler Mikroskopie lassen sich so verringern. Die minimale Schichtdicke lag bei Verwendung des 63er Objektivs mit Öl-Benutzung bei 350 bis 400 nm (tel. Auskunft Fa. Leica). Fluoreszenzsignale von immungefärbten Proteinen, bei sonst gleicher zweidimensionaler Lage, wurden innerhalb dieser Tiefenebene gemeinsam erfasst und als kolokalisiert ausgegeben.

### 3.12 Proximity Ligation Assay

Der *Proximity Ligation Assay* (PLA) ist eine biochemische Methode zum Nachweis einer Kolokalisation zwischen zwei Proteinen. Dafür wurden zunächst die zu untersuchenden Zellen 3 d ± Dox bei Standard-Zellkulturbedingungen auf Deckgläschen inkubiert, mit 70% Ethanol bei -20 °C für 10 min fixiert und Doppel-Antikörperfärbungen durchgeführt. Die

Konzentrationen der Primärantikörper wurden im Vergleich zu normalen Immunfärbungen bei diesem Assay zur Reduzierung von unspezifischen Signalen halbiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte nach der Produkthanleitung (Duolink der Fa. Sigma-Aldrich). Dazu wurden die Zellen für 20 min mit der im Kit enthaltenen Blockierungslösung geblockt und für eine Stunde mit den Sonden „rabbit MINUS“ und „mouse PLUS“ inkubiert. Nach Waschen erfolgte eine 30minütige Ligations-Reaktion mit anschließendem Amplifikationsschritt für 100 min. Wiederum nach einem Waschschrift und Trocknung der Zellen wurden die Deckgläschen auf Glasobjektträger mit DAPI-enthaltenden Einbettmedium eingebettet. Nach 15 min konnten Aufnahmen mit 400facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop angefertigt werden. Eine Protein-Kolokalisation wurde durch grün-fluoreszierende Signale angezeigt. Diese entstehen nur, wenn die Epitope der auf Kolokalisation getesteten Proteine nicht weiter als 40 nm voneinander entfernt liegen (schriftliche Mitteilung, Fa. Sigma-Aldrich).



**Abbildung 10: Schematische Abbildung des *Proximity Ligation Assays* zur Detektion einer Protein-Kolokalisation**

Die auf Kolokalisation zu testenden zwei verschiedenen Proteine werden mit Primär-Antikörpern unterschiedlicher Spezies markiert, welche wiederum von speziesspezifischen Sekundär-Antikörpern mit DNA-Linker gebunden werden. Nur wenn sich die DNA-Linker in enger räumlicher Nähe befinden, kann eine Ligase-Reaktion diese verknüpfen und über eine *Rolling-Circle*-Amplifikation die DNA vervielfältigen. Die Detektion erfolgt über fluoreszenz-markierte DNA-Sonden, die über komplementäre Basenbindung die amplifizierte DNA markieren. Eine Protein-Kolokalisation wird durch punktuelle, fluoreszierende Signale angezeigt. Eine Anwendung des Assays ist bei fixierten Zellen und Geweben möglich. Modifiziert nach Fa. Olink Bioscience, Uppsala, Sweden.



### 3.13 Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie

Die Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) ist ein spektroskopisches Analyseverfahren, welches zur Messung der Absorption von Stoffen bzw. Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen verwendet wird. Dazu wird ein Bindungspartner an die Oberfläche der Detektionseinheit gebunden. Fällt polarisiertes Licht in einem bestimmten Winkel darauf, kommt es durch Resonanz zu einer Anregung der delokalisierten Elektronen (Plasmon) und einer Abschwächung der Totalreflektion. Die Bindung des zweiten Bindungspartners an den ersten führt durch die Massenzunahme zu einer Änderung des Brechungsindex, der zu einer Veränderung der Plasmonresonanz führt. Gemessen wird dies i.d.R. als Veränderung des Winkels, bei dem die Absorption stattfindet.

Die Untersuchungen zur Bindung der myristylierten prä-S1 Domäne von LHBs mit Zytokeratin 8 und 18 erfolgte mittels der SPR-Methode. Sie wurden in der AG von Frau Prof. Mazurek, Institut für Veterinär-Physiologie und Biochemie, JLU Gießen unter Anleitung von Frau Dr. Monika Burg-Roderfeld auf einem ProteOn™ XPR36 Protein Interaction Array System der Fa. Bio-Rad durchgeführt. Zur Auswertung wurde die Software ProteOn Manager, Version 3.1 verwendet.

Zunächst wurde das myristylierte prä-S1-Peptid (bereitgestellt von AG Glebe, Med. Virologie, JLU Gießen) und als Negativkontrolle BSA (*ELISA grade*) mit einem Na-Acetatpuffer (pH 3,5) über eine konvalente Peptidbindung auf den ProteOn GLM Sensor Chip gekoppelt (Ligandenbindung). Rekombinantes humanes Zytokeratin 8 und 18 und eine Mischung von beiden dienten als Analyten. Die Zytokeratine lagen vor der Messung in einem 9,5 M Harnstoff- und 2 mM DTT-haltigen Puffer gelöst vor. Um ihre Ausfällung bei der Messung zu verhindern, wurden sie erst unmittelbar vor Meßbeginn in verschiedenen Konzentrationen in den Laufpuffer (0,5 M Harnstoff bzw. PBS) unter Vortexen pipettiert. Folgende Messungen erfolgten: Zytokeratin 8 und 18 einzeln mit je 0,1 und 1 µM; Zytokeratin 8/18-Mischung mit je 1 µM (= 2 µM gesamt).

### 3.14 Transfektionen und Transformationen

#### 3.14.1 Herstellung von LHBs/HBx-transgenen AML-12-Zellen

LHBs/HBx-transgene AML-12-Zellen wurden mittels Cotransfektion des klonierten lentiviralen Transfer-Plasmids pLVX Tight-Puro plus LHBs/HBx-Transgensequenz und des

lentiviralen Regulator-Plasmids pLVX Tet-On Advanced erzeugt. Dazu wurde das Transfektionsreagenz Xfect nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach zwei Tagen erfolgte eine Selektion auf mit beiden Plasmiden transfizierten Zellen mittels der Antibiotika Puromycin und G418 über drei Wochen. Im Anschluss wurde ein Klonpicking durchgeführt, um einen höheren Anteil LHBs-exprimierender Zellen zu erhalten.

### **3.14.2 Transfektion zur Expression eines Golgi-Markers**

AML-12, Huh7 und NIH3T3 Zellen (LHBs/HBx) wurden transient mit dem Plasmid pEGFP-Golgi und dem Transfektionsreagenz Xfect nach Herstellerangaben transfiziert.

### **3.14.3 Expression von CK18 und BiP in NIH3T3 Zellen**

#### **Transformation**

Zur Expression von humanen CK18- und humanen BiP-Protein wurden die Plasmide pcDNA3-CK18 und pCMV BiP-Myc-KDEL-wt bei 42°C für 30 sec in kompetente 5-alpha E. coli Zellen transformiert. Nach Zugabe von LB-Medium wurden die Bakterien bei 37°C für 1 h inkubiert und anschließend auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen. Nach Ü/N-Inkubation wurden Einzelkolonien gepickt und in je 100 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium im Inkubator Ü/N bei 150 U/min und 37°C vermehrt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3500 rpm, 4°C pelletiert und die Plasmid-DNA mit einem Endo Free Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben isoliert.

#### **Transfektion**

NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) wurden auf Collagen-beschichteten Glasplättchen ausgesät und am darauffolgenden Tag mittels des Transfektionsreagenz Xfect nach Herstellerangaben mit dem isolierten CK18- bzw. BiP-Plasmid transfiziert. Einen Tag später erfolgte eine zweitägige Induktion der LHBs-Expression durch Zugabe von Doxyzyklin zum Medium. Anschließend erfolgten Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (IC-IF) auf CK18 und LHBs bzw. auf BiP und LHBs.

### 3.14.4 RNA-Interferenz gegen CK18

Hierzu wurden die SureSilencing shRNA Plasmide gegen CK18 (Fa. Qiagen) wie im Kapitel 3.16.3 beschrieben zunächst transformiert und isoliert. Die Transfektion der shRNA-Plasmide in Huh7-Zellen erfolgte mit dem Xfect-Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben. Bei bereits lentiviral-transduzierten Huh7-Zellen erfolgte keine Puromycin-Selektion, bei Huh7-Wildtyp-Zellen für zwei Tage.

### 3.15 *In-vitro* HBV-Infektionen von primären Hepatozyten aus Tupaia

Primäre Tupaia-Hepatozyten (PTH) wurden für diese Experimente freundlicherweise von der AG Glebe (JLU Gießen, Med. Virologie) zur Verfügung gestellt. Die PTH wurden von Mitarbeitern der AG aus den Lebern südostasiatischer Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) isoliert und auf Matrigel-beschichteten Glasplättchen in Multi-Well-Zellkultur-Platten (24er Format) nahezu konfluent ausplattiert. Als Medium diente Hepatozyten-Wachstumsmedium (HGM), das zur Vermeidung von Pilzinfektionen Caspofungin (5 µg/ml) enthielt. Am Tag 4 der Isolierung erfolgten die HBV-Infektionen der PTH bei Standard-Zellkultur-Bedingungen Ü/N mit ca.  $10^8$  infektiösen Hepatitis B-Viren (aus Patientenisolat, von AG Glebe, Med. Virologie, JLU Gießen bereitgestellt) und 350 µl HGM / Well. Am Tag 1, 4, 7 und 11 der Infektion wurden Zellkultur-Überstände abgenommen und bis zur Durchführung des ELISA's auf sekretiertes HBsAg und des Harnstoff-Assays bei -20°C gelagert. Nach den Probennahmen wurden die Zellen mit HGM einmal vorsichtig gewaschen und ein Wechsel mit frischem HGM durchgeführt. Ab Tag 1 der HBV-Infektion wurden dem HGM zusätzlich 300 nM myristyliertes präS1-Peptid zur Vermeidung von gegenseitigen Infektionen der Zellen durch produzierte Hepatitis B-Viren und somit Nivellierungen der Effekte zugefügt.

#### 3.15.1 Einfluss von extrazellulärem Zytokeratin 8 und 18

Folgende Versuchsansätze wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die HBsAg-Sekretion getestet: Negativ-Kontrolle (Ø Viren), Positiv-Kontrolle (+ Viren), Positive Inhibitor-Kontrolle (Viren + MA18/07-Antikörper, 5 µg/ml), Viren + CK8 (1 µg/L und 1 mg/L), Viren + CK18 (1 µg/L und 1 mg/L), Viren + CK8+CK18 (je 1 µg/L und je 1 mg/L) und Viren +

BSA (1 µg/L und 1 mg/L). Alle Ansätze wurden eine Stunde unter leichtem Schütteln in silikonisierten Reaktionsgefäßen bei RT vorinkubiert und dann zu den PTH pipettiert.

### 3.15.2 Einfluss von Okadainsäure (OA)

Der Einfluss von OA auf die HBsAg-Sekretion und Infektion wurde in zwei getrennten Versuchsansätzen untersucht. In einem Vorversuch wurden zunächst geeignete OA-Konzentrationen (0, 10, 20, 30, 40 und 50 nM) für beide Versuche ermittelt.

- 1) Einfluss auf die HBV-Infektion: PTH-Zellen wurden zunächst für 8 h mit o.a. OA-Konzentrationen in HGM vorinkubiert und dann mit HBV infiziert.
- 2) Einfluss auf die HBsAg-Sekretion: PTH-Zellen wurden mit HBV infiziert. Am Tag 4 der HBV-Infektion wurden die Zellen mit o.a. OA-Konzentrationen in HGM für 3 d inkubiert.

### 3.16 ELISA

Zur quantitativen Erfassung von HBsAg-Konzentrationen aus Zellkultur-Überständen und Zell-Lysaten von HBs-transgenen Zelllinien sowie aus Zellkultur-Überständen HBV-infizierter primärer Tupaia-Hepatozyten wurden ELISA-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Wells einer MaxiSorp-96-MWP (Flachboden) mit je 100 µl des HBs-spezifischen Antikörpers C20/02 (Fänger-Antikörper) in einer Konzentration von 1 µg/ml in ELISA-Beschichtungspuffer Ü/N bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer Lösung von 1% BSA (ELISA grade) in PBS-T für 2 h bei RT geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Proben und die HBsAg-Standard-Verdünnungen (gereinigtes HBsAg-Protein mit bekannter Konzentration, bereitgestellt von AG Glebe) mit je 100 µl/Well als Doppelbestimmungen pipettiert. Zell-Lysate wurden immer mit 1xPBS 1:2 verdünnt eingesetzt. Nach Ü/N-Inkubation bei 4°C und Waschen erfolgte die Zugabe von je 50 µl/Well eines 1:20 in PBS-T verdünntem biotinylierten α-HBs-Antikörpers aus dem Enzygnost 6.0 Kit (Detektions-Antikörper) für 1 h bei 37°C. Nach Waschen erfolgte eine 30minütige Inkubation mit je 50 µl/Well einer 1:8000 Verdünnung von Streptavidin-HRP (*high sensitivity*) in PBS-T. Nach Waschen folgte die Zugabe von Lösung A und B aus dem ELISA-TMB-Substratkit. Nach einigen Minuten Entwicklung auf einem Rüttler wurde die Reaktion mit je 50 µl/Well einer 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung

abgestoppt. Danach erfolgten die Absorptions-Messungen bei 450 nm im ELISA-Reader gegen die Referenzwellenlänge bei 630 nm. Absorptionswerte bei 450 nm wurden mit den Werten aus dem Harnstoff-Assay korrigiert, falls erforderlich. HBsAg-Konzentrationen in ng/ml wurden über die Berechnungsformel der Standardkurve bestimmt.

### **3.17 Harnstoff-Assay**

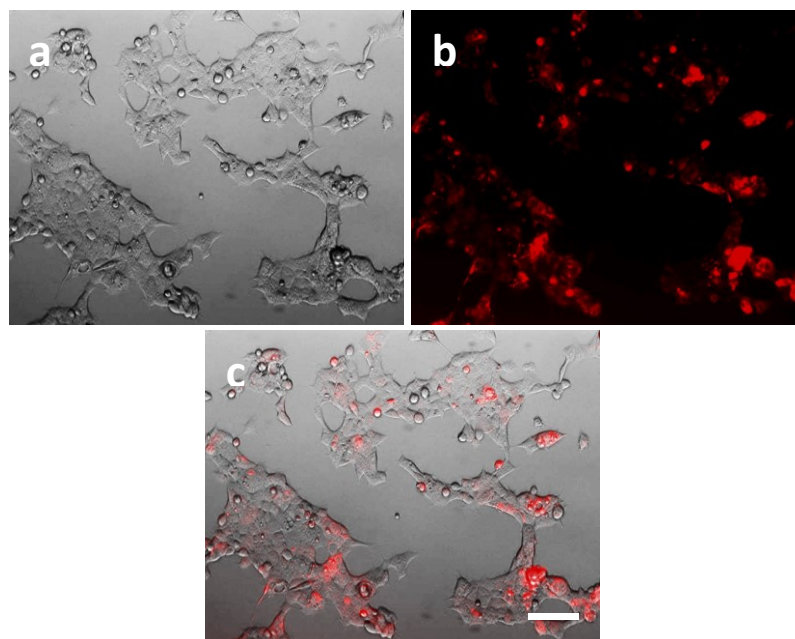
Je 50 µl von ZK-Überständen aus dem Experiment „*In vitro* HBV-Infektion von PTH ± Zytokeratin 8 und 18“ wurden in die Wells einer 96-MWP pipettiert. Danach erfolgte nacheinander die Zugabe von je 25 µl O-Phthalaldehyd und Naphthyl-Ethylen-Diamin (NED) und Inkubation für ca. 15 min auf dem ELISA-Rüttler. Der gebildete Farbkomplex wurde anschließend im ELISA-Reader bei 490 nm als Meßwellenlänge gegen 620 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Die relativen Harnstoff-Meßwerte sind proportional zur Zellanzahl bzw. metabolischen Aktivität der Zellen und wurden zur Korrektur der im ELISA gemessenen HBsAg-Konzentrationen aus o.g. Experimenten verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klonierung der lentiviralen Vektoren, Herstellung von infektiösen Lentiviren und Transduktionen

#### 4.1.1 mCherry

Zur Optimierung der Lentiviren-Herstellung und der nachfolgenden Transduktionen wurde die Sequenz des mCherry-Proteins in den lentiviralen Transfervektor pLVX Tight Puro kloniert und anschließend per Sequenzierung verifiziert. Nach der Herstellung der infektiösen Lentiviren wurden diese aufkonzentriert. Hierbei wurden verschiedene Ultrazentrifugations-Bedingungen (Geschwindigkeit, Dauer,  $\pm$  Sukrose-Kissen) ausgetestet. Dabei erwiesen sich folgende Bedingungen hinsichtlich der nachfolgenden Transduktionsrate und Zytotoxizität bei 293T-Zellen am geeignetsten: 15.000 rpm, 4 h bei 4°C unter Vakuum, 20%iges Saccharose-Kissen. Weiterhin konnte die Transduktionsrate durch den Einbau eines Zentrifugations-schritts (1600 x g, 30 min) während der Transduktion gesteigert werden. Nach 2 d Doxyzyklin (Dox)-Induktion konnte bereits in ca. 90% der Zellen eine Expression von mCherry-Protein, sichtbar als rote Fluoreszenz, im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden (Abb. 11).



**Abbildung 11: Expression von mCherry in lentiviral transduzierten 293T Zellen**

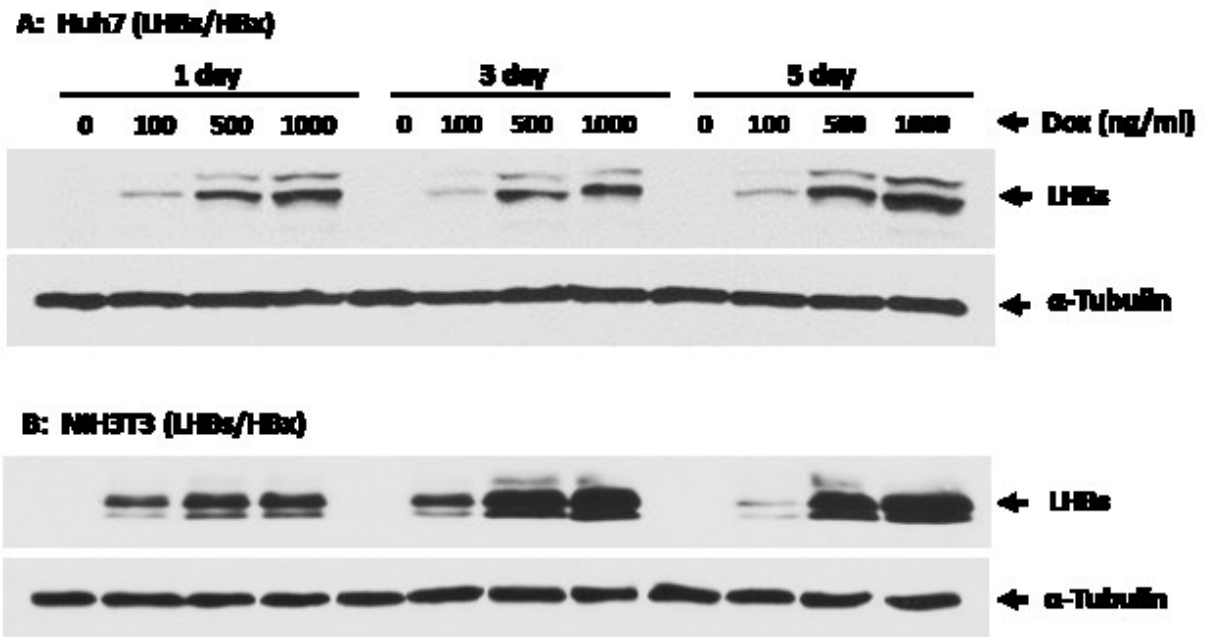
293T-Zellen wurden mit infektiösen Lentiviren (mCherry + Tet-On) in einer 24-MWP bei 1600 x g für 30 min transduziert und für weitere 8 h inkubiert. Nach Mediumwechsel wurde die mCherry-Expression mit Dox (500 ng/ml) für 2 d induziert. Dargestellt sind 100fache Vergrößerungen der transduzierten 293T Zellen: (a) unter Normallicht (VIS); (b) unter Fluoreszenzlicht, 590 nm; (c) Überlagerung von (a) und (b). Messbalken repräsentativ für alle Bilder, 200 µm.

#### **4.1.2 HBV-Oberflächenprotein-Sequenzen SHBs, LHBs und LHBs/HBx**

Die Oberflächenprotein-Sequenzen SHBs, LHBs und LHBs zusammen mit dem X-Protein von HBV (HBx) wurden separat voneinander in den lentiviralen Transfervektor pLVX Tight Puro kloniert. Die Richtigkeit der einklonierten Transgene wurde durch Sequenzierung verifiziert. Die Herstellung der infektiösen Lentiviren und nachfolgende Transduktionen auf Huh7- und NIH3T3-Zellen erfolgten unter den o.g. optimierten Bedingungen. Die Herstellung von AML-12-Zellen mit Dox-induzierbaren LHBs/HBx-Konstrukt wurde durch Transfektion des lentiviralen Transferplasmids mit LHBs/HBx als Transgen und des Tet-On Regulatorplasmids vorgenommen. Transduzierte bzw. transfizierte Zellen wurden mittels Puromycin und G418 stabil selektioniert. Es erfolgte ein Klonpicking, um Zellklone mit einer gleichmäßig starken HBs-Expression zu erhalten.

#### **4.2 Zeitverlauf der LHBs-Expression in lentiviral transduzierten Huh7- und NIH3T3-Zellen**

Der Zeitverlauf und die Expressionstärke des mittels Dox induzierten LHBs-Proteins wurden durch Western Blotting-Analysen untersucht. Dazu wurden lentiviral transduzierte Huh7- und NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx-Konstrukt) unterschiedlich lange mit verschiedenen Dox-Konzentrationen behandelt. Wie in Abbildung 12 gezeigt, kam es ohne Dox zu keiner sichtbaren LHBs-Expression in den Zellen. Dagegen war eine schwache LHBs-Expression bereits nach einen Tag mit 100 ng/ml Dox zu sehen. Mit 500 ng/ml Dox wurde LHBs bereits sehr deutlich am Tag 1 in beiden Zelllinien exprimiert, wohingegen mit 1000 ng/ml Dox keine nennenswerte Steigerung zu verzeichnen war. Am Tag 3 kam es jedoch in NIH3T3-Zellen zu einem weiteren Anstieg bei 500 und 1000 ng/ml. Dies wurde nicht in Huh7-Zellen beobachtet. Weiterhin zeigten die NIH3T3 mehr glykosyliertes LHBs (42 kDa-Bande), während Huh7 mehr unglykosyliertes LHBs (39 kDa-Bande) aufwies.



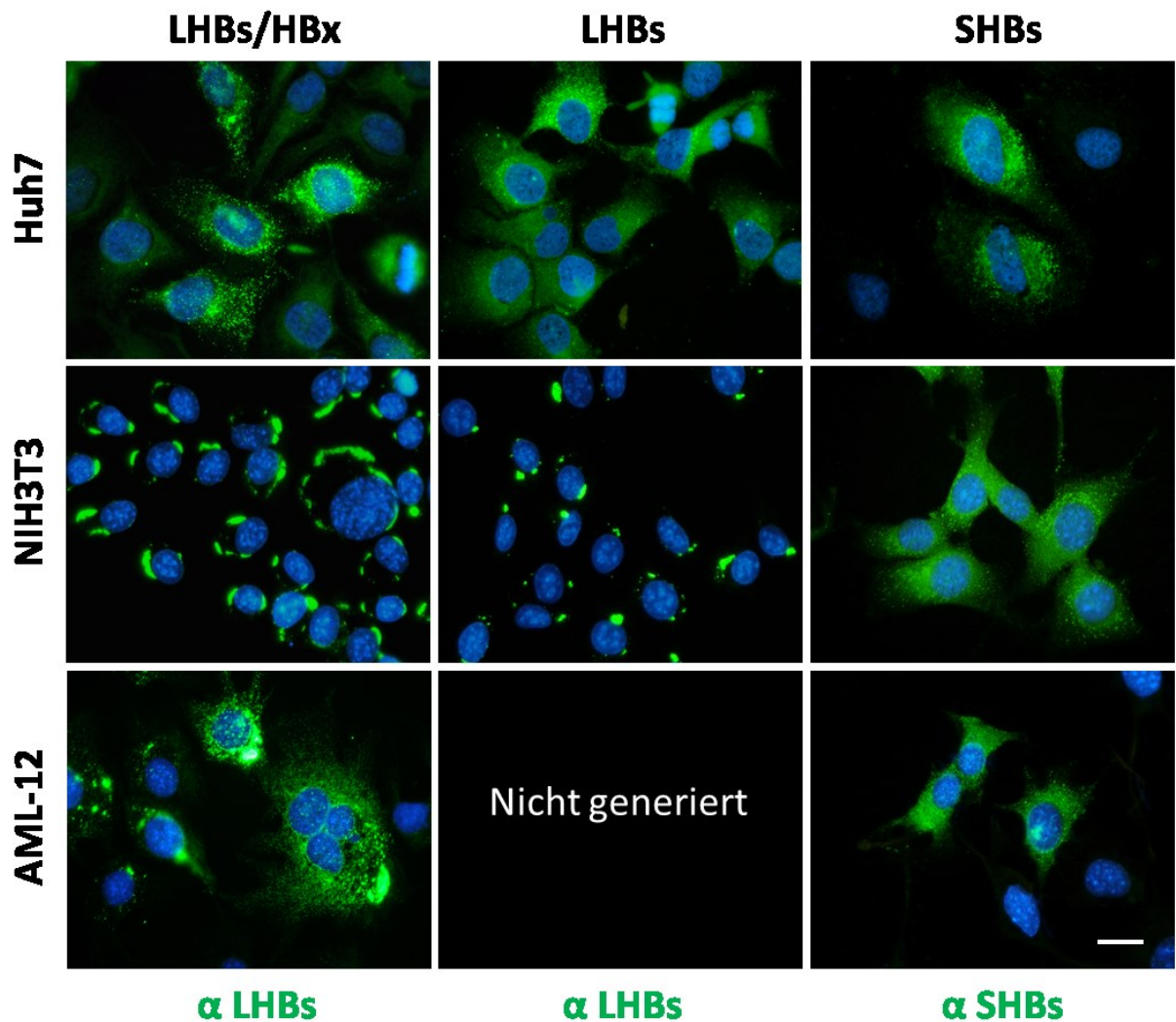
**Abbildung 12: Zeitverlauf der Dox-induzierten LHBs-Expression in Huh7 (A) und NIH3T3 (B) Zellen**

Die Zellen wurden mit vier verschiedenen Dox-Konzentrationen (0, 100, 500 und 1000 ng/ml) 1, 3 und 5 Tage in 6-MWP behandelt und anschließend die Zelllysate mittels Western-Blotting-Methode untersucht. Gefärbt wurden jeweils LHBs (39 kDa-Bande unglykosyliertes LHBs, 42 kDa glykosyliertes LHBs; MA18/07-Ak) und  $\alpha$ -Tubulin (57 kDa, Cell Signaling-Ak).  $\alpha$ -Tubulin zeigt als Kontrolle eine äquivalente Gesamtprotein-Beladung der Proben auf das Gel.

### 4.3 Intrazelluläre Verteilung von SHBs und LHBs in HBs-transgenen Zelllinien

Fluoreszenz-basierte immunzytochemische Antikörperfärbungen (IC-IF) zeigten mit allen drei verschiedenen Hepatitis B-Oberflächenprotein (HBs)-Konstrukten (SHBs, LHBs und LHBs/HBx) eine zytoplasmatische Feinverteilung des SHBs- und LHBs-Proteins in Huh7-Zellen. Dagegen wiesen NIH3T3-Zellen nur mit SHBs-Transgen eine solche Feinverteilung auf. Beim LHBs- und LHBs/HBx-Konstrukt kam es hingegen in diesen Zellen zu einer Aggregat-Bildung des LHBs-Proteins. Bei AML-12-Zellen mit SHBs-Konstrukt wurde ebenfalls eine Feinverteilung des SHBs-Proteins festgestellt, während es mit dem LHBs/HBx-Konstrukt sowohl zu einer Feinverteilung als auch zur Aggregatbildung von LHBs in diesen Zellen kam (Abb. 13).





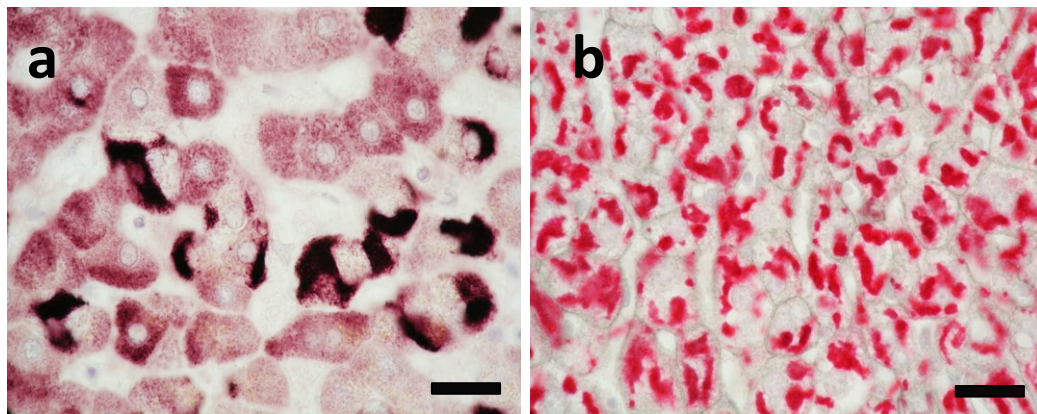
**Abbildung 13: Intrazelluläre Verteilung von SHBs und LHBs in transgenen Zelllinien**

Zur Expression der verschiedenen HBV-Oberflächenprotein-Konstrukte (LHBs/HBx, LHBs und SHBs) wurden lentiviral transduzierte Huh7- und NIH3T3-Zellen für 3 d mit Dox induziert. Zur Expression des LHBs in AML-12-Zellen (stabil transfiziert mit lentiviralem LHBs/HBx-Plasmid und Tet-On Regulatorplasmid) wurde analog verfahren. Die SHBs-Expression in AML-12-Zellen erfolgte über transiente Transfektion (Plasmid pCH-9-HBV-LHBs(XXS) ohne Dox-Induktion). AML-12-Zellen mit LHBs-Konstrukt wurden nicht generiert. Dargestellt sind 1000fache Vergrößerungen von Immunfluoreszenzfärbungen (IC-IF) für LHBs (MA18/07-Antikörper) und SHBs (HBsAg-Antikörper (Fitzgerald)) in grün. Zellkern-Färbung mit DAPI (blau). Messbalken repräsentativ für alle Bilder, 20  $\mu$ m.

#### 4.4 HBsAg-Verteilung in Lebern von HBV-Patienten und HBs-transgener Mäuse

Leberschnitte humaner HBV-Patienten wiesen bei Immunfärbungen gegen HBsAg ein sehr ähnliches Bild wie LHBs-exprimierende NIH3T3- und AML-12-Zellen (Abb. 13) mit u.a. großen intrazellulären LHBs-Aggregaten in Hepatozyten auf (Abb. 14 a). Ein analoges

Ergebnis ergab sich bei Färbungen mit dem LHBs-spezifischen Antikörper MA18/07 (Daten nicht gezeigt). Daneben lag auch feinverteiltes LHBs bzw. HBsAg ähnlich wie in AML-12-Zellen vor (Abb. 14 a). HBs-transgene Mäuse wiesen ebenfalls eine Vielzahl von großen LHBs-Aggregaten in den Hepatozyten auf (Abb. 14 b). Diese Mäuse exprimierten das gleiche LHBs/HBx-Konstrukt als Transgen wie o.g. Zelllinien, jedoch gesteuert von einem Albumin-Promotor (Chisari et al., 1987; Churin et al. 2014).

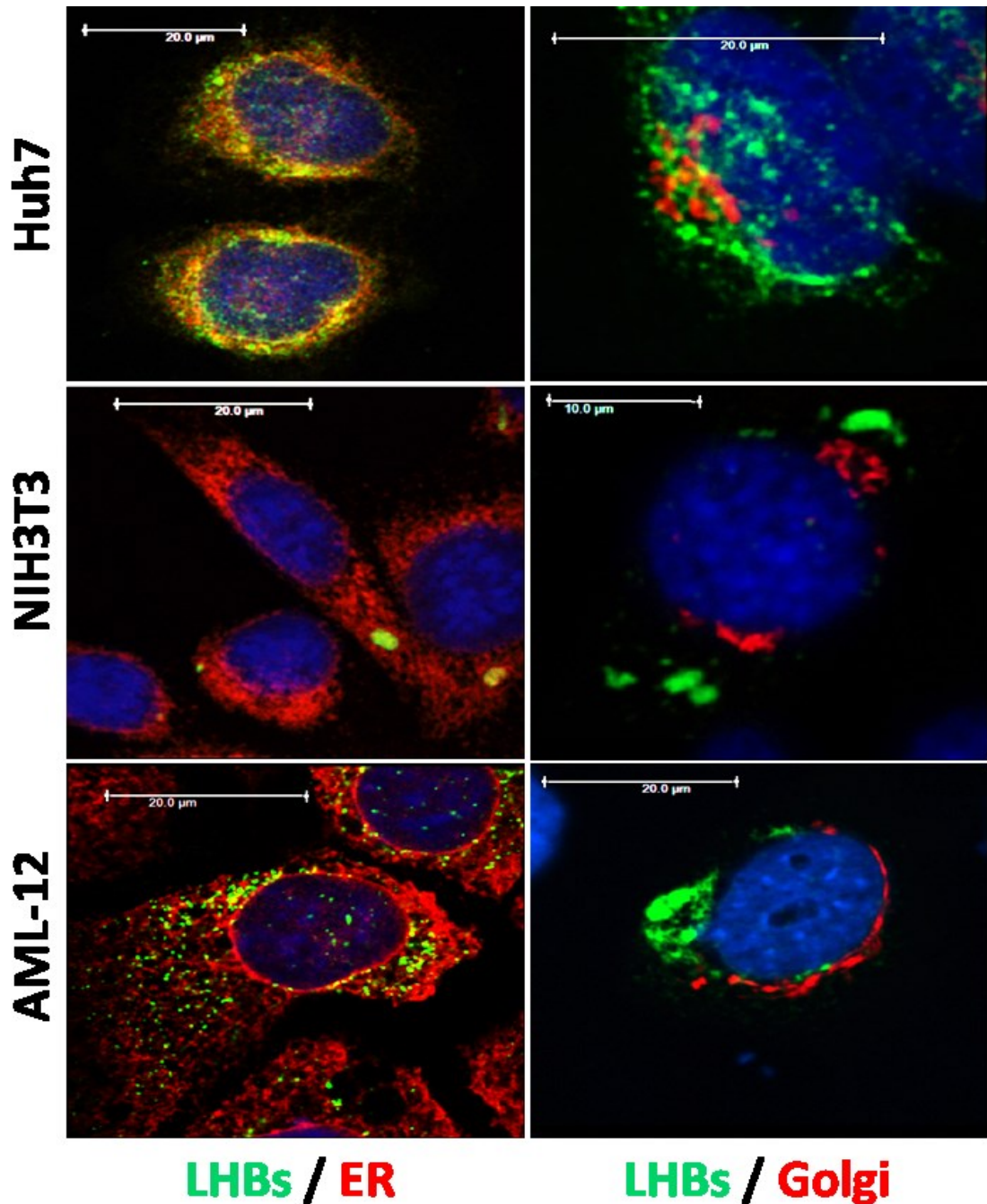


**Abbildung 14: HBsAg-Verteilung in Paraffinschnitten humaner und muriner Leber**

Leberschnitte eines HBV-Patienten ((a); freundlicherweise von Herrn Prof. H.P. Dienes, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Köln, zur Verfügung gestellt) und einer 12 w alter HBs-transgenen Black/6-Maus (b), gefärbt mit einem HBsAg-spezifischen Antikörper (Fa. Fitzgerald). Die Färbungen wurden von Herrn Dr. Churin aus der Arbeitsgruppe durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Dargestellt ist die HBsAg- und LHBs-Verteilung. Färbungen mit Reagenzien von Fa. Vector durchgeführt. HRP-basiert (a); Alkalische Phosphatase (b), 1000fache Vergrößerungen, Messbalken 20  $\mu$ m.

#### 4.5 Subzelluläre Lokalisierung von LHBs

Kolokalisationen des großen HBV-Hüllproteins (LHBs) mit dem ER (LHBs/ER) und dem Golgi-Apparat (LHBs/Golgi) wurden mittels Konfokaler Mikroskopie (AG Weißmann, JLU Gießen) untersucht. Überprüft wurden Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen, jeweils transgen für das LHBs/HBx-Konstrukt. Wie in Abbildung 15 gezeigt, war LHBs in NIH3T3-Zellen vollständig mit dem ER kolokalisiert, in Huh7-Zellen überwiegend und in AML-12-Zellen teilweise. Dagegen war LHBs in allen drei Zelllinien nicht mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert.

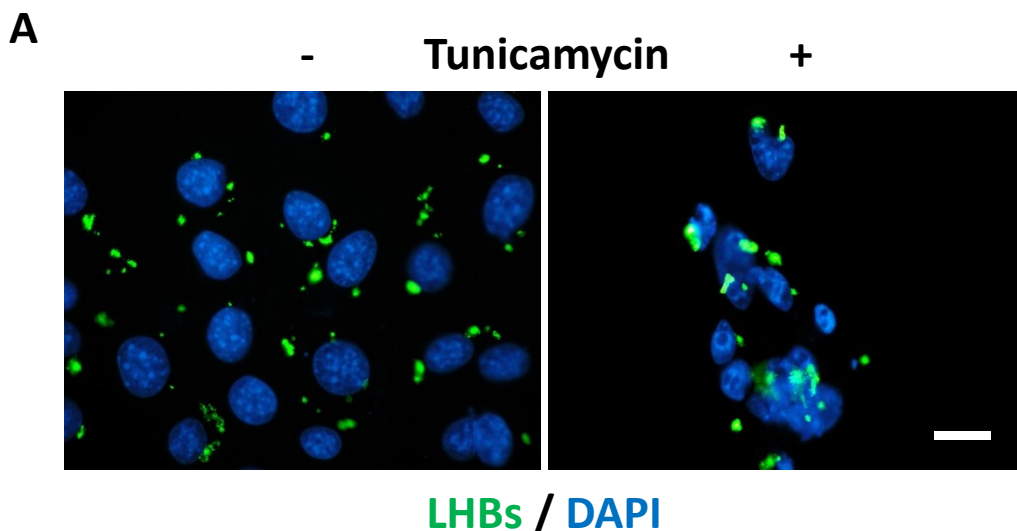


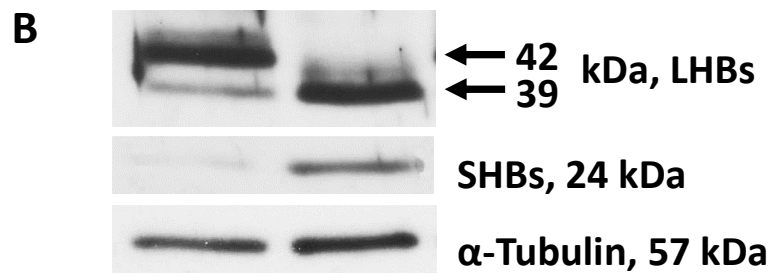
**Abbildung 15: Analysen zur Kolo-kalisation von LHBs mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat**

Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen (jeweils mit LHBs/HBx-Konstrukt) wurden 3 d mit Dox zur LHBs-Expression induziert. Danach erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen (IC-IF) von LHBs (MA18/07-Ak) und dem ER (Sec61β-Ak) (linke Bilder) bzw. eine IC-IF von LHBs (MA18/07-Ak) nach Transfektion mit einem Golgi-Markerplasmid (1,4-galactosyltransferase) (rechte Bilder). Zwecks einheitlicher Farbgebung für LHBs in grüner Farbe, wurde die Originalfarbe für LHBs (rot) und Golgi (grün) mit der Software Adobe Photoshop CS5 in grün bzw. rot umgewandelt. Bereiche mit Kolo-kalisationen sind an einer gelb-orangen Mischfarbe erkennbar. Zellkern-Färbung mit DAPI (blau). Messbalken 10 bzw. 20 µm.

#### 4.6 Untersuchung zur Glykosylierung von LHBs und intrazelluläre LHBs-Verteilung

Bei der Analyse des Zeitverlaufs der Dox-induzierten LHBs-Expression (Abb. 12) wurde eine stärkere Glykosylierung des LHBs-Proteins bei NIH3T3- im Vergleich zu Huh7-Zellen (beide LHBs/HBx) beobachtet. Bei AML-12-Zellen lag ein etwa gleiches Verhältnis zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem LHBs vor (Daten nicht gezeigt). Um festzustellen, ob der unterschiedliche Glykosylierungsgrad von LHBs die intrazelluläre LHBs-Verteilung (Feinverteilung vs Aggregate) beeinflusst, wurde die Substanz Tunicamycin (TM) bei NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) eingesetzt. TM ist ein Inhibitor von N-Glykosylierungen. Es wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt: 1) Bereits LHBs-exprimierende Zellen erhielten 2 d TM unter weiterer Dox-Zugabe. 2) Die LHBs-Induktion (+ Dox) und TM-Zugabe erfolgte zeitgleich für 2 d. Da TM konzentrations- und zeitabhängig zytotoxisch wirkt, wurden zunächst für das Experiment geeignete TM-Konzentrationen für NIH3T3-Zellen im Vorversuch unter der Vorgabe einer Versuchsdauer von 2 d ermittelt (Daten nicht gezeigt). Dabei erwiesen sich 62,5 und 31,25 ng/ml TM am geeignetsten. Höhere Konzentrationen waren stark zytotoxisch und führten bis zu einem vollständigen Verlust der Zellen (Daten nicht gezeigt). Die getesteten TM-Konzentrationen hatten bei beiden Versuchsansätzen (s.o.) keinen signifikanten Einfluss auf die LHBs-Verteilung (Abb. 16 A zeigt repräsentativ ± 62,5 ng/ml TM). Parallel dazu wurde mit einer Western-Blotting-Analyse die Inhibierung der LHBs-Glykosylierung mit o.a. TM-Konzentrationen bestätigt (Abb. 16 B zeigt repräsentativ ± 62,5 ng/ml TM). Zudem wurde durch TM-Behandlung die SHBs-Expression stark induziert, welche in unbehandelten Zellen kaum detektierbar war (Abb. 16 B). Die Induktion fiel mit etwas geringeren TM-Konzentrationen (< 62,5 ng/ml) noch stärker aus (Daten nicht gezeigt).



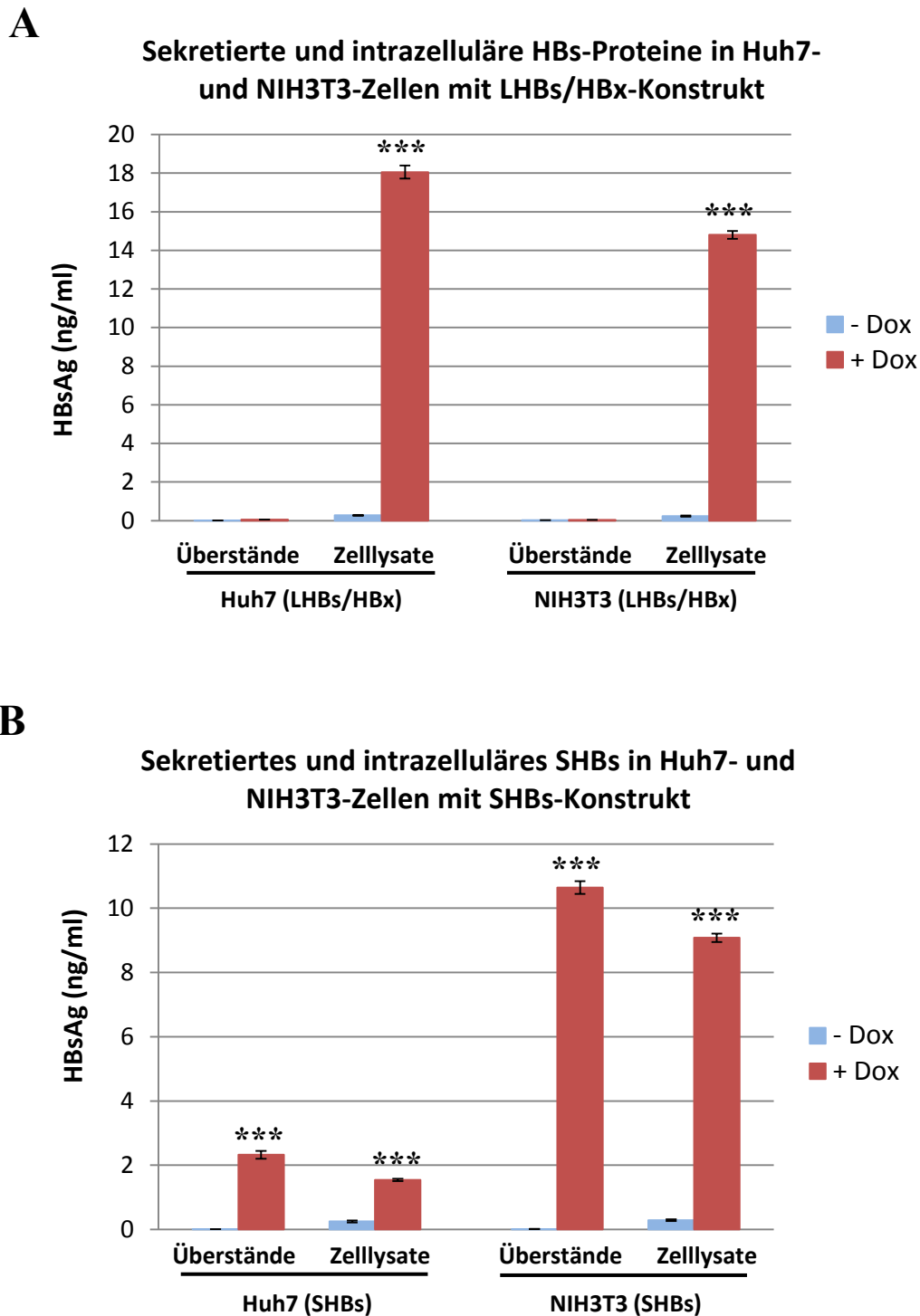


**Abbildung 16: Inhibierung der N-Glykosylierung von LHBs und intrazelluläre LHBs-Verteilung**

NIH3T3 (LHBs/HBx)-Zellen wurden  $\pm$  62,5 ng/ml Tunicamycin und gleichzeitig mit Dox für 2 d zur LHBs-Induktion behandelt. Die LHBs-Detektion erfolgte mit dem LHBs-spezifischen MA18/07-Antikörper (A) Immunfluoreszenz-Färbung von LHBs (grün). Linkes Bild: Zellen 0 ng/ml TM; rechtes Bild: 62,5 ng/ml TM. Zellkern-Färbung mit DAPI (blau). Messbalken 20  $\mu$ m. (B) Western-Blotting-Analyse von LHBs und SHBs.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle der applizierten Gesamtproteinmenge.

#### 4.7 Quantifizierung von sekretierten und intrazellulären HBs-Proteinen

In Zelllysaten der drei mit dem LHBs/HBx-Konstrukt-transgenen Zelllinien konnte über Western-Blotting-Analysen zwar eine starke LHBs-Expression, aber nur eine sehr schwache SHBs-Expression detektiert werden (Daten exemplarisch für NIH3T3-Zellen in Abb. 16 B gezeigt). Eine quantitative Erfassung von sekretierten und intrazellulären HBs-Proteinen wurde daher mittels ELISA-Messungen vorgenommen. Abbildung 17 zeigt HBs-Proteinkonzentrationen in Zellkultur-Überständen und Zelllysaten von Huh7- und NIH3T3-Zellen mit LHBs/HBx- und vergleichend mit dem SHBs-Konstrukt. AML-12-Zellen (LHBs/HBx bzw. SHBs) ergaben analoge Ergebnisse und werden daher nicht gezeigt. In Überständen von Zellen mit LHBs/HBx-Konstrukt  $\pm$  Dox konnten keine signifikanten HBs-Proteinkonzentrationen ermittelt werden, während in Lysaten von mit Dox-induzierten Zellen hohe HBs-Konzentrationen vorlagen (Abb. 17 A). Dagegen waren sowohl in Überständen als auch in Lysaten Dox-induzierter Zellen mit SHBs-Konstrukt deutliche SHBs-Konzentrationen messbar (Abb. 17 B). Diese Ergebnisse sowie die der Western-Blotting-Analysen (s.o.) lassen schlussfolgern, dass die Zelllinien mit LHBs/HBx-Konstrukt nur geringfügige Mengen an SHBs exprimierten.



**Abbildung 17: Quantifizierung von sekretierten und intrazellulären HBs-Proteinen**

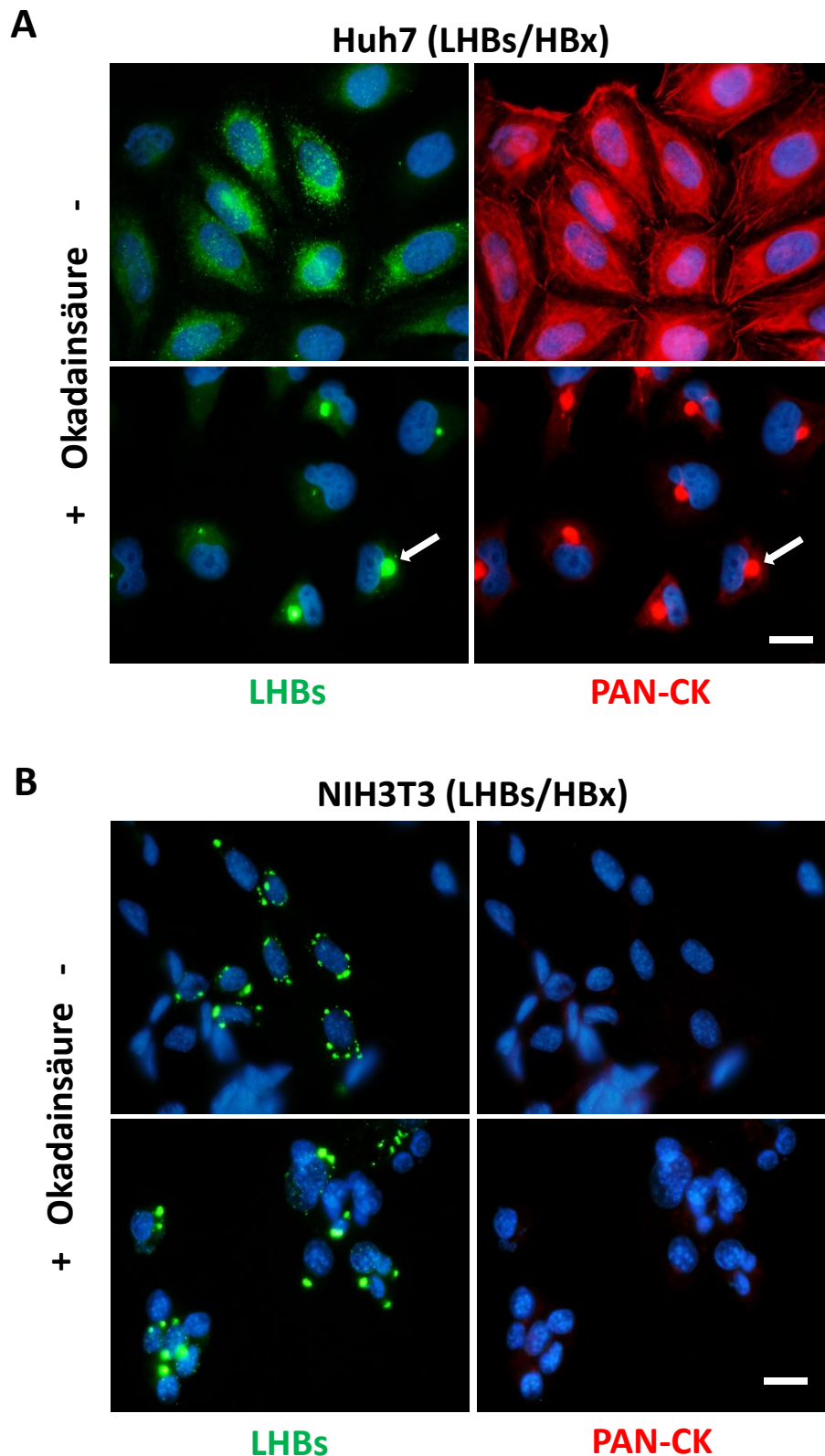
Huh7- und NIH3T3-Zellen mit LHBs/HBx- (A) bzw. SHBs-Konstrukt (B) wurden 3 d mit Dox zur HBs- bzw. SHBs-Expression behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Danach wurden Zellkultur-Überstände abgenommen. Die Zellen wurden mit 1% Triton-X-100-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Bis zur ELISA-Messung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die Zelllysate wurden im ELISA mit PBS 1:2 verdünnt, die Überstände unverdünnt eingesetzt. Die sonstige Vorgehensweise ist im Methodenteil beschrieben. Dargestellt sind HBs-Protein- (A) bzw. SHBs-Konzentrationen (B) in ng/ml  $\pm$  Standardabweichungen (n=3). Signifikanzen (p-Werte, zweiseitig) über T-Test für unabhängige Stichproben mit Software SPSS Statistics, Vers. 22, ermittelt. \*\*\* p $\leq$ 0,001 hochsignifikant.

## **4.8 Untersuchungen zur Interaktion von LHBs mit Zytoskelett-Komponenten**

Um den Einfluss verschiedener Zytoskelett-Komponenten wie Mikrofilamente (MF), Mikrotubuli (MT) und Zytokeratine (CK) auf die intrazelluläre LHBs-Verteilung in den drei LHBs/HBx-transgenen Zelllinien zu untersuchen, wurden die jeweiligen Filamente mit folgenden Substanzen depolymerisiert: Für CK wurde Okadainsäure (OA), für MF Cytochalasin D (CytD) und für MT Nocodazol (Noc) verwendet. Nach den Substanzbehandlungen wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (IC-IF) auf LHBs mit PAN-Zytokeratin (PAN-CK) bzw. mit  $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -Tubulin durchgeführt. Die Ergebnisse der Färbungen von LHBs und PAN-CK waren denen von HBsAg mit CK18 und LHBs mit CK8 analog (Daten nur teilweise gezeigt). Die Ergebnisse der AML-12-Zellen (LHBs/HBx) entsprachen dem der Huh7-Zellen (LHBs/HBx) und werden der Vollständigkeit halber im Anhang (Abb. 37 und 38) gezeigt.

### **4.8.1 Einfluss von Okadainsäure auf die intrazelluläre Verteilung von Zytokeratinen und LHBs**

Eine Immunfärbung auf PAN-CK ergab eine sehr starke Färbung in Huh7- und AML-12-Zellen (Abb. 18 A, Abb. 37 A), während NIH3T3-Zellen kaum eine Färbung aufwiesen (Abb. 18 B). Der Ü/N-Zusatz von OA ins Medium führte in den Huh7- und AML-12-Zellen zu einem gemeinsamen punktuellen Zusammenbruch von PAN-CK und LHBs in Zellkern-Nähe während keine Veränderung in NIH3T3-Zellen feststellbar war.



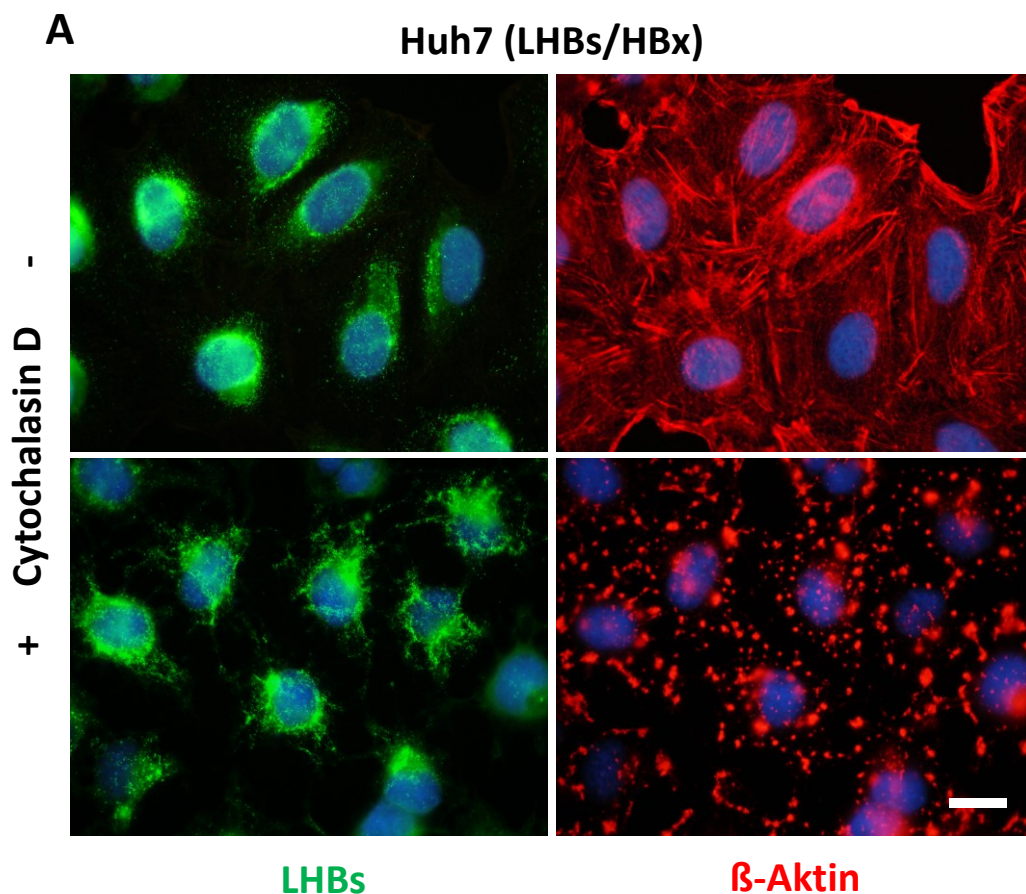
**Abbildung 18: Einfluss von Okadaicinsäure auf die intrazelluläre Verteilung von Zytokeratinen und LHBs**

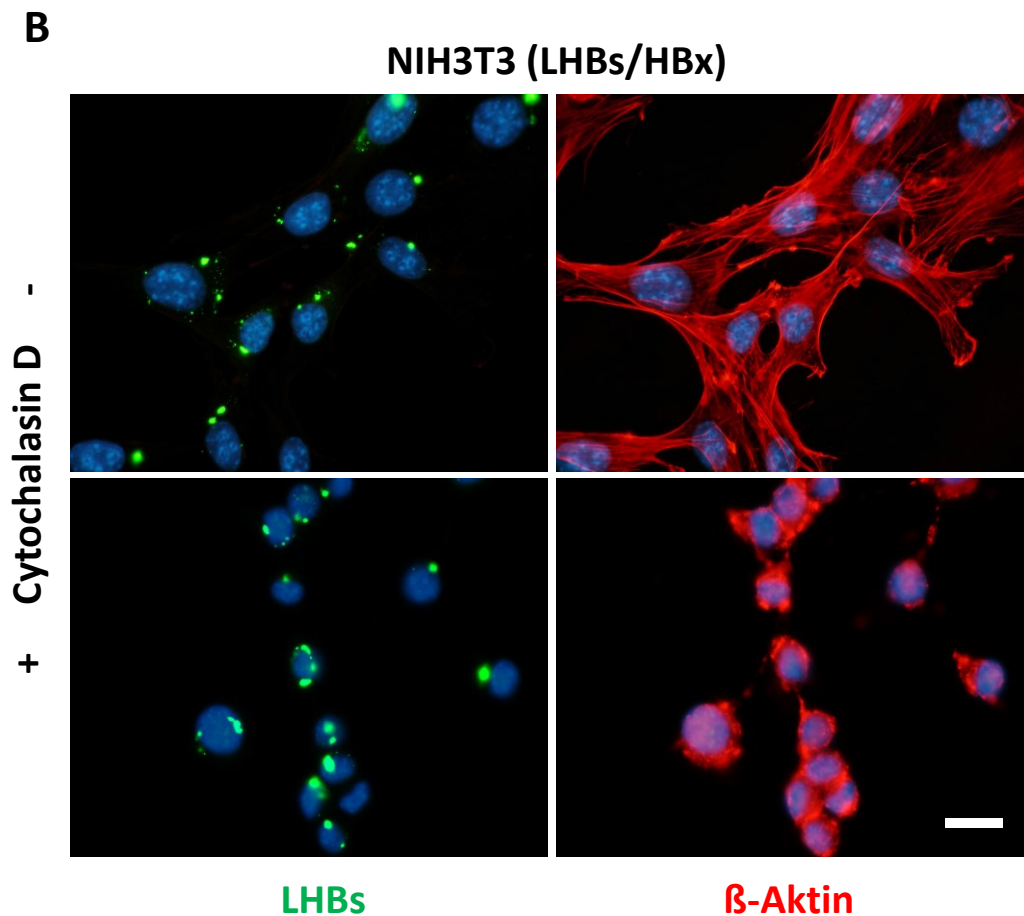
(A) Huh7- und (B) NIH3T3-Zellen (beide LHBs/HBx) wurden zur LHBs-Expression 3 d mit Dox (500 ng/ml) und danach  $\pm$  5 nM OA für 16 h zur Depolymerisierung von CKF behandelt. Von fixierten Zellen erfolgten Immun-Doppelfärbungen (IC-IF) auf LHBs (linke Bilder; grün) und PAN-CK (rechte Bilder; rot). Zellkern-Färbungen mit DAPI (blau). Dargestellt sind 1000fache Vergrößerungen von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Pfeile in (A) zeigen den punktuellen und perinukleären Co-Zusammensturz von LHBs und PAN-CK. Messbalken repräsentativ für alle Bilder 20  $\mu$ m.



#### 4.8.2 Einfluss von Cytochalasin D auf die intrazelluläre Verteilung von $\beta$ -Aktin und LHBs

Alle drei Zelllinien zeigten unbehandelt eine flächige, teils auch filamentäre Färbung auf  $\beta$ -Aktin, die i.d.R. im Bereich des Zellkortex am stärksten war (Abb. 19, Abb. 37 B). Durch die Behandlung mit CytoD (1  $\mu$ g/ml) wurden die Aktin-Filamente bereits innerhalb von zwei bis drei Stunden vollständig zerstört. Insbesondere bei Huh7- und AML-12-Zellen kam es dadurch zu punktförmigen  $\beta$ -Aktin-Aggregaten innerhalb des Zytoplasmas, während sich  $\beta$ -Aktin bei NIH3T3-Zellen überwiegend perinukleär verdichtete. Hinsichtlich der LHBs-Verteilung wurden in NIH3T3-Zellen keine Veränderungen beobachtet, jedoch hatte CytoD in Huh7- und AML-12-Zellen ein leicht verändertes Verteilungsmuster von feinverteiltem LHBs zur Folge (Abb. 19 A, Abb. 37 B).



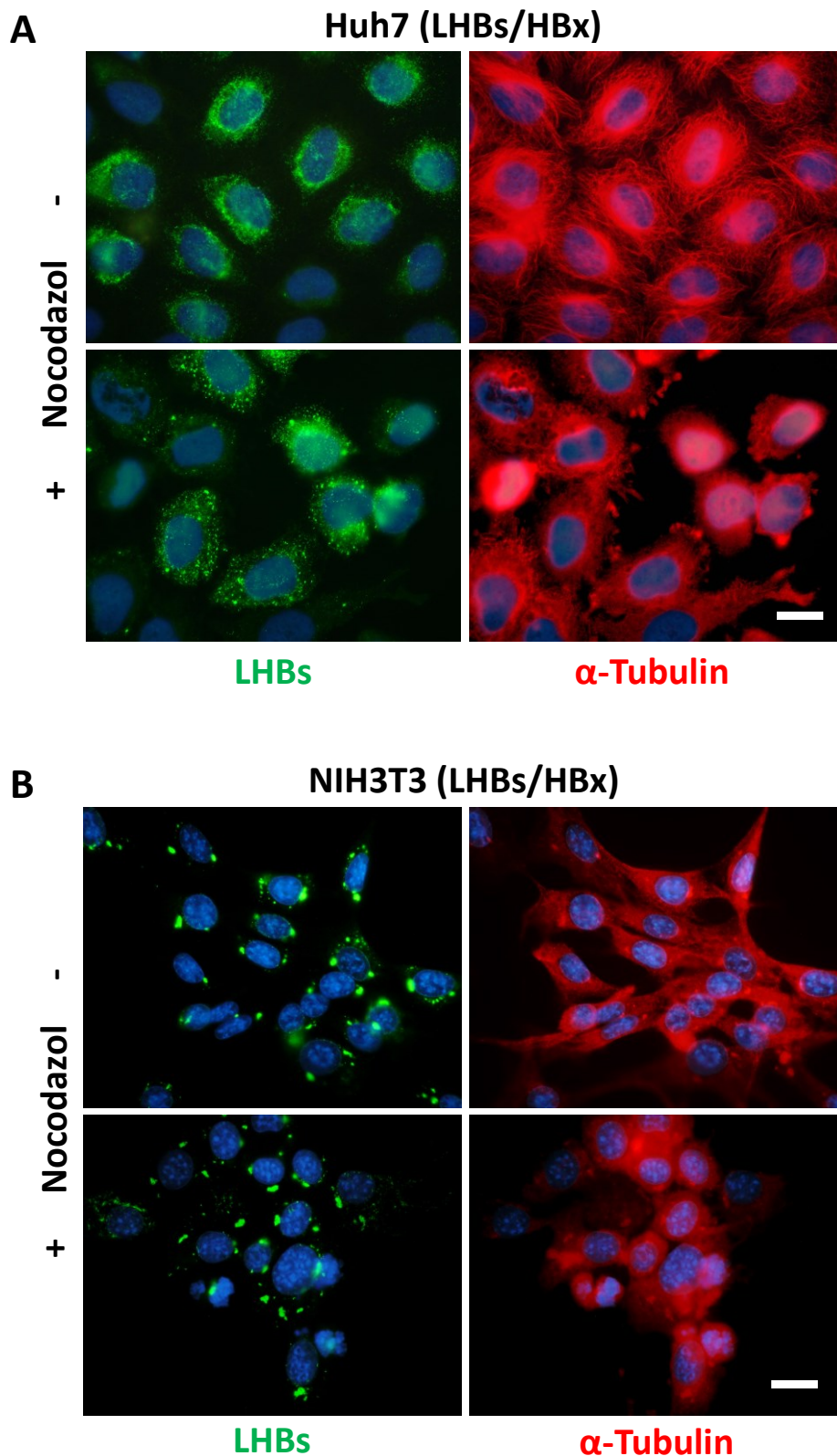


**Abbildung 19: Einfluss von Cytochalasin D auf die intrazelluläre Verteilung von β-Aktin und LHBs**

(A) Huh7- und (B) NIH3T3-Zellen (beide LHBs/HBx) wurden zur LHBs-Expression 3 d mit Dox (500 ng/ml) und danach  $\pm 1 \mu\text{g/ml}$  Cytochalasin D für 2 h zur Depolymerisierung von MF behandelt. Von fixierten Zellen erfolgten Immun-Doppelfärbungen (IC-IF) auf LHBs (linke Bilder; grün) und β-Aktin (rechte Bilder; rot). Zellkern-Färbungen mit DAPI (blau). Dargestellt sind 1000x Vergrößerungen von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Messbalken repräsentativ für alle Bilder 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.8.3 Einfluss von Nocodazol auf die intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli und LHBs

Unbehandelt zeigten Huh7- und AML-12-Zellen eine filamentäre Färbung auf  $\alpha$ -Tubulin (Abb. 20 A, Abb. 38), die bei NIH3T3-Zellen jedoch mehr feinverteilt als filamentär ausfiel (Abb. 20 B). Durch die Behandlung mit Nocodazol wurden die  $\alpha$ -Tubulin-Filamente in allen drei Zelllinien komplett zerstört, was in einer im gesamten Zytoplasma vorliegenden feinverteilt  $\alpha$ -Tubulin-Färbung resultierte. Die LHBs-Verteilung wurde dadurch in keiner der drei Zelllinien verändert.

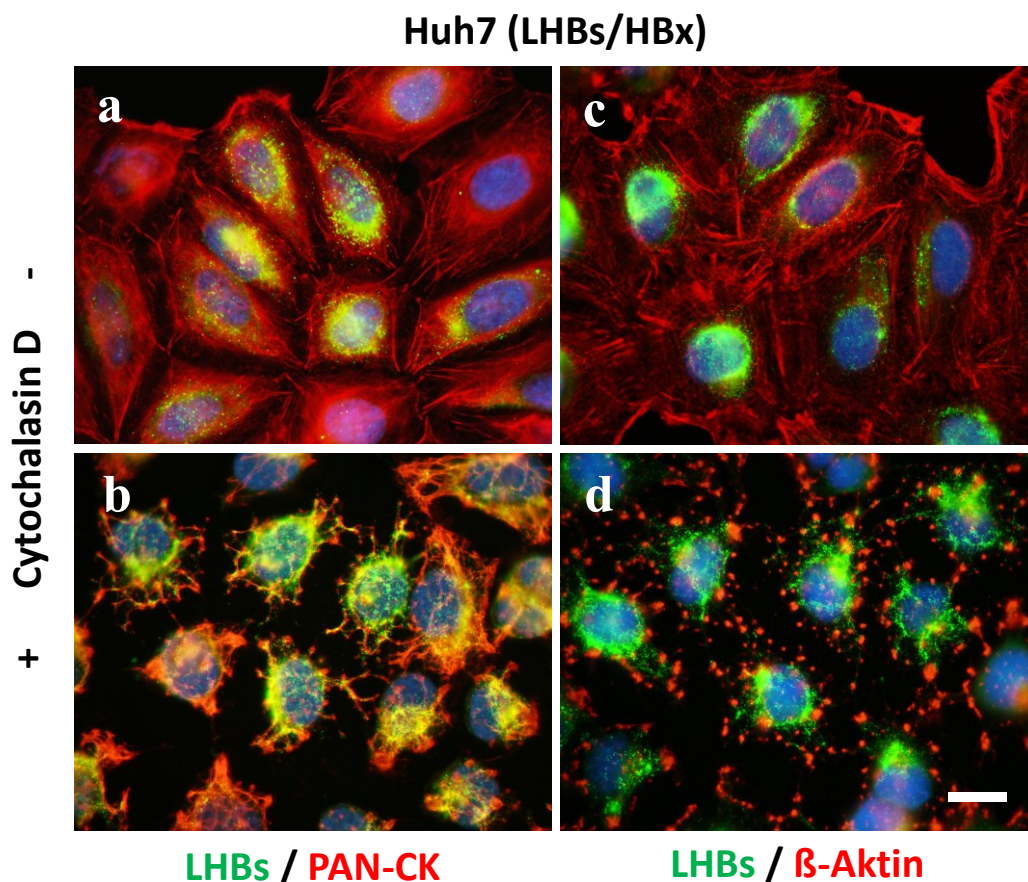


**Abbildung 20: Einfluss von Nocodazol auf die intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli und LHBs**

(A) Huh7- und (B) NIH3T3-Zellen (beide LHBs/HBx) wurden zur LHBs-Expression 3 d mit Dox (500 ng/ml) und danach  $\pm$  2.5  $\mu$ M Nocodazol für 16 h zur Depolymerisierung von Mikrotubuli-Filamenten behandelt. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (IC-IF) auf LHBs (linke Bilder; grün) und  $\alpha$ -Tubulin (rechte Bilder; rot). Zellkern-Färbungen mit DAPI (blau). Dargestellt sind 1000fache Vergrößerungen von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Messbalken repräsentativ für alle Bilder 20  $\mu$ m.

#### 4.9 Einfluss von Cytochalasin D auf die Zytokeratin-Struktur

In Kapitel 4.8.2 wurde festgestellt, dass CytoD das LHBs-Verteilungsmuster in Huh7- und AML-12-Zellen leicht veränderte (Abb 19 A, Abb. 37 B). Eine Immun-Doppelfärbung (IC-IF) auf LHBs/PAN-CK in Huh7 (LHBs/HBx)-Zellen  $\pm$  CytoD ergab, dass die Behandlung mit CytoD die Zytokeratin-Struktur veränderte und mit ihr in ähnlicher Weise auch die LHBs-Verteilung (Abb. 21, a+b). CK und LHBs lagen danach im Zytoplasma teilweise punktförmig verteilt vor, analog dem depolymerisierten  $\beta$ -Aktin (Abb. 21, d). Deutlich ist eine weitgehende Überlagerung der Färbung von LHBs mit CK zu erkennen, die eine evtl. Kolokalisation der beiden Proteine vermuten lässt. Hingegen kam es bei einer LHBs /  $\beta$ -Aktin-Doppelfärbung zu keiner nennenswerten Gelbfärbung, was auf eine weitgehend fehlende Kolokalisation zwischen LHBs und  $\beta$ -Aktin hindeutet (Abb. 21 c+d).

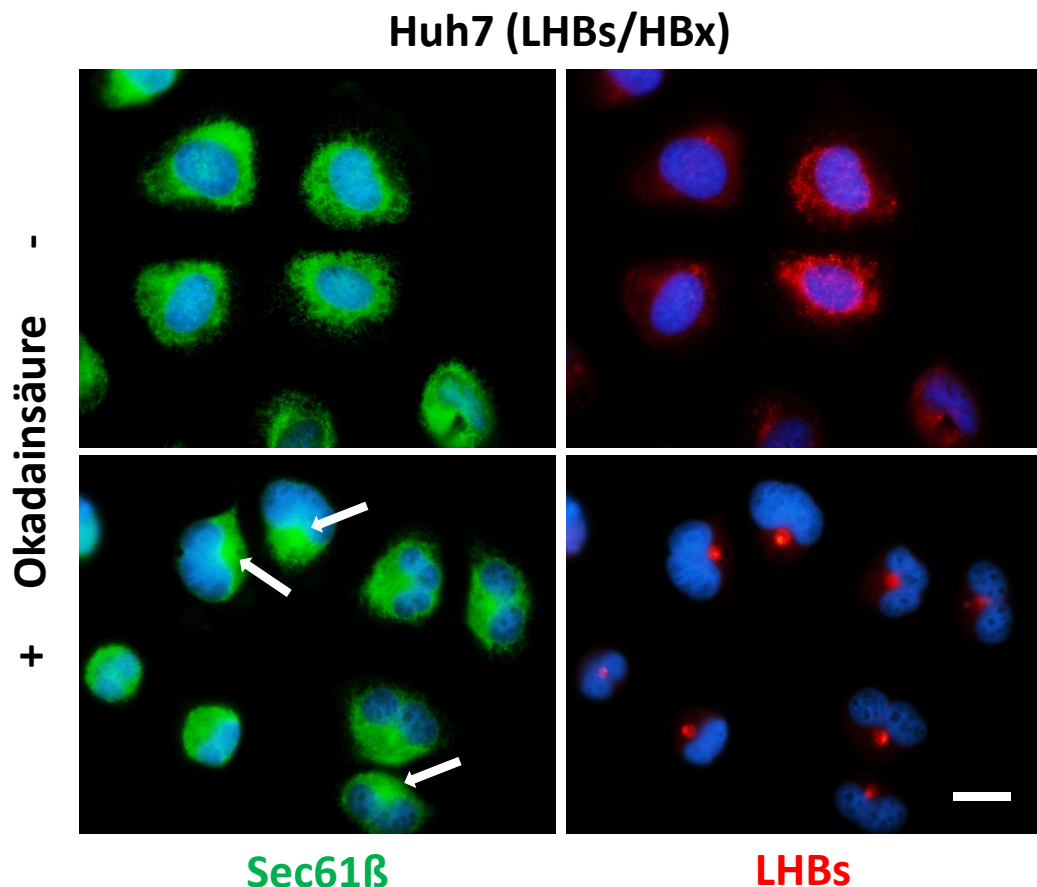


**Abbildung 21: Einfluss von Cytochalasin D auf die Zytokeratin-Struktur**

Huh7-Zellen (LHBs/HBx) wurden 3 d mit Dox (500 ng/ml) zur LHBs-Expression und danach  $\pm$  1  $\mu$ g/ml Cytochalasin D für 2 h zur Depolymerisierung von MF behandelt. Von fixierten Zellen erfolgten Immun-Doppelfärbungen (IC-IF) auf LHBs (grün) und PAN-CK (rot; a, b) bzw. LHBs (grün) und  $\beta$ -Aktin (rot; c, d). Zellkern-Färbungen mit DAPI (blau). Dargestellt sind 1000fache Vergrößerungen von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen; Messbalken repräsentativ für alle Bilder 20  $\mu$ m.

#### 4.10 Einfluss von Okadainsäure auf die Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums

Durch OA-Behandlung kam es in Huh7-Zellen zu einem punktuellen, perinukleären Ko-Zusammensturz von LHBs und PAN-CK (Kapitel 4.8.1). Da LHBs überwiegend mit dem ER kolokalisiert war (Kapitel 4.5), galt es auszuschließen, dass dieser Effekt durch einen Zusammensturz des ER's bedingt ist. Wie in Abbildung 22 dargestellt, blieb die ER-Morphologie durch OA-Behandlung weitestgehend unbeeinträchtigt. Die kompaktere ER-Färbung war überwiegend auf die OA-bedingte Zellabrundung zurückzuführen, die am Ende des Versuchs im Normallicht zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). In ca. 30 % der OA-behandelten Zellen wurde jedoch auch eine perinukleäre Komprimierung von einem Teil des ER's im Bereich der fokalen LHBs/CK18-Aggregate beobachtet (siehe Pfeile in Abb. 22), die im nächsten Kapitel weiter untersucht wurde.

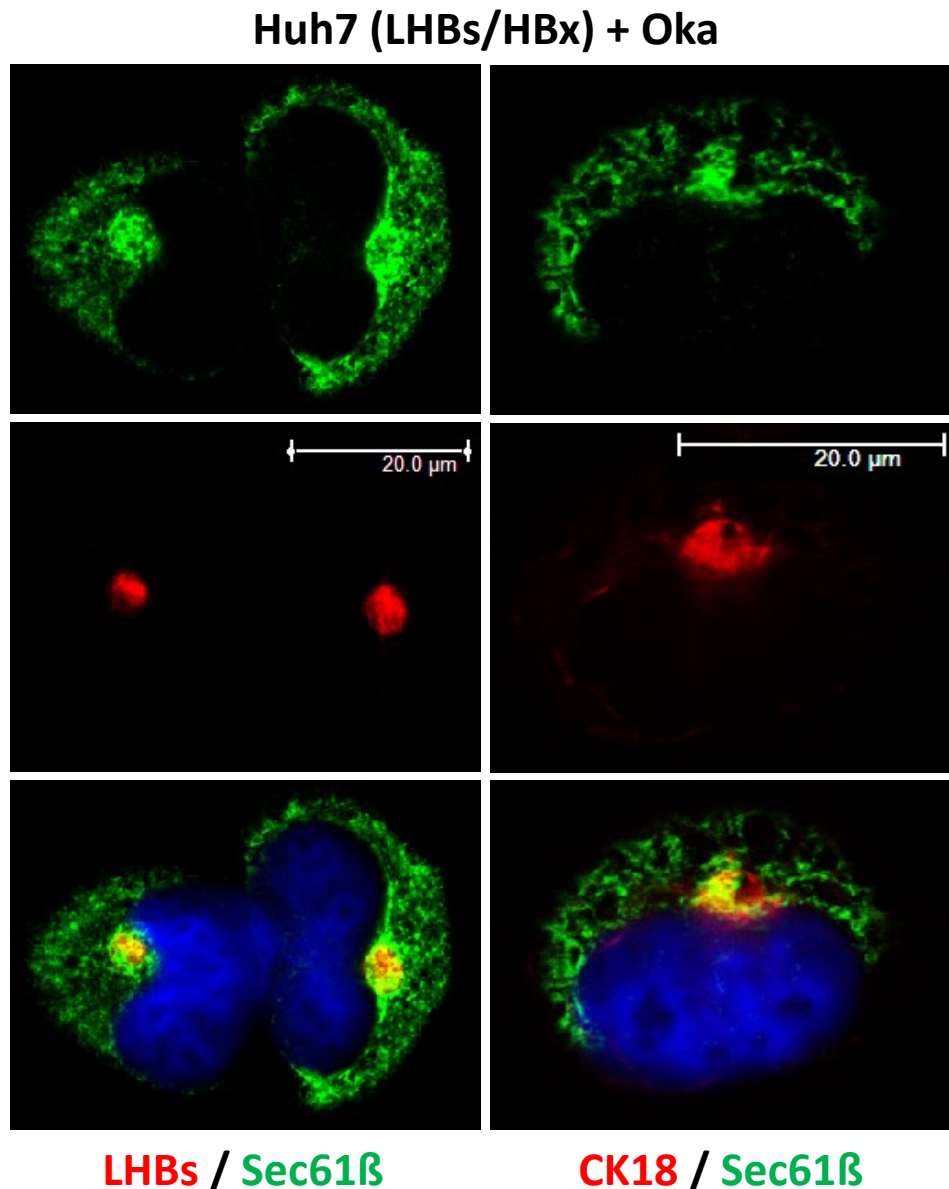


**Abbildung 22: OA induziert einen LHBs-, jedoch keinen ER-Zusammensturz**

Huh7-Zellen (LHBs/HBx) wurden 3 d mit Dox (500 ng/ml) zur LHBs-Expression und danach  $\pm$  5 nM OA für 16 h behandelt (obere Bilder: ohne OA; untere Bilder: + OA). Es erfolgten Immundoppelfärbungen gegen den ER-Marker Sec61 $\beta$  (linke Seite) und LHBs (rechte Seite). Zellkernfärbungen mit DAPI. Dargestellt sind 1000fache Vergrößerungen von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Messbalken repräsentativ für alle Bilder 20  $\mu$ m.

#### 4.11 Untersuchungen zur partiellen ER-Komprimierung nach OA-Behandlung

Im Kapitel 4.10 wurde in ca. einem Drittel der OA-behandelten Huh7-Zellen eine perinukleäre Komprimierung von einem Teil des ER's beobachtet. Durch konfokale Mikroskopie konnte eine eindeutige Kolokalisation der perinukleären LHBs- und CK18-Aggregate mit diesen ER-Verdichtungen festgestellt werden (Abb. 23).

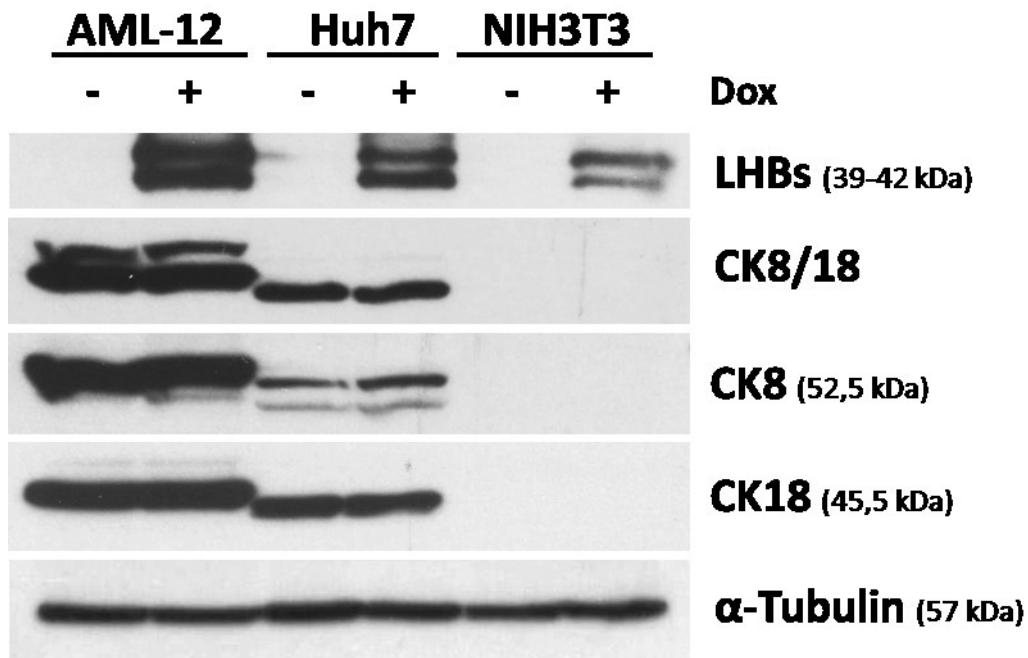


**Abbildung 23: Partielle ER-Komprimierung und Kolokalisation mit fokalen LHBs/CK18-Aggregaten nach OA-Behandlung**

Huh7-Zellen (LHBs/HBx) wurden zur LHBs-Expression 2 d mit Dox (500 ng/ml) behandelt und danach weitere 16 h mit Dox + 5 nM OA inkubiert. Danach erfolgten Immundoppelfärbungen auf LHBs und ER-Marker Sec61β (linke Bilder) sowie CK18 und Sec61β (rechte Bilder). Zellkernfärbungen mit DAPI (blau). Dargestellt sind 630fache Vergrößerungen von fluoreszenzmikroskopischen Konfokal-Aufnahmen. Messbalken 20 μm (repräsentativ für alle Bilder).

#### 4.12 Zytokeratin-Profil von LHBs/HBx-transgenen Zelllinien

Durch eine Western-Blotting-Analyse wurde die Expression von CK8 und CK18 bei Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen (alle LHBs/HBx) vergleichend untersucht (Abb. 24). Bei NIH3T3-Zellen war keine CK8/18-Expression detektierbar. AML-12-Zellen exprimierten insgesamt mehr CK8 und CK18 als Huh7-Zellen, was weitgehend auf die viel größere Menge an CK8 zurückzuführen war. Das Mengenverhältnis von CK18 zu CK8 war in Huh7- ein Vielfaches größer als in AML-12-Zellen. Die LHBs-Expression hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Expressionsstärke von CK8 und CK18.



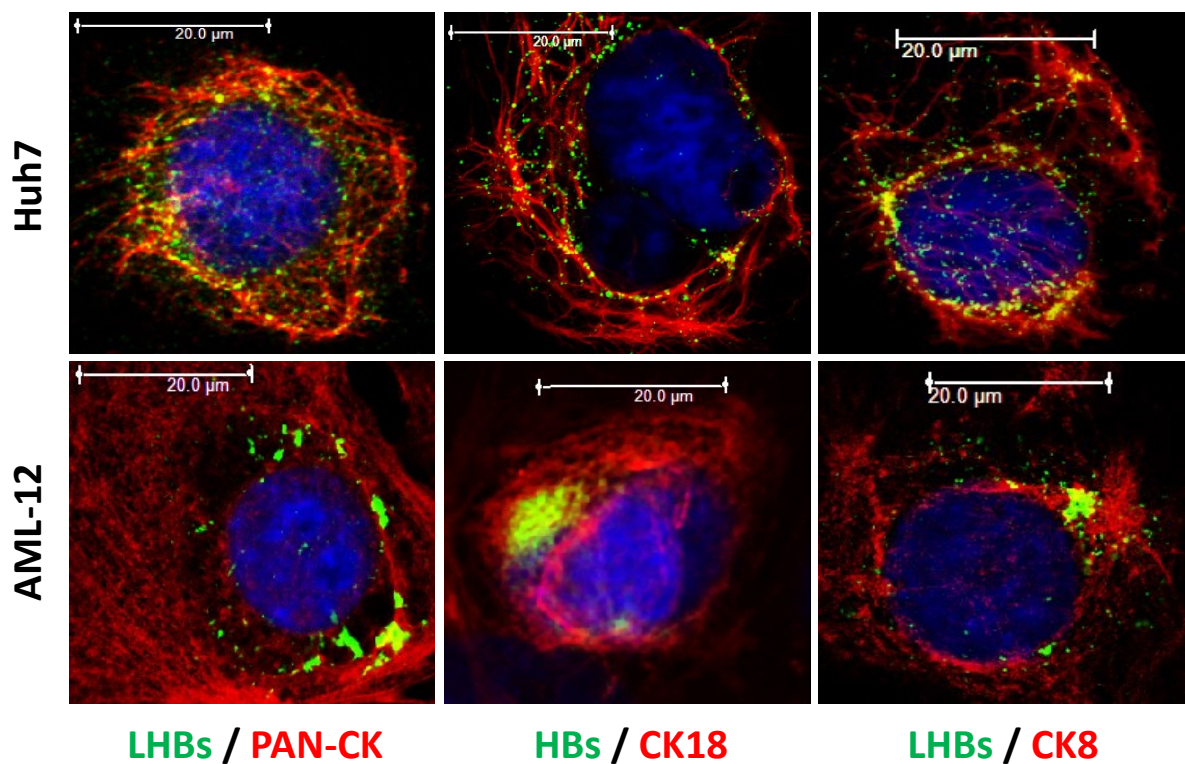
**Abbildung 24: Zytokeratin-Profil von Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen  $\pm$  LHBs-Expression**

Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen (alle mit LHBs/HBx-Konstrukt) wurden zur LHBs-Expression 3 d mit Dox (500 ng/ml) behandelt. Zelllysate wurden durch Western-Blotting-Analyse und Immunfärbungen auf CK8/18 (52,5/45,5 kDa) zusammen und auf CK8, CK18, LHBs (39/42 kDa) und  $\alpha$ -Tubulin (57 kDa) getrennt voneinander untersucht.  $\alpha$ -Tubulin zeigt als Kontrolle eine äquivalente Gesamtprotein-Beladung der Proben auf dem Gel.

### 4.13 Untersuchungen zur Kolokalisation von LHBs mit Zytokeratin 8 und 18

#### 4.13.1 Konfokale Mikroskopie

Den bisherigen Ergebnissen zufolge, war eine Kolokalisation zwischen LHBs und CK8/18 als wahrscheinlich anzunehmen. Zum Nachweis erfolgten Immunfluoreszenz-Färbungen (IC-IF) dieser Proteine in Huh7- und AML-12-Zellen (beide mit LHBs/HBx-Konstrukt) und anschließender Analyse mit konfokaler Mikroskopie. In Überlagerungsaufnahmen der Einzelfärbungen wurde in beiden Zelllinien eine Kolokalisation von LHBs mit PAN-CK als auch mit CK8 und CK18 gesehen (Abb. 25). NIH3T3-Zellen wurden mangels einer CK8/18-Expression nicht untersucht.



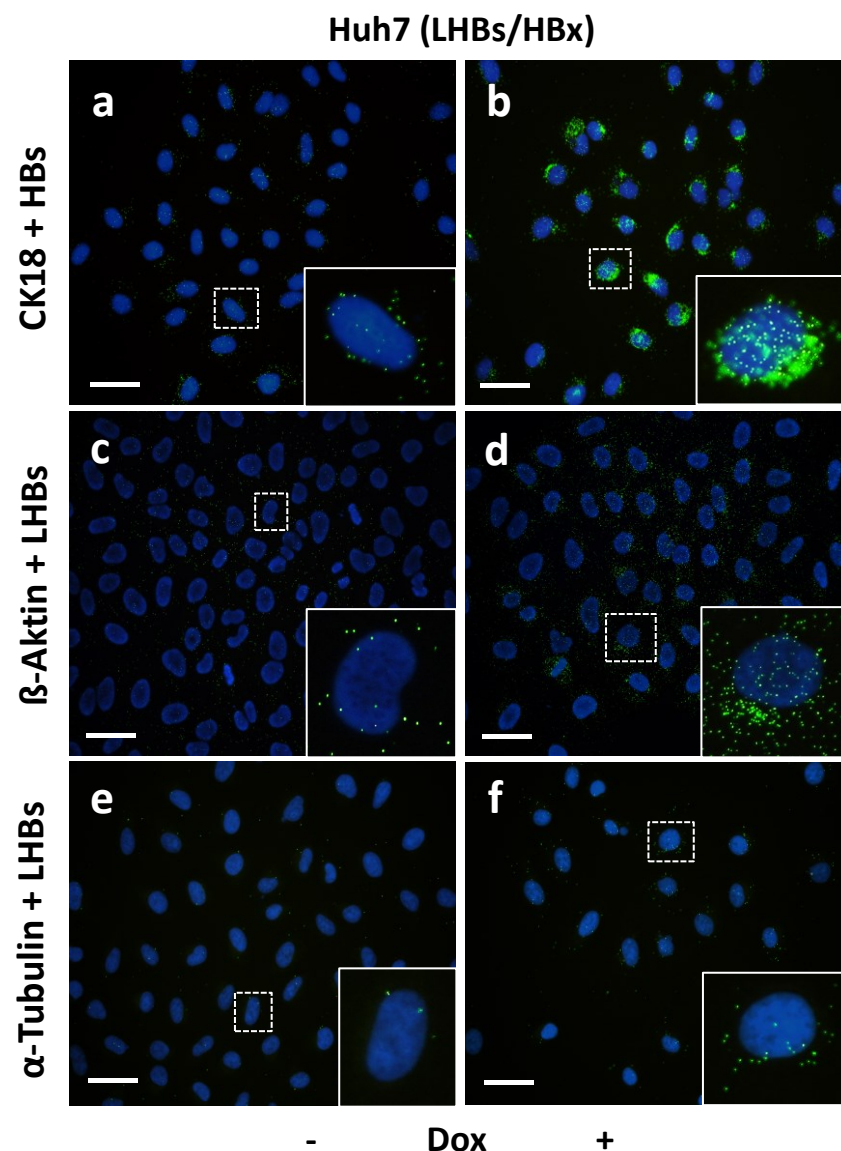
**Abbildung 25: Konfokale Mikroskopie zeigt Kolokalisationen von LHBs/HBs mit Zytokeratinen**

Huh7- und AML-12-Zellen (LHBs/HBx) wurden zur LHBs-Expression 3 d mit Dox (500 ng/ml) behandelt. Danach erfolgten Immunfluoreszenz-Färbungen (IC-IF) auf LHBs (MA18/07-Ak) und PAN-CK bzw. CK8 sowie auf HBs (HBsAg-Ak) und CK18. Zellkernfärbungen mit DAPI (blau). Dargestellt sind konfokal-mikroskopische Aufnahmen (630fache Vergrößerungen) der verschiedenen Fluoreszenzfärbungen aus jeweils einer Zellebene. Zur Sichtbarmachung von Kolokalisationen (gelb-orange Färbung) wurden die Einzelbilder übereinander gelegt. Messbalken 20 µm.



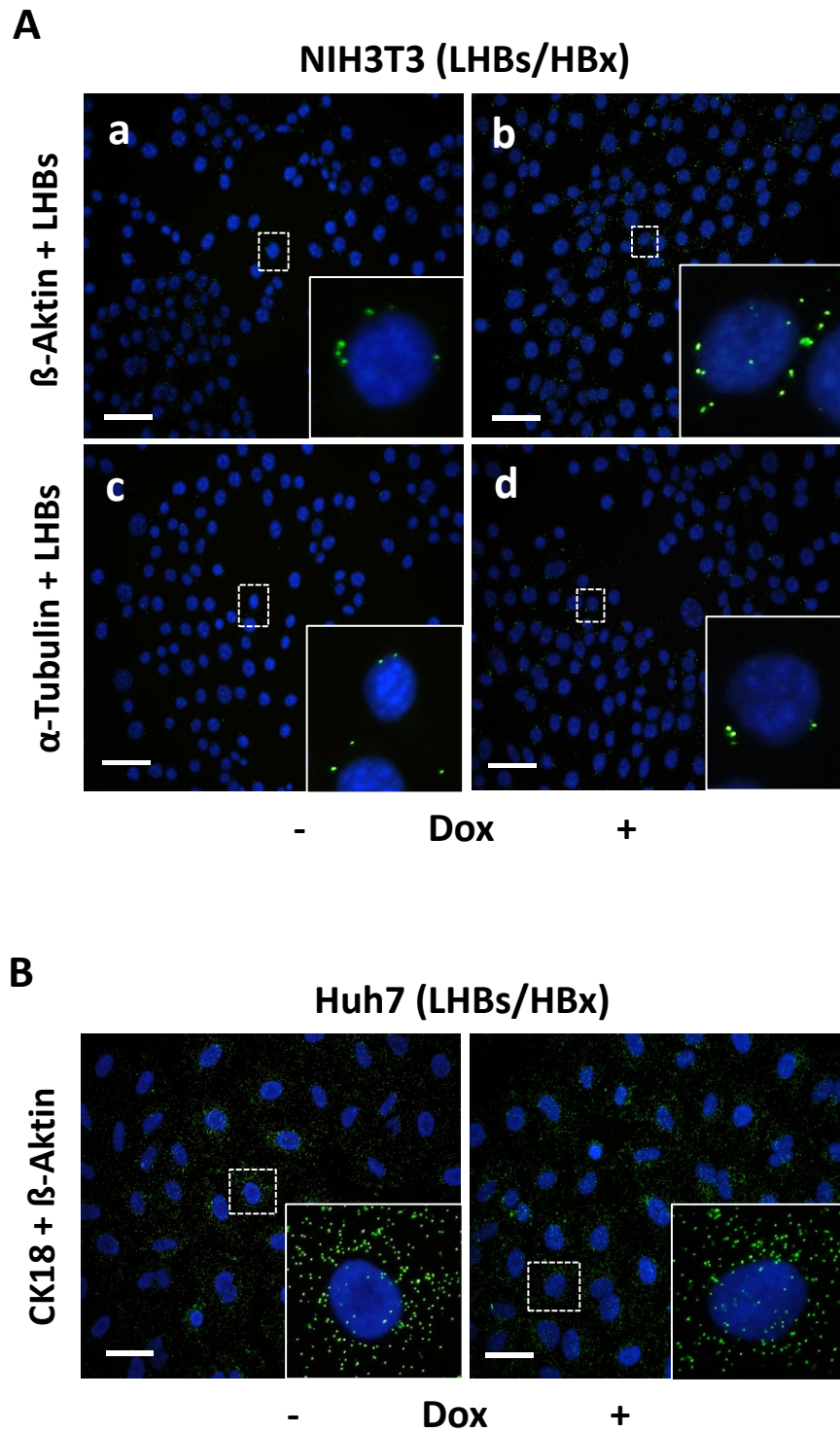
### 4.13.2 Proximity Ligation Assay

Der Proximity Ligation Assay (PLA) wurde zur Bestätigung der in der konfokalen Mikroskopie festgestellten Kolokalisationen und anderer Protein-Kolokalisationen bei Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen (alle LHBs/HBx) angewandt (Abb. 26, 27 und 39). Eine Kolokalisation wird durch grün-fluoreszierende, punktuelle Signale in den Zellen dargestellt. Die Ergebnisse der AML-12- waren dem der Huh7-Zellen analog. Bilder der AML-12-Zellen, s. Anhang, Abb. 39.



**Abbildung 26: Proximity ligation assay (PLA) zur Analyse von Protein-Kolokalisationen in Huh7-Zellen**

Fixierte Huh7-Zellen (LHBs/HBx) wurden mit Primär-Antikörpern gegen die zu testenden Proteine inkubiert und danach der PLA-Assay durchgeführt. CK18 und HBs (a+b);  $\beta$ -Aktin und LHBs (c+d);  $\alpha$ -Tubulin und LHBs (e+f). Dargestellt sind 400fache Vergrößerungen von mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen: Linke Bildseite ohne LHBs-Expression (- Dox); rechte Bildseite mit LHBs-Expression (+ Dox). Repräsentative Einzelzellen sind jeweils im Bildausschnitt rechts unten vergrößert abgebildet. Kernfärbung mit DAPI; Messbalken 50  $\mu$ m.



**Abbildung 27: Proximity ligation assay (PLA) zur Analyse von Protein-Kolokalisationen**

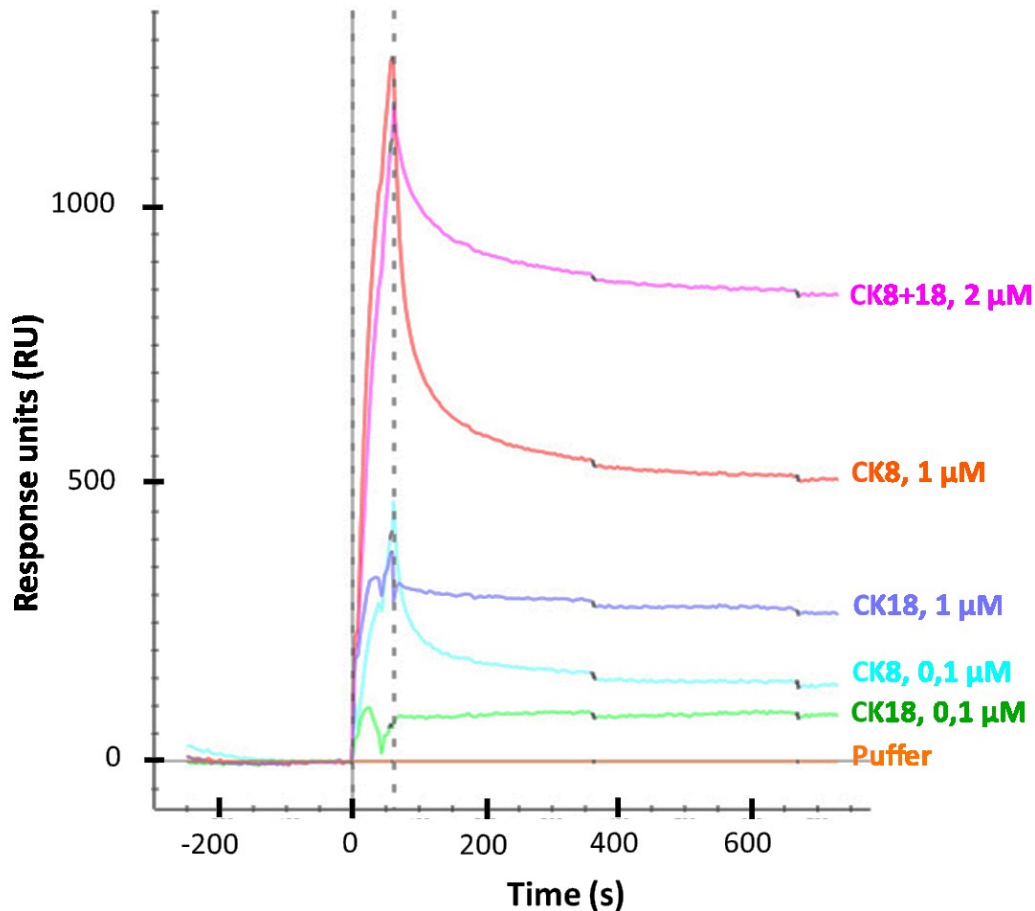
Fixierte NIH3T3- und Huh7-Zellen (beide LHBs/HBx) wurden zunächst mit Primär-Antikörpern gegen die auf Kolokalisation zu testenden Proteine inkubiert und danach der PLA-Assay durchgeführt. **(A)** NIH3T3-Zellen:  $\beta$ -Aktin und LHBs (a+b);  $\alpha$ -Tubulin und LHBs (b+c). **(B)** Huh7-Zellen: CK18 und  $\beta$ -Aktin (a+b). Dargestellt sind 400fache Vergrößerungen von mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen: Linke Bildseite ohne LHBs-Expression (-Dox); rechte Bildseite mit LHBs-Expression (+ Dox). Repräsentative Einzelzellen sind jeweils im Bildausschnitt rechts unten vergrößert abgebildet. Kernfärbung mit DAPI; Messbalken 50  $\mu$ m.

CK18 zeigte bei LHBs-exprimierenden (+Dox) Huh7- und AML-12-Zellen eine sehr starke Kolokalisation mit HBs an (Abb. 26, Abb. 39, a+b). Im Gegensatz hierzu konnte bei allen drei Zelllinien nur eine schwache Kolokalisation von LHBs mit  $\beta$ -Aktin und eine sehr schwache von LHBs mit  $\alpha$ -Tubulin detektiert werden (Abb. 26 c-f, 27 A und 39 c-f).

Eine schwache bis moderate Kolokalisation wurde ebenfalls zwischen CK18 und  $\beta$ -Aktin bei Huh7 (LHBs/HBx)-Zellen beobachtet (Abb. 27 B). Da die Expression von LHBs hierauf keinen Einfluss zeigte, ist von keiner Adaptorfunktion von LHBs zwischen CK18 und  $\beta$ -Aktin auszugehen.

#### **4.14 Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie (SPR)**

Zur Prüfung einer möglichen Bindung / Interaktion von rekombinanten humanen CK8- und CK18-Protein an die für die HBV-Infektion essentielle myristylierte präS1-Domäne von LHBs wurde eine SPR-Messung vorgenommen (Abb. 28). Für beide CK konnte eine eindeutige Bindung / Interaktion festgestellt werden, wobei CK8 stärker als CK18 an das myr-präS1-Peptid bindete. Die Bindung erfolgte in beiden Fällen schnell und pendelte sich nach Erreichen eines Maximums auf ein etwas niedrigeres Niveau ein und wurde dort relativ konstant gehalten. BSA als Ligand diente als Negativkontrolle und zeigte keine Bindung an CK8 und CK18 (nicht gezeigt). Bindungs- und Dissoziationskonstanten wurden nicht ermittelt.



**Abbildung 28: Quantitative Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie zeigt eine Bindung/Interaktion der myr-präS1-Domäne von LHBs mit CK8 und CK18**

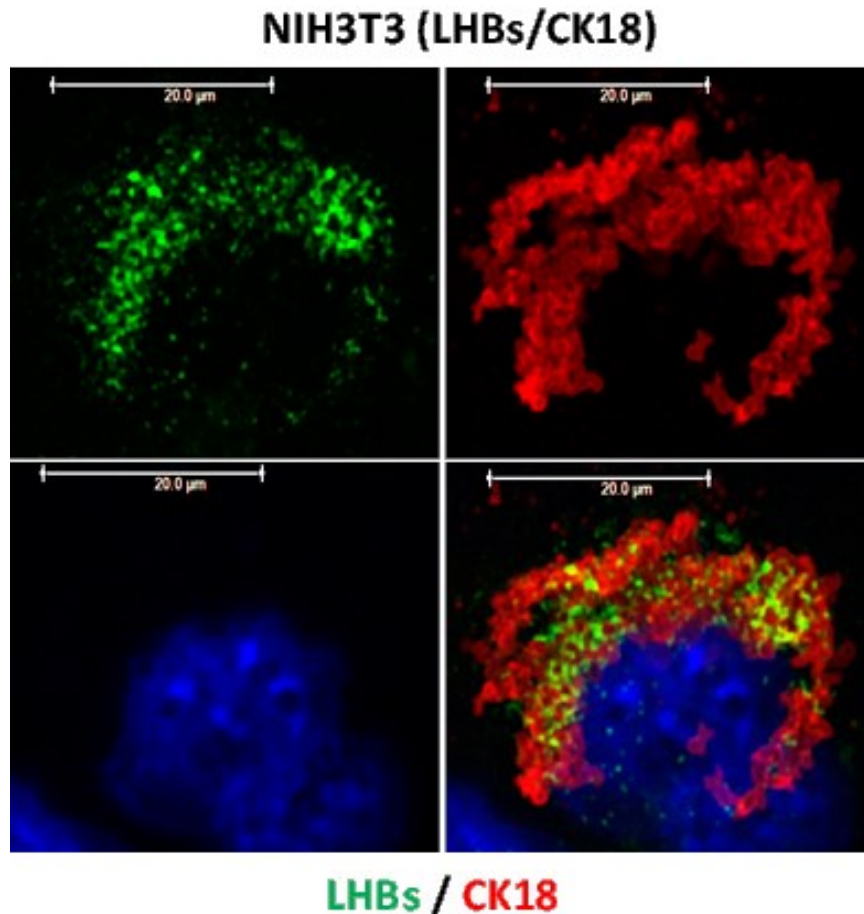
Synthetisch hergestelltes myristyliertes präS1-Peptid (LHBs-Domäne) bzw. BSA als Negativkontrolle (nicht abgebildet) wurden als Liganden auf separaten Matrixbereichen eines Proteom GLM Sensor Chip immobilisiert. CK8 und CK18 wurden als Analyte in einzelnen Ansätzen in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 und 1  $\mu\text{M}$ ) und zusammen in einem Ansatz (2  $\mu\text{M}$ ) mittels Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie untersucht. Dargestellt ist die Stärke der Bindung und Dissoziation des Analyten vom Liganden über die Zeit in sog. *response units*.

#### 4.15 Expression von CK18 und BiP in NIH3T3 (LHBs/HBx)-Zellen

##### 4.15.1 CK18-Expression und LHBs-Verteilung in NIH3T3-Zellen

Um festzustellen, ob eine CK18-Expression in NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) in der Lage ist die Bildung von LHBs-Aggregaten zu verhindern, wurden sie mit einem CK18 (human)-exprimierenden Plasmid transient transfiziert und danach die LHBs-Expression mit Dox induziert. Wie in Abbildung 29 zu erkennen, lag LHBs in transfizierten Zellen intrazellulär

fein verteilt und kolokalisiert mit CK18 vor. CK18 konnte wegen des Fehlens seines natürlichen Bindungspartners CK8 keine CK8/18-Filamente ausbilden.



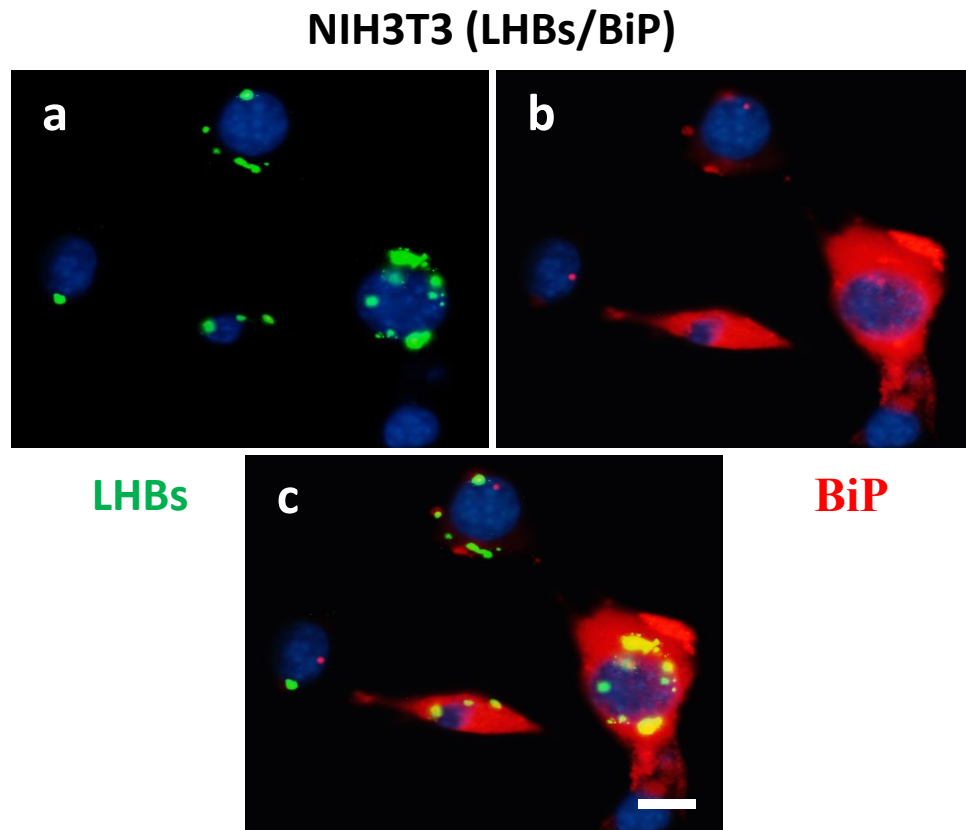
**Abbildung 29: Prävention der LHBs-Aggregatbildung durch CK18-Expression in NIH3T3-Zellen**

NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) wurden transient mit einem CK18 (human)-exprimierendem Plasmid transfiziert und danach die LHBs-Expression mit Dox für 2 d induziert. Danach erfolgte eine IF-Doppelfärbung (IC-IF) gegen LHBs (grün) und CK18 (rot). Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische konfokale Aufnahmen (630fache Vergrößerungen): (a-c) Einzelbilder; (d) Überlagerungsbild. Kernfärbung mit DAPI. Messbalken jeweils 20 µm.

#### 4.15.2 BiP-Expression und LHBs-Verteilung in NIH3T3-Zellen

Eine Western-Blotting-Analyse zeigte eine starke Expression des Chaperons BiP (*Binding immunoglobulin protein*) in Huh7-, jedoch nur eine schwache in NIH3T3-Zellen (Daten nicht gezeigt). Da BiP an korrekten intrazellulären Proteinfaltungen und auch an der ER-Translokation der präS-Domäne von LHBs in Hepatozyten beteiligt ist, wurde sein Einfluss

auf die LHBs-Aggregate durch Überexpression in NIH3T3-Zellen untersucht. Im Gegensatz zur CK18-Expression zeigten sich jedoch keine sichtbaren Veränderungen bei den LHBs-Aggregaten (Abb. 30).



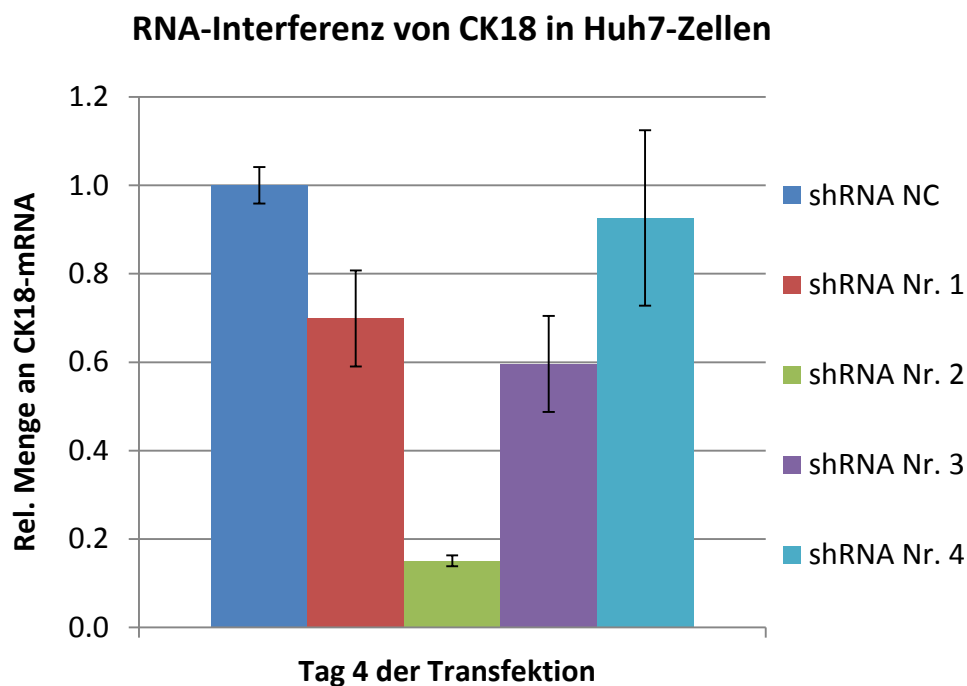
**Abbildung 30: Überexpression des BiP-Proteins in NIH3T3-Zellen**

NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) wurden transient mit einem BiP-Protein (human)-exprimierenden Plasmid transfiziert und 24 h später die LHBs-Expression mit Dox für 2 d induziert. Danach erfolgte eine IF-Doppelfärbung (IC-IF) gegen LHBs (grün) und BiP (rot). Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (1000fache Vergrößerungen): (a, b) Einzelbilder; (c) Überlagerungsbild. Kernfärbung mit DAPI. Messbalken repräsentativ für alle Bilder, 20  $\mu$ m.

## 4.16 RNA-Interferenz gegen CK18

### 4.16.1 Überprüfung des CK18-Knockdown auf RNA- und Protein-Ebene

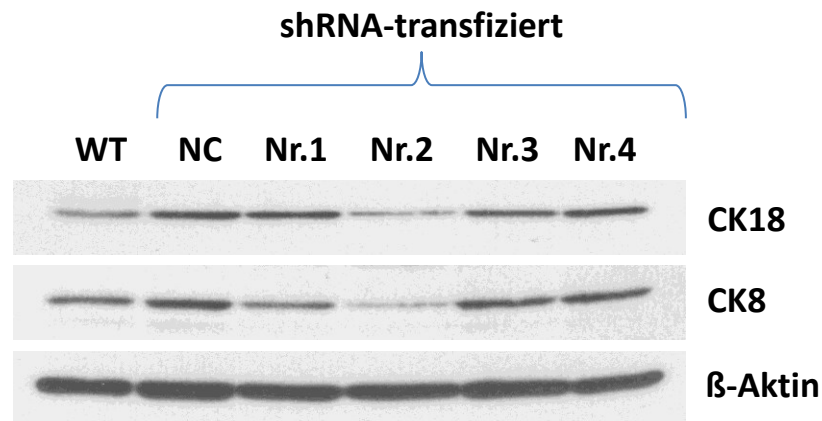
Für weitere Untersuchungen (LHBs-Verteilung, Aufklärung der funktionellen Bedeutung von CK18) wurde CK18 durch RNA-Interferenz herunterreguliert. Dazu wurden verschiedene shRNA-Sequenzen gegen CK18 zunächst auf ihre Wirksamkeit getestet, CK18 auf transkriptioneller Ebene zu reduzieren. Eine shRNA ohne bekannte Zielsequenz im humanen Genom diente als Negativkontrolle (shRNA NC) und die CK18-Transkription in diesen transfizierten Zellen wurden auf 100% gesetzt. Während die shRNA-Sequenzen Nr. 1, 3 und 4 die CK18-Transkription nicht unter 60% reduzieren konnten, erwies sich shRNA Nr. 2 als sehr effektiv und reduzierte die CK18-mRNA um 84% auf nur noch 16% des Wertes der shRNA NC (Abb. 31).



**Abbildung 31: Herunterregulierung von CK18-mRNA in Huh7-Zellen durch RNA-Interferenz**

Huh7-Zellen wurden mit verschiedenen shRNA-exprimierenden Plasmiden gegen CK18 (Nr. 1-4) und einem shRNA-Plasmid ohne bekannte Zielsequenz als Negativ Kontrolle (shRNA NC) transfiziert. Aus lysierten Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und CK18 mittels Real-time PCR (SYBR Green) relativ quantifiziert. Dargestellt ist die relative Menge an CK18-mRNA am Tag 4 der Transfektion nach 2 d Puromycin-Behandlung  $\pm$  Standardabweichungen (n=3).

Die verschiedenen shRNA-Sequenzen wurden auch daraufhin untersucht, inwieweit sie die Proteinexpression von CK18 und CK8 herunterregulieren können. Auch hier zeigte sich shRNA Nr. 2 den anderen shRNA's überlegen. Die Proteinexpression von CK18, aber auch von CK8 wurde deutlich und in etwa gleichem Maße reduziert (Abb. 32).



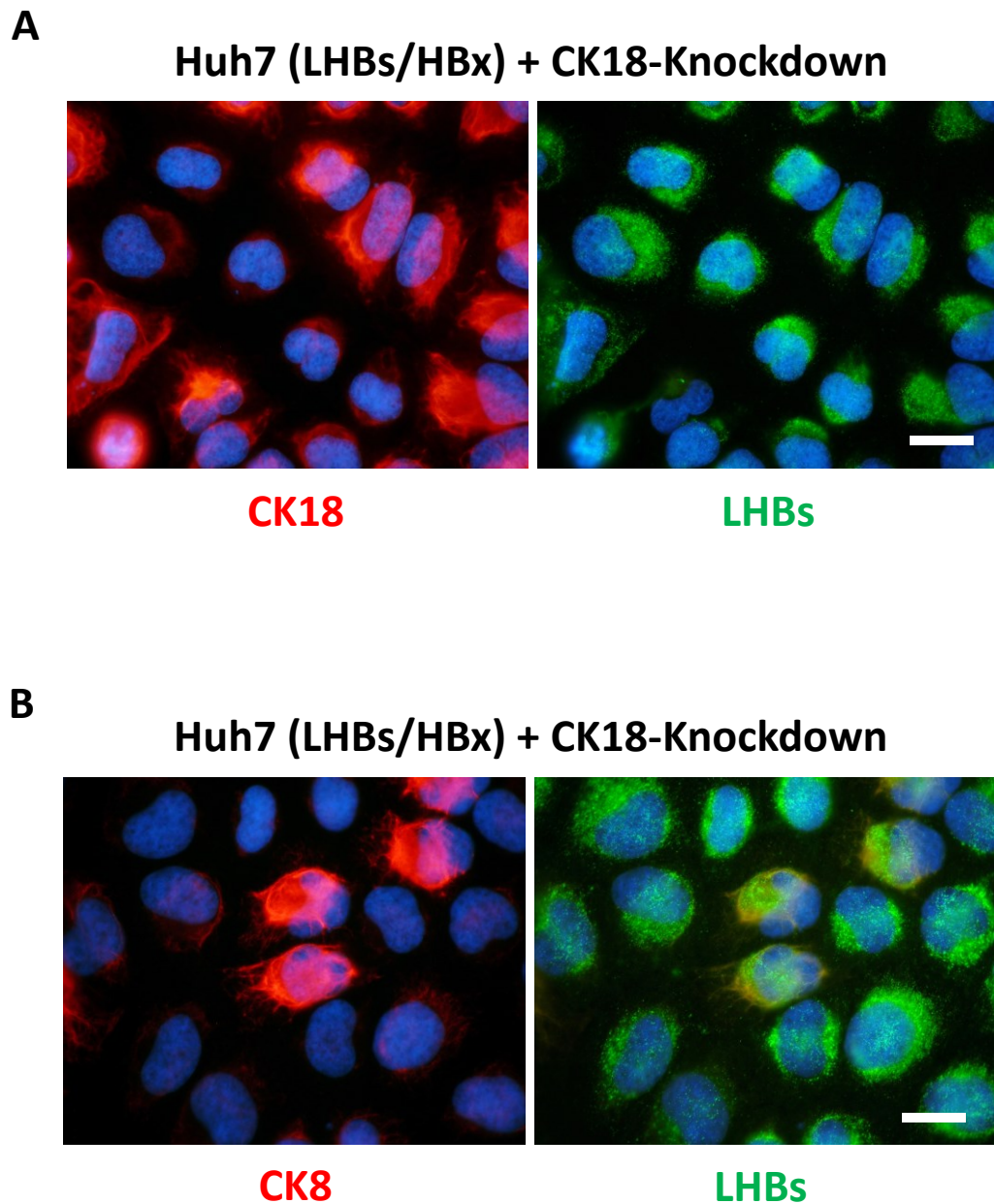
**Abbildung 32: Herunterregulierung von CK8/18-Protein in Huh7-Zellen durch RNA-Interferenz**

Huh7-Zellen wurden mit verschiedenen shRNA-exprimierenden Plasmiden gegen CK18 (Nr. 1-4) und einem shRNA-Plasmid ohne bekannte Zielsequenz als Negativ Kontrolle transfiziert. Zelllysate von WT- und shRNA-transfizierter Huh7-Zellen (Tag 4 der Transfektion nach 2 d Puromycin-Behandlung) wurden durch Western-Blotting-Analyse auf ihre CK8- und CK18-Proteingehalte untersucht.  $\beta$ -Aktin zeigt als Kontrolle eine äquivalente Gesamtprotein-Beladung der Proben auf dem Gel.

#### 4.16.2 CK18-Knockdown und LHBs-Verteilung in Huh7-Zellen

Huh7-Zellen (LHBs/HBx) wurden mit dem shRNA-exprimierenden Plasmid gegen CK18 (shRNA Nr. 2) transient transfiziert und danach die LHBs-Expression mit Dox induziert. Nach einer dreitägigen LHBs-Expression zeigten erfolgreich transfizierte Zellen sowohl eine schwache CK18- als auch CK8-Expression in der Immunfärbung (Abb. 33, A+B). Nicht erfolgreich transfizierte Zellen im gleichen Ansatz wiesen dagegen weiterhin eine starke CK18- und CK8-Expression auf. Hinsichtlich der Verteilung und Expression von LHBs war kein Unterschied zwischen erfolgreich transfizierten Zellen und welchen mit normaler CK8/18-Expression sichtbar. Beide wiesen feinverteiltes LHBs im Zytoplasma auf. In parallel untransfizierten und mit dem shRNA-NC-Plasmid-transfizierten Huh7-Zellen (LHBs/HBx) wurde ebenfalls eine LHBs-Feinverteilung gesehen (Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 33: CK18-Knockdown und LHBs-Verteilung in Huh7-Zellen**

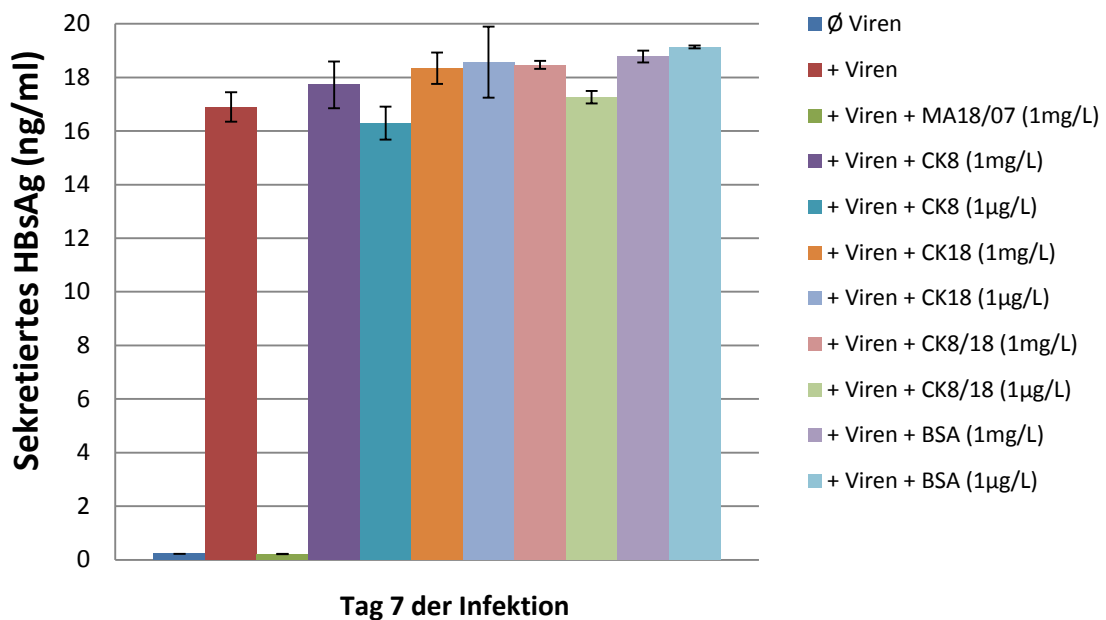
Huh7-Zellen (LHBs/HBx) wurden mit einem shRNA-Plasmid gegen CK18 transient transfiziert und danach die LHBs-Expression 3 d mit Dox induziert. Es folgten IF-Färbungen (IC-IF) auf **(A)** LHBs (grün) und CK18 (rot) und auf **(B)** LHBs (grün) und CK8 (rot). Deutlich sind erfolgreich transfizierte von nicht-transfizierten Zellen durch ihre unterschiedliche CK8- bzw. CK18-Expression zu unterscheiden. Kernfärbung mit DAPI. Messbalken repräsentativ für alle Bilder, 20  $\mu$ m.

## 4.17 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der CK8/18 – LHBs-Interaktion

### 4.17.1 Einfluss von extrazellulärem CK8/18-Protein auf die HBV-Infektion *in vitro*

In diesem Experiment wurde der Einfluss von extrazellulärem CK8- und CK18-Protein (human) auf die *in vitro* HBV-Infektion von Primären Tupaia-Hepatozyten (PTH) untersucht. Die Menge an sekretiertem HBsAg wurde als Maß für die Infektionsrate genommen. Hierbei wurden an allen Tagen der Probenahme (Tag 4, 7 und 11 der Infektion) keine signifikante Veränderungen von sekretiertem HBsAg bei Inkubation von HBV mit CK8 und CK18 im Vergleich zur Positiv-Kontrolle (+ Viren) festgestellt (Abb. 34 zeigt exemplarisch Tag 7 der Infektion). Auch bovines Serumalbumin (BSA) hatte als negative Inhibitor-Kontrolle keinen Einfluss auf die HBsAg-Sekretion. Eine Inkubation von HBV mit dem präS1-spezifischen und neutralisierenden Antikörper MA18/07 (positive Inhibierungskontrolle) inhibierte die Infektion und somit HBsAg-Sekretion jedoch vollständig.

#### Einfluss von extrazellulären Zytokeratinen auf die HBV-Infektion



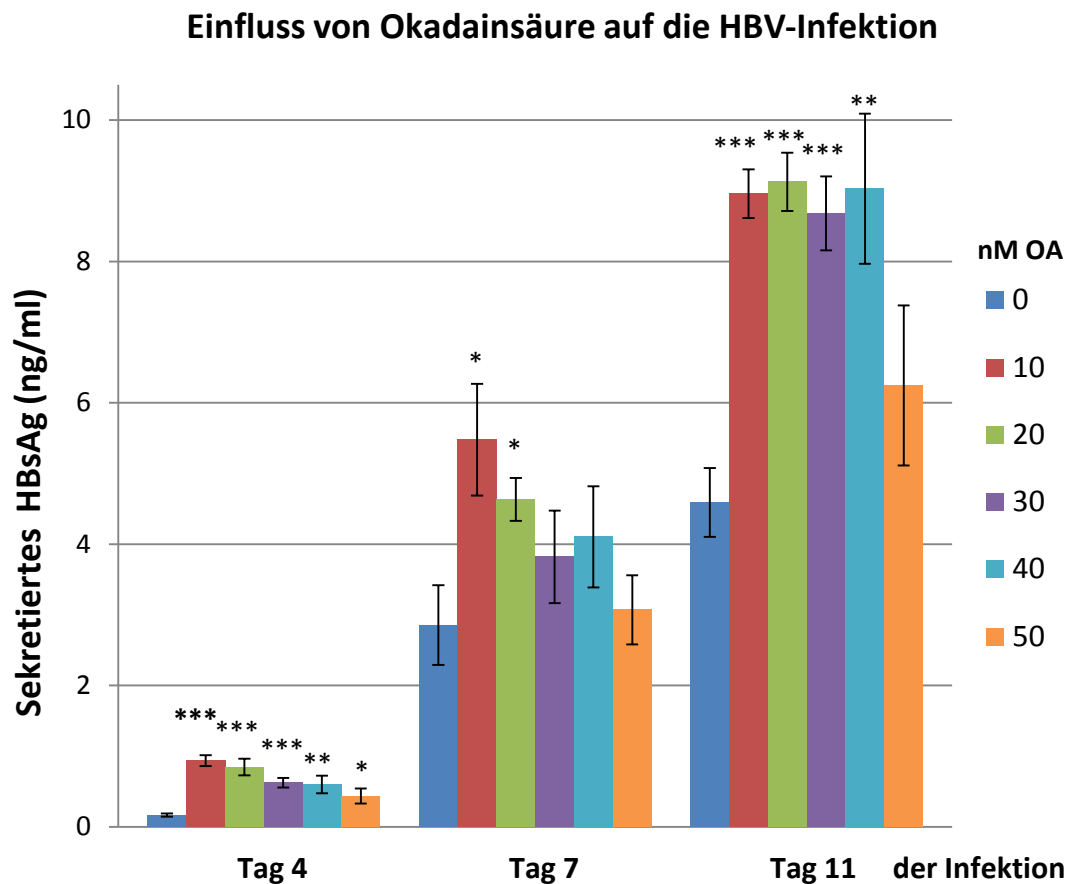
**Abbildung 34: Einfluss von extrazellulären Zytokeratinen auf die HBV-Infektion**

PTH wurden am Tag 4 der Isolierung mit aufgereinigten Hepatitis B-Viren (Patienten-Isolat) ± verschiedene Konzentrationen (1 mg/L und 1 µg/L) an Zytokeratin 8, 18 (einzeln und in Kombination) und bovinem Serumalbumin (BSA) für 16 h inkubiert. PTH ohne Viren diente als vollständige Negativ-Kontrolle, Viren + präS1-spezifischer Antikörper MA 18/07 als positive Inhibitor-Kontrolle und Viren + BSA als negative Inhibitor-Kontrolle der Infektion. Dargestellt sind Harnstoff-Assay-korrigierte Konzentrationen (ng/ml) an sekretiertem HBsAg aus Zellkultur-Überständen von Tag 7 der Infektion ± Standardabweichungen (n=3).

#### 4.17.2 Einfluss von Okadainsäure auf die HBV-Infektion

Okadainsäure (OA) zeigte in Vorexperimenten bei höheren Konzentrationen ( $> 50$  nM) einen zeit- und konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt auf die in dieser Arbeit getesteten Zelllinien und PTH (Daten nicht gezeigt). Daher wurden für dieses Experiment nur OA-Konzentrationen bis max. 50 nM verwendet. Ein Zusammensturz der CK8- und CK18-Filamente mit LHBs konnte mit diesen Konzentrationen in den PTH via Immunfluoreszenz nicht gesehen werden. Jedoch waren vereinzelt Zytokeratin-Granula sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Eine Behandlung von PTH mit 10 nM OA bewirkte an Tag 4 der Infektion eine max. Steigerung der HBsAg-Sekretion um das 5,6fache vs. infizierte Zellen ohne OA-Behandlung (Tab. 10 A). Eine Sekretionssteigerung war auch mit den anderen OA-Konzentrationen erzielbar, jedoch fiel diese mit zunehmender OA-Konzentration ab. Etwa das gleiche Bild war am Tag 7 zu beobachten mit einer max. Sekretionssteigerung von 1,9fach bei 10 nM OA. Am Tag 11 der Infektion pendelte sich die HBsAg-Sekretion bei allen getesteten OA-Konzentrationen, außer bei 50 nM, auf etwa das Doppelte der von OA-unbehandelten Zellen ein. Die Unterschiede waren an Tag 4 und 11 der HBV-Infektion größtenteils sehr signifikant bis hochsignifikant, während an Tag 7 lediglich eine Behandlung mit 10 und 20 nM OA Signifikanzen ergab (Abb. 35; Tab. 10 B).



**Abbildung 35: Einfluss von Okadainsäure auf die HBV-Infektion**

PTH wurden am Tag 4 der Isolierung mit verschiedenen Konzentrationen an Okadainsäure (OA) für 6 h vorbehandelt und dann mit aufgereinigten Hepatitis B-Viren (Patienten-Isolat) unter weiterer OA-Behandlung für 16 h inkubiert. Zellkultur-Überstände von Tag 4, 7 und 11 der HBV-Infektion wurden im ELISA auf sekretiertes HBsAg untersucht, welches proportional zur stattgefundenen Infektionsrate gebildet wird. Dargestellt sind Harnstoff-Assay-korrigierte HBsAg-Konzentrationen (ng/ml) von Tag 4, 7 und 11 der Infektion  $\pm$  Standardabweichungen (n=3). Signifikanzen (p-Werte, zweiseitig) über T-Test für unabhängige Stichproben mit Software SPSS Statistics, Vers. 22, ermittelt. \*  $p \leq 0,05$  signifikant, \*\*  $p \leq 0,01$  sehr signifikant; \*\*\*  $p \leq 0,001$  hochsignifikant.

**Tabelle 10: Vergleiche der HBsAg-Sekretionssteigerungen durch OA-Behandlungen und zugehörige Signifikanzen**

(A) Steigerungen der HBsAg-Sekretionen bei verschiedenen OA-Konzentrationen vs. ohne OA-Behandlung als x-fache Vergleiche der HBsAg-Mittelwerte (MW) an den Tagen 4, 7 und 11 der Probennahmen. (B) p-Werte der HBsAg-Konzentrationen (OA-Behandlungen im Vergleich zu OA-unbehandelten Zellen) an den Tagen der Probennahmen (n=3). p-Werte (zweiseitig) über T-Test für unabhängige Stichproben mit Software SPSS Statistics, Vers. 22, ermittelt. Signifikante Werte sind in Rot hervorgehoben. \*  $p \leq 0,05$  signifikant, \*\*  $p \leq 0,01$  sehr signifikant; \*\*\*  $p \leq 0,001$  hochsignifikant.

**A**

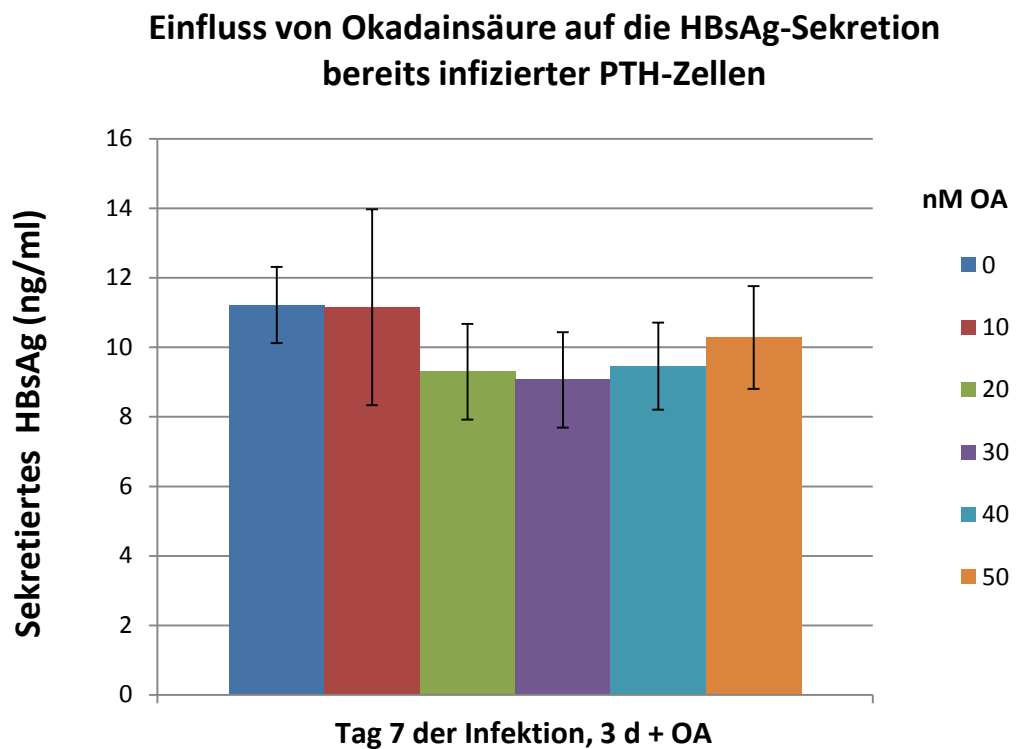
Oka-Konz. (nM)	Tage der Infektion / x-fache HBsAg-MW		
	d4	d7	d11
0	1,0	1,0	1,0
10	<b>5,6</b>	1,9	<b>2,0</b>
20	5,1	1,6	<b>2,0</b>
30	3,8	1,3	<b>1,9</b>
40	3,6	1,4	<b>2,0</b>
50	2,6	1,1	1,4

**B**

Oka-Konz. 0 nM Oka zu	Tage der Infektion / p-Werte		
	d4	d7	d11
10 nM	<b>0,000</b>	<b>0,019</b>	<b>0,000</b>
20 nM	<b>0,001</b>	<b>0,017</b>	<b>0,001</b>
30 nM	<b>0,001</b>	0,189	<b>0,001</b>
40 nM	<b>0,009</b>	0,125	<b>0,006</b>
50 nM	<b>0,026</b>	0,706	0,130

#### 4.17.3 Einfluss von Okadainsäure auf die HBsAg-Sekretion

Parallel zur Untersuchung des Einflusses von OA auf die Infektion wurde ein Sekretionsexperiment durchgeführt. Hierbei wurden bereits infizierte PTH am Tag 4 der Infektion drei Tage mit den gleichen OA-Konzentrationen wie im o.g. Infektionsexperiment behandelt und die HBsAg-Sekretion am Tag 7 der Infektion untersucht. Es konnten keine signifikanten Effekte auf die Sekretion bei verschiedenen OA-Konzentrationen festgestellt werden (Abb. 36).



**Abbildung 36: Einfluss von Okadainsäure auf die HBsAg-Sekretion bereits infizierter PTH-Zellen**

PTH wurden am Tag 4 der Isolierung mit aufgereinigten Hepatitis B-Viren (Patienten-Isolat) für 16 h infiziert. Am Tag 4 der Infektion erfolgte der Zusatz der verschiedenen OA-Konzentrationen (0, 10, 20, 30, 40, 50 nM) für drei Tage. Zellkultur-Überstände von Tag 4 und 7 der Infektion wurden im ELISA auf sekretiertes HBsAg untersucht. Dargestellt sind Harnstoff-Assay-korrigierte HBsAg-Konzentrationen (ng/ml) vom Tag 7 der Infektion  $\pm$  Standardabweichungen (n=3).

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein für HBs-Proteine transgenes *in vitro* Zellkulturmodell geschaffen. Damit sollte u.a. die Frage beantwortet werden, ob die intrazelluläre Akkumulierung von LHBs und HBsAg innerhalb des ER von Hepatozyten, wie man sie in Hepatozyten von chronisch mit HBV infizierter Patienten sowie in Hepatozyten von HBs-Proteinen-exprimierenden Mäusen sieht (Chisari et al., 1986; Churin et al., 2014; Iwai et al., 1988) von Zytokeratinen (CK) bzw. anderen Zytoskelett-Komponenten wie Mikrofilamenten (MF) und Mikrotubuli (MT) beeinflusst wird. Desweiteren sollte ein möglicher Einfluss von CK auf die HBV-Infektion und HBsAg-Sekretion primärer Hepatozyten, isoliert aus südostasiatischen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*), untersucht werden.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- 1) Der Nachweis einer bisher unbekanntem Kolokalisation und Interaktion von LHBs mit CK8 und CK18, dagegen kaum mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli.
- 2) Eine CK18-Expression bewirkte eine Feinverteilung von LHBs in NIH3T3-Zellen, während eine Überexpression des Chaperons BiP und eine Inhibierung der N-Glykosylierung keinen Einfluss auf die Verteilung von LHBs hatten.
- 3) Okadainsäure bewirkte eine Verdopplung der HBV-Infektionsrate bei primären Hepatozyten aus *Tupaia belangeri*, aber hatte selbst keinen Einfluss auf die Sekretion von HBsAg.

### 5.1 Expression und Verteilung von LHBs und SHBs

Bereits Mitte der 80iger Jahre konnte in Hepatozyten HBV-infizierter Patienten sowie auch in für HBV-Oberflächenproteine (HBs) transgenen Mäusen eine Akkumulierung und Aggregatbildung von LHBs und HBsAg festgestellt werden (Chisari et al., 1986; Thung et al., 1986). Die Überproduktion von LHBs in o.g. Mäusen führte auch zu einer verminderten Sekretion von HBsAg ins Serum und somit zu einer toxischen Akkumulierung von HBsAg und LHBs im ER der Hepatozyten (Chisari et al., 1986). Die Folge waren schwere Leberschädigungen (auch Zelltod von einzelnen Hepatozyten), sekundäre Entzündungsprozesse und Hepatokarzinogenese (Chisari et al., 1987; Chisari et al., 1989).

Eine Aggregatbildung des LHBs konnte ebenfalls in den in dieser Arbeit erzeugten NIH3T3- und AML-12-Zellen, transgen für LHBs oder LHBs/HBx, festgestellt werden. Die AML-12 wiesen auch feinverteiltes LHBs auf. Dagegen traten keine LHBs-Aggregate in LHBs- bzw. LHBs/HBx-transgenen Huh7-Zellen auf. Im Gegensatz dazu führte die alleinige Expression von SHBs in allen drei Zelllinien zu einer Feinverteilung des SHBs im Zytoplasma der Zellen. Desweiteren wurde die subzelluläre Lokalisation des LHBs in den drei Zelllinien untersucht. Analysen mittels konfokaler Mikroskopie ergaben, dass LHBs in allen drei Zelllinien mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) kolokalisierte, jedoch nicht mit dem Golgi-Apparat. Demnach war das unterschiedliche Verteilungsmuster des LHBs zwischen den Zelllinien nicht durch die Lokalisation des LHBs im ER bzw. Golgi-Apparat bedingt. Verschiedene Studien unterstützen diese Befunde. Demnach wird LHBs im ER bzw. einem ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) zurückgehalten und wird nur sekretiert, allerdings auf niedrigem Niveau, in der Gegenwart von SHBs oder MHBs (Cheng et al., 1986; Chisari et al., 1987; Molnar-Kimber et al., 1988; Nemeckova et al., 1994; Ou and Rutter, 1987; Persing et al., 1986). Es wird angenommen, dass die LHBs-Sekretion durch Bildung von Disulfid-Komplexen zwischen den drei HBs-Proteinen zustandekommt (Bruss et al., 1996a; Clayton et al., 2001). In Zelllysaten der drei erzeugten Zelllinien, transgen für LHBs bzw. LHBs/HBx, wurde zwar im Western-Blot eine sehr starke LHBs-, aber nur eine sehr schwache SHBs-Expression detektiert (Daten exemplarisch für SHBs bei NIH3T3-Zellen gezeigt, Abb. 16 B). Mittels ELISA-Messungen wurde daher eine quantitative Erfassung der sekretierten und intrazellulären HBs-Proteine in den Zelllinien vorgenommen. Während deutliche SHBs-Mengen von den Zelllinien mit SHBs-Konstrukt sekretiert wurden, waren keine HBs-Proteine in Zellkultur-Überständen von jenen mit dem LHBs/HBx-Konstrukt messbar. In den Zelllysaten der Zelllinien beider Konstrukte waren hingegen HBs-Proteine eindeutig nachweisbar. Diese Ergebnisse und die zuvor genannten Western-Blotting Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Zelllinien mit LHBs/HBx-Konstrukt nur geringfügige Mengen an SHBs exprimierten. Dagegen exprimierten und sekretierten transgene Mäuse mit der gleichen LHBs/HBx-Sequenz, deutliche HBsAg-Mengen (Chisari et al., 1986; Churin et al., 2014). Die LHBs-Expression stand hier allerdings unter der Kontrolle eines Albumin- statt eines CMV-Promotors.

Eine Studie zeigte, dass die Induktion von ER-Stress den SHBs-Promotor aktiviert (Xu et al., 1997b). Analog konnte die SHBs-Expression in NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) durch Tunicamycin-Behandlung stark induziert werden (Kapitel 4.6). Die Fähigkeit zur SHBs-Expression ist somit durch das verwendete LHBs/HBx-Konstrukt grundsätzlich gegeben.



Moderate HBsAg-Konzentrationen wurden von Huh7-Zellen sekretiert, die transient mit einem HBs-Konstrukt ohne CMV-Promotor transfiziert waren. In diesen Zellen wurde die HBs-Expression nur durch die natürlichen HBV-Promotoren gesteuert, wodurch die HBs im physiologischen Verhältnis exprimiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die sehr schwache SHBs-Expression in den Zelllinien mit LHBs/HBx-Konstrukt, gesteuert durch den internen präS2-Promotor, könnte daher durch den starken CMV-Promotor, der vor der präS1-Sequenz liegt, und / oder durch dem im Gegensatz zur *in vivo* Situation in Mäusen fehlenden ER-Stress in Zellkultur verursacht sein.

Bei der Untersuchung des Zeitverlaufs der LHBs-Expression in Huh7- und NIH3T3-Zellen (beide LHBs/HBx) wurde eine stärkere Glykosylierung des LHBs bei NIH3T3-Zellen in der Western-Blotting-Analyse gesehen. Literaturdaten zeigen, dass das LHBs-Protein im Hepatitis B Virus obligat N-glykosyliert vorliegt. Daneben kann es auch fakultativ O-glykosyliert sein (Schmitt et al., 2004). Da jedoch LHBs in den untersuchten Zelllinien nicht mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert war, ist nur von einer N-Glykosylierung des LHBs auszugehen. N-Glykosylierungen sind für viele Proteine u.a. wichtig für ihre korrekte Faltung, Degradation und Sekretion (Helenius and Aebi, 2004). Um den Einfluss der N-Glykosylierung auf die intrazelluläre LHBs-Verteilung zu untersuchen, wurden NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) mit Tunicamycin, einem Inhibitor von N-Glykosylierungen, behandelt. Jedoch hatte weder eine Behandlung der Zellen vor oder nach der LHBs-Expression eine Änderung der LHBs-Verteilung zur Folge. In analoger Ergänzung zu diesen Ergebnissen wurden in einer Studie keine Veränderungen im Zusammenbau und Freisetzung von Hepatitis B Viren durch Inhibierung der N-Glykosylierung des LHBs festgestellt (Lambert and Prange, 2007).

## 5.2 Untersuchungen zur Interaktion von LHBs mit dem Zytoskelett

Eine chronische Hepatitis B (CHB) Virusinfektion (HBV) führt zur Akkumulierung und Aggregatbildung von HBsAg und LHBs im ER der Hepatozyten. Dies wurde auch in HBs-transgenen Mäusen beobachtet. Hepatozyten exprimieren große Mengen an CK8 und CK18, die bei einer CHB vermehrt hyperphosphoryliert sind, was mit einem schwereren Krankheitsverlauf korreliert. Ein Kennzeichen verschiedener Lebererkrankungen sind Mallory-Denk-Körperchen (MDB), die überwiegend hyperphosphorylierte CK8/18-Aggregate in Hepatozyten darstellen (Strnad et al., 2008). Zudem sind eine Reihe von Zytokeratin-Pathogen-Interaktionen, wie auch bei Hepatitis-Viren bekannt, die einen direkten Einfluss von

CK auf die Infektion, Replikation oder Freisetzung der Pathogene aus den Wirtszellen zeigen (Kapitel 1.2.4.4). Die Abhängigkeit der LHBs-Verteilung, insbesondere von Zytokeratinen, aber auch von anderen Zytoskelett-Komponenten wie Mikrofilamenten (MF) und Mikrotubuli (MT) wurde daher untersucht.

Zunächst erfolgten Immunfluoreszenz-Färbungen auf PAN-CK und LHBs in LHBs/HBx-transgenen Huh7- und NIH3T3-Zellen. Während NIH3T3-Zellen LHBs-Aggregate, aber kaum eine PAN-CK-Färbung aufwiesen, zeigten Huh7-Zellen eine starke PAN-CK-Färbung und feinverteiltes LHBs im Zytoplasma. Dies war ein Hinweis, dass Zytokeratine einen Einfluss auf die intrazelluläre LHBs-Verteilung haben könnten. Analoge Ergebnisse wurden bei Färbungen auf HBs und CK18 sowie LHBs und CK8 erzielt. IF-Färbungen auf andere Zytoskelett-Komponenten wie  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Aktin zeigten dagegen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Zelllinien. Um mögliche Interaktionen zwischen LHBs mit Filamenten von Zytoskelett-Komponenten wie Mikrofilamente (MF), Mikrotubuli (MT) und Zytokeratine (CK) sichtbar zu machen, wurden Substanzen zu deren spezifischen Depolymerisierung eingesetzt. Von Okadainsäure (OA) ist bekannt, dass es u.a. zur Hyperphosphorylierung und infolgedessen zu einer erhöhten Löslichkeit und Granulabildung von Zytokeratinen führt (Blankson et al., 1995; Kasahara et al., 1993; Strnad et al., 2001; Yatsunami et al., 1993). In Huh7- und AML-12-Zellen (beide LHBs/HBx) kam es durch OA-Behandlung zu einem punktuellen Zusammensturz von feinverteiltem LHBs und PAN-CK in einem gemeinsamen perinukleären Bereich, was auf eine Interaktion zwischen beiden Proteinen schließen ließ. Literaturdaten zeigen, dass OA zeit- und konzentrationsabhängig zu einer reversiblen Fragmentierung des Golgi-Apparats führt (Lucocq et al., 1991; Reaven et al., 1993; Tamaki and Yamashina, 2002; Waschulewski et al., 1996). Mit den in den eigenen Experimenten eingesetzten OA-Konzentrationen wurden jedoch nur geringfügige Effekte auf den Golgi-Apparat der drei verwendeten Zelllinien gesehen (Daten nicht gezeigt). Zudem war LHBs zwar mit dem ER, aber nicht mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert, sodass kein Effekt auf die LHBs-Verteilung hinsichtlich einer evtl. Golgi-Fragmentierung zu erwarten war. Obwohl solche Effekte nicht für das ER beschrieben sind, wurde ein möglicher Einfluss von OA auf das ER mittels IC-IF überprüft. Dabei kam es in Huh7-Zellen (LHBs/HBx), ungeachtet eines Zusammenbruchs von LHBs und Zytokeratin-Filamenten, zu keiner wesentlichen Veränderung der ER-Morphologie bei den eingesetzten OA-Konzentrationen. Lediglich wurde in ca. einem Drittel der Zellen eine Verdichtung des ER's im Bereich der LHBs- und Zytokeratin-Aggregate mit deren gleichzeitiger Kolokalisation beobachtet. Diese Ergebnisse sind schlüssig, da die HBV-Oberflächenproteine als Transmembran-Proteine des

ER's translatiert werden und LHBs weitgehend im ER bzw. in der ERGIC-Region zurückgehalten wird. Da Zytokeratine und andere IF-Filamente sowie MF und MT mit diversen Organellen (ER, Golgi, Mitochondrien) interagieren und für ihre richtige Positionierung in der Zelle sorgen (Bola and Allan, 2009; Gurel et al., 2014; Toivola et al., 2005) ist eine teilweise gegenseitige Beeinflussung zu erwarten. Eine teilweise Kolokalisation von Zytokeratinen mit dem ER wurde durch eigene konfokalmikroskopische Analysen in Huh7- und AML-12-Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren wurde Nocodazol (Noc) zur Depolymerisierung von Tubulin und Cytochalasin D (CytoD) zur Depolymerisierung von Aktin eingesetzt. Während es mit Noc zu keiner sichtbaren Veränderung der LHBs-Verteilung in drei Zelllinien kam, veränderte CytoD leicht die LHBs-Verteilung in Huh7- und AML-12-Zellen. Obwohl es durch eine weitgehend fehlende Überlagerungsfärbung keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion von LHBs mit  $\beta$ -Aktin durch CytoD-Behandlung gab (Abb. 21 d), war eine solche zwischen LHBs und PAN-CK deutlich sichtbar (Abb. 21 b). Hier kam es durch CytoD zu einer nahezu identischen Veränderung der Verteilung von LHBs und CK-Filamenten, wobei letztere teilweise punktförmig, wie  $\beta$ -Aktin nach CytoD-Behandlung, vorlagen. Grundsätzlich sind zwei Erklärungsansätze denkbar: Entweder wirkte CytoD leicht unspezifisch und beeinträchtigte auch direkt Zytokeratine oder was eher anzunehmen ist,  $\beta$ -Aktin lag mit Zytokeratinen teilweise assoziiert vor und es kam zu einer indirekten Beeinflussung von LHBs. Für letztere Annahme spricht auch das Ergebnis des *Proximity Ligation Assays* (PLA) zwischen CK18 und  $\beta$ -Aktin (s. nächster Abschnitt). Literaturdaten zeigen, dass die Zytoskelett-Mitglieder durch Linkerproteine wie z.B. Plektin oder bullöses Pemphigoid-Antigen 1 teilweise miteinander verknüpft sind (Chang and Goldman, 2004; Jefferson et al., 2004).

### **5.3 Zytokeratinprofil und Untersuchungen zur Kolokalisation und Interaktion von LHBs und Zytokeratin 8 und 18**

Die bisherigen Ergebnisse zur LHBs-Verteilung und Zytokeratin-Expression in Huh7- und NIH3T3-Zellen legten nahe, dass LHBs mit Zytokeratinen interagiert. Dies sollte mit zusätzlichen Methoden im Detail untersucht und bestätigt werden.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, warum AML-12-Zellen trotz starker PAN-CK-Färbung auch LHBs-Aggregate aufwiesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Mallory-Denk Körperchen (MDB) in Hepatozyten überwiegend aus ubiquitinierten CK8/18-

Proteinaggregaten bestehen und dass ein Überschuss von CK8 im Verhältnis zu CK18 ihre Entstehung fördert bzw. umgekehrt verhindert (Nakamichi et al., 2005; Zatloukal et al., 2000). Da Hepatozyten und meist auch davon abstammende Zelllinien als Zytokeratine einzig CK8 und CK18 exprimieren (Fuchs and Weber, 1994) wurde ein Profil dieser beiden Zytokeratine bei den drei LHBs/HBx-transgenen Zelllinien erstellt. Während kein CK8/18 in NIH3T3-Zellen detektiert werden konnte, wiesen AML-12- im Vergleich zu Huh7-Zellen ein weit größeres CK8 zu CK18-Verhältnis auf. Diese Ergebnisse, die Verhinderung von LHBs-Aggregaten in NIH3T3 durch CK18-Expression (s.u., Kapitel 5.4) und o.g. Literaturdaten lassen vermuten, dass das CK-Verhältnis verantwortlich für die LHBs-Verteilung in den AML-12- und Huh7-Zellen sein könnte. Die LHBs-Expression selbst hatte keinen Einfluss auf die Zytokeratin-Expression bzw. das CK8/18-Verhältnis in den drei Zelllinien.

Im Anschluss erfolgten Kolokalisationsanalysen mittels konfokaler Mikroskopie und PLA-Assay. Beide Methoden können bei unmittelbarer Nähe von zwei Proteinen (PLA < 40 nm, Konfokale Mikroskopie ca. 350 – 400 nm; Mitteilung der Fa. Sigma-Aldrich bzw. der Fa. Leica) deren Kolokalisation auf verschiedene Art und Weise anzeigen.

In Huh7- und AML-12-Zellen (beide LHBs/HBx) wurde eindeutig eine Kolokalisation von LHBs mit PAN-CK und CK8 bzw. auch HBs mit CK18 über konfokale Mikroskopie nachgewiesen. Wegen Speziesgleichheit (beide von Maus) konnte CK18 nicht zusammen mit dem spezifischen LHBs-Antikörper MA18/07 untersucht werden. Daher wurde CK18 zusammen mit einem für alle HBV-Oberflächenproteine (HBs) spezifischen Antikörper (von Kaninchen) in den Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen eingesetzt. Da in den getesteten Zellen jedoch fast nur LHBs und nur sehr wenig SHBs und MHBs exprimiert wurde, ist davon auszugehen, dass dieser Antikörper fast ausschließlich LHBs detektierte. Jedoch war LHBs bzw. HBs nicht vollständig mit Zytokeratinen kolokalisiert. Insbesondere traf dies für LHBs-Aggregate in AML-12-Zellen zu. Der Grund hierfür könnte sein, dass diese Aggregate bevorzugt in Bereiche der Zelle ausgelagert werden, die kein oder nur sehr wenig Zytokeratin enthalten. Insgesamt war die Kolokalisation von LHBs mit CK, die LHBs-Feinverteilung und das CK18 zu CK8-Verhältnis in Huh7- grösser als in AML-12-Zellen. Das größere CK18 zu CK8-Verhältnis könnte ähnlich wie bei der Bildung von Mallory-Denk-Körperchen die Feinverteilung fördern und zu der grösseren LHBs-CK-Kolokalisation in Huh7-Zellen beitragen. Kleinere LHBs-Partikel sind im Vergleich zu größeren Aggregaten beweglicher und besitzen zudem eine im Verhältnis zum Volumen größere Oberfläche und somit mehr potentielle Bindungsstellen für Interaktionen mit z.B. Zytokeratinen. Die LHBs-Partikel könnten so häufiger und leichter an Keratinproteine binden und im Zytoplasma verteilt

werden. Dem Keratin-Zyklus könnte hierbei die entscheidende Rolle zukommen (s. Kap. 1.2.4.5). Dies könnte auch einen Mechanismus darstellen, der LHBs-exprimierende Huh7-Zellen in die Lage versetzt, im ER oder in der ERGIC-Region akkumuliertes LHBs zu entfernen. Die nicht detektierbare CK8/18-Expression und LHBs-Aggregate in NIH3T3-Zellen sprechen ebenso für diese Hypothese. Mangels CK8/18 konnten bei NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) keine Kolokalisations-Analysen zwischen Zytokeratinen und anderen Proteinen mit konfokaler Mikroskopie und PLA-Assay vorgenommen werden.

Mittels PLA-Assay konnte die bereits mit konfokaler Mikroskopie gesehene Kolokalisation von HBs mit CK18 bzw. LHBs mit CK8 bei Huh7- und AML-12-Zellen (beide LHBs/HBx) bestätigt werden. Die PLA-Daten von LHBs mit CK8 waren denen von HBs mit CK18 analog und wurden daher nicht gezeigt. Der Grad der Kolokalisation war mit beiden Antikörper-Kombinationen und beiden LHBs-exprimierenden Zelllinien (+ Dox-Zugabe) im Vergleich zu den gleichen Zellen, die nicht LHBs exprimierten (ohne Dox) sehr hoch. Der PLA-Assay bietet durch einen DNA-Amplifikationsschritt bei vorliegender Kolokalisation, eine sehr hohe Empfindlichkeit der Signaldetektion über fluoreszenzgekoppelte DNA-Sonden. Dies ermöglicht es, im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie, auch schwache Kolokalisationen empfindlich zu detektieren. Im Gegenzug erhöht sich, insbesondere bei der Verwendung von auch unspezifisch reagierenden Antikörpern, das Grundrauschen. Für diesen Assay wurden daher nur sehr spezifisch reagierende Antikörper in hoher Verdünnung eingesetzt. Ein weiterer Vorteil des Assays besteht in der im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie leichteren semiquantitativen Erfassung des Kolokalisationsgrads, der proportional zur spezifischen Signalfluoreszenz ist. Dagegen muss bei konfokaler Mikroskopie die Überlagerung und Intensität von zwei verschiedenen Fluoreszenzsignalen in mehreren Zell-Schichtebenen erfasst und summiert werden. Dadurch kommt es insb. bei schwächeren Signalen zu nicht unerheblichen Signalverlusten durch sog. „Photobleaching“.

Alle drei Zelllinien wurden zudem auf eine Kolokalisation von LHBs mit  $\beta$ -Aktin bzw.  $\alpha$ -Tubulin mittels PLA-Assay untersucht. Hierbei konnte eine schwache Kolokalisation von LHBs mit  $\beta$ -Aktin und eine nur sehr schwache mit  $\alpha$ -Tubulin detektiert werden. Eine weitgehend fehlende Überlagerungsfärbung zwischen LHBs und  $\beta$ -Aktin wurde bereits in einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung bei Huh7-Zellen  $\pm$  CytoD gesehen (Kapitel 4.9). Zudem bewirkte Cytochalasin D eine leichte Änderung der Zytokeratin- und LHBs-Verteilung, die wahrscheinlich mit der teilweisen Verknüpfung von Zytokeratin- mit Aktin-Filamenten erklärbar ist (s. voriger Abschnitt). Eine moderate Kolokalisation von  $\beta$ -Aktin und CK18 in Huh7-Zellen konnte mittels des PLA-Assays beobachtet werden. Deren Stärke war

unabhängig einer LHBs-Expression, was darauf hindeutet, dass LHBs keine Adaptorfunktion zwischen diesen Proteinen einnimmt.

Der direkte Nachweis einer Interaktion der myristylierten präS1-Domäne von LHBs (myr-präS1) mit humanen rekombinanten CK8- und CK18-Protein wurde schließlich mit Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) erbracht. Während BSA als Kontrollprotein nicht an immobilisiertes myr-präS1-Peptid bindete, interagierten sowohl CK8 und CK18 im Einzel- wie im Doppelansatz mit dem Peptid und führten zu einem konzentrationsabhängigen Signal.

#### 5.4 Untersuchungen zur LHBs-Aggregatbildung

Die bisherigen Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass CK18 an der intrazellulären Feinverteilung von LHBs verantwortlich ist. Daher wurde humanes CK18-Protein (Proteinsequenz-Identität bzw. -Ähnlichkeit zu murinen CK18: 86,3% bzw. 92,4%) in NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) exprimiert und anschließend die LHBs-Expression induziert. Transfizierte Zellen wiesen danach nur feinverteiltes LHBs auf, das kolokalisiert mit CK18 vorlag. Eine LHBs-Aggregatbildung wurde damit durch CK18 effektiv verhindert. Das CK18 lag allerdings mangels seines Partners CK8 nicht in Filamentform vor, sondern als Protein-Ansammlung innerhalb des Zytoplasmas. Aus der Literatur ist bekannt, dass Zytokeratine zur Filamentbildung ihren natürlichen Bindepartner benötigen (Baribault et al., 1993; Hatzfeld and Franke, 1985).

In einem analogen Experiment wurde das Chaperon BiP in NIH3T3-Zellen (LHBs/HBx) transient exprimiert. Jedoch kam es weder zu einer Prävention noch einer Reduzierung der Anzahl von LHBs-Aggregaten (Letzteres nicht gezeigt). HBV-spezifische Literaturdaten zeigen, dass BiP an der Translokation der präS-Domänen des LHBs in das ER-Lumen beteiligt ist (Awe et al., 2008; Lambert and Prange, 2001; Lambert et al., 2004). BiP gehört zu der Hitzeschockprotein-70 Familie (HSP70) und ist im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ansässig. Es ist an der korrekten Faltung von Proteinen und deren Translokation in und aus dem ER-Lumen mitbeteiligt (Kassenbrock et al., 1988). Dafür bindet BiP an fehlgefaltete Proteine und Proteinaggregate, verhindert ihre Sekretion und sorgt für deren Abbau, in dem es sie zum Proteasom transloziert (Ni and Lee, 2007). BiP ist nur eines von vielen verschiedenen Chaperonen, zu denen auch Proteindisulfidisomerase (PDI), *Glucose-regulated protein 94* (GRP-94), Calreticulin, Calnexin und andere Hitzeschockproteine gehören. Sie sind mit auf

teils unterschiedlicher Art und Weise an der korrekten Proteinfaltung, Prävention und Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt. Im Versuch wurde die humane Sequenz von BiP in murinen NIH3T3-Zellen eingesetzt. Obwohl die humane und murine Proteinsequenz von BiP zu 98,6% identisch und zu 99,2% ähnlich ist, ist eine Funktionsveränderung von humanem BiP in den NIH3T3-Zellen insbesondere vor dem Hintergrund des Zusammenwirkens von verschiedenen Chaperonen und Hilfsproteinen bei der korrekten Proteinfaltung bzw. Aggregatsabbaus nicht gänzlich auszuschließen. Eine Expression der murinen BiP-Sequenz wäre hier aussagekräftiger gewesen, war aber zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. Ein späteres Experiment, bei dem die zelleigene BiP-Expression durch die ER-Stress auslösenden Substanzen Thapsigargin und Tunicamycin in NIH3T3 (LHBs/HBx) stark induziert wurde, führte jedoch auch zu keiner Prävention bzw. Auflösung von LHBs-Aggregaten (Daten für TM und LHBs-Aggregate gezeigt). Interessant wäre, ob eine Überexpression bzw. Herunterregulation der Expression von Calnexin und Hsc70 in Huh7- bzw. NIH3T3-Zellen (beide LHBs/HBx) die LHBs-Verteilung beeinflusst, da eine Interaktion von Calnexin und Hsc70 mit LHBs bekannt ist (Prange et al., 1999; Xu et al., 1997a).

Mittels CK18-Expression konnte die LHBs-Aggregatbildung in NIH3T3-Zellen verhindert werden. Den umgekehrten Weg, nämlich über einen CK18-Knockdown in Huh7-Zellen eine LHBs-Aggregatbildung zu generieren, wurde mittels RNA-Interferenz begangen. Dazu wurde in Huh7-Zellen (LHBs/HBx) eine effektive *short-hairpin* RNA (shRNA) gegen CK18 über Plasmid-Transfektion zur Expression gebracht. Immunfluoreszenzen dieser Zellen zeigten sowohl eine starke Reduzierung der CK18- als auch der CK8-Proteinexpression. Das LHBs lag jedoch in diesen Zellen weiterhin wie bei nicht-transfizierten Zellen im gleichen Ansatz fein verteilt vor. Auch eine Western-Blotting-Analyse konnte in Zelllysaten von Huh7-Zellen (ohne LHBs/HBx), deren CK18 durch shRNA herunterreguliert war, eine etwa gleich starke Reduzierung der CK8-Proteinexpression nachweisen. In mehreren Studien zu CK18 und CK8 wurde beobachtet, dass es bei Herunterregulierung eines der Keratinpartner zu einer Proteinreduzierung des anderen natürlichen Keratinbindungspartners in der Zelle kam, jedoch nicht von anderen Keratinen (Alam et al., 2011; Baribault et al., 1993; Fortier et al., 2013), (persönl. schriftliche Mitteilung von Dr. Fortier). Als Grund wird eine verringerte Proteinstabilität des nicht herunterregulierten Keratinpartners angenommen (Alam et al., 2011). Ein Erklärungsansatz, wieso es durch einen CK18-Knockdown zu keiner LHBs-Aggregatbildung in den Zellen gekommen war, könnte die etwa gleich starke Reduzierung des CK8-Proteins sein. Dadurch blieb das Verhältnis von CK8- zu CK18-Proteinen gleich. Wie

bereits weiter oben diskutiert wurde, ist für die Entstehung von MDB ein größeres CK8 zu CK18-Verhältnis nötig.

## **5.5 Untersuchungen zum Einfluss von Zytokeratinen auf die HBV-Infektion und Sekretion**

### **5.5.1 Einfluss von extrazellulärem Zytokeratin 8 und 18**

Die myristylierte präS1-Domäne des LHBs ist für die HBV-Infektion von Primären Hepatozyten essentiell (Bruss et al., 1996b; Gripon et al., 1995). Da eine Bindung von CK8- und CK18-Protein daran mit einer SPR-Analyse nachgewiesen werden konnte, wurden in einem HBV-Infektionsexperiment bei primären Hepatozyten des südostasiatischen Spitzhörnchens (*Tupaia belangerii*) (PTH) die Effekte von extrazellulär vorliegenden Zytokeratinen auf die Infektion näher untersucht (Kapitel 4.17.1). Diese lassen sich im Blut von Gesunden als auch in höheren Konzentrationen im Blut von Patienten mit Leberschädigungen nachweisen (s.u.). Dafür wurde humanes rekombinantes CK8- und CK18-Protein mit HB-Viren zunächst vorinkubiert. Dies sollte schon vor Infektionsbeginn eine Interaktion von CK-Proteinen mit den Viren ermöglichen. Die eingesetzte niedrigere CK-Konzentration von 1 µg/L wurde anhand von Literaturdaten zu CK18-Serumkonzentrationen festgelegt (Feldstein et al., 2009). Gesunde Probanden ohne Leberschädigung wiesen hier einen Medianwert von 144 U/L (= 8,6 µg/L), Patienten mit Nichtalkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD) von 244 U/L (= 14,6 µg/L) und Patienten mit Nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH) von 335 U/L (= 20,0 µg/L) auf. Die Molekülmasse von CK18 beträgt 48.201 g. 1 U entspricht 1,24 pmol CK18 (Kramer et al., 2004). Die eingesetzte höhere CK-Konzentration von 1 mg/L entsprach somit ca. dem 50 - 100fachen der physiologischen Serumkonzentration beim Gesunden oder Patienten. Selbst mit dieser hohen CK-Konzentration konnte kein inhibitorischer oder fördernder Effekt auf die HBV-Infektion gesehen werden. Dagegen wurde die Infektion komplett durch den präS1-spezifischen Antikörper MA18/07 inhibiert. Dieser ist ein neutralisierender Antikörper der HBV-Infektion bei primären Hepatozyten von Menschen und von *Tupaia belangeri* (Glebe et al., 2003).

Eine Erklärung, warum mit extrazellulär applizierten CK-Proteinen keine Effekte auf die HBV-Infektion gesehen werden konnte, könnte an der sehr schlechten Löslichkeit der CK-Proteine in wässrigen Lösungen liegen, was ihre effektive Interaktionsfähigkeit im Reaktionsansatz stark verringert. Normalerweise liegen CK-Proteine nur in gesättigter



Harnstoff-Lösung (ca. 9,5 M) vollständig gelöst, aber in denaturierter Form vor (Hatzfeld and Franke, 1985). Daraus lassen sich Filamente durch stufenweise Dialyse äquimolarer Mengen von je einem Keratin Typ I und Typ II (z.B. CK8 und CK18), in einem niedrigkonzentrierten Salzpuffer (z.B. PBS) renaturieren (Hatzfeld and Franke, 1985). Hierbei kam es jedoch im eigenen Experiment zu makroskopisch sichtbaren Proteinausfällungen. Daher wurden die entsprechenden Volumina an denaturierten CK-Proteinen, gelöst in 9,5 M Harnstoff-Puffer, direkt in den HBV-Inkubationsansatz (HGM-Medium + HBV) pipettiert und sofort ausgiebig vermischt. Dies entsprach grundsätzlich der gleichen Vorgehensweise wie bei der SPR-Messung, bei der die CK-Proteine in PBS-Puffer direkt eingebracht, gemixt und sofort gemessen wurden. Somit ließ sich zwar im Kombinationsansatz von CK8/18 keine Filamentbildung erwarten, jedoch kam es hier wie auch in den Einzelansätzen zu einer Interaktion der CK-Proteine mit der myristylierten präS1-Domäne des LHBs. Grundsätzlich ist somit davon auszugehen, dass im HBV-Inkubationsansatz potentiell interagierende CK-Proteine vorlagen. Falls deren Interaktionsfähigkeit durch die schlechte Löslichkeit herabgesetzt war, könnte der eingesetzte Überschuss an Viren zu Hepatozyten (ca. 30fach) einen möglichen Effekt nivelliert haben.

Eine weitere mögliche Erklärung für das Ausbleiben von detektierbaren Effekten durch extrazellulär applizierte CK-Proteine könnte an der fehlenden Zugänglichkeit der Interaktionsstellen der präS1-Domäne des LHBs im Virus mit den CK-Proteinen sein. Denkbar ist, dass die präS1-Domäne im Virus eine Konformation annimmt, die den CK-Proteinen eine Bindung daran, im Gegensatz zu der bei der SPR-Messung vorliegenden Konformation, nicht erlaubt. Hier lag die präS1-Domäne über kovalente Peptidbindung zweidimensional und konformationsunabhängig auf der Chip-Matrix gespottet vor. Möglich ist auch eine sterische Hinderung der präS1-Domäne durch andere benachbarte Virusproteine im Virion. Möglicherweise können nur CK-Filamente oder kleinere Keratin-Einheiten wie z.B. Caspase-gespaltene CK18-Fragmente, wie sie vor allem im Serum von Patienten mit Leberschädigungen gefunden werden, an die präS1-Domäne im Virus binden. Dies könnte bei der Annahme, dass dadurch die Infektion unterbunden wird, einen Selbstregulations-Mechanismus von HBV darstellen. Eine zu starke Leberschädigung, die die Gefahr einer zu starken Aktivierung von Abwehrmaßnahmen des Immunsystems mit sich bringt, würde so vermieden. Dies hätte den Vorteil, dass der Wirt und letztlich auch HBV an sich, nicht über alle Maße geschädigt wird. Bekanntermaßen ist HBV nicht unmittelbar zytotoxisch und versucht durch verschiedene Mechanismen, der Erkennung durch das Immunsystem zu

entgehen (s. Einleitung, Kapitel. 1.1.4). Das Hepatitis B Virus wird daher auch als *Stealth Virus* bezeichnet (Wieland and Chisari, 2005).

### 5.5.2 Einfluss von Okadainsäure

Der Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure (OA) zeigte in LHBs-exprimierenden Huh7- und AML-12-Zellen einen Ko-Zusammensturz von CK8/18 und LHBs (Abb. 18 A, Abb. 37 A). Literaturdaten zeigen zudem, dass eine Behandlung von Zellen mit OA konzentrationsabhängig zu einer verstärkten Phosphorylierung von Zytokeratinen (Kasahara et al., 1993; Paramio, 1999; Yatsunami et al., 1993; Yuan et al., 1998) und daraus resultierend zu deren erhöhter Löslichkeit führt (Liao and Omary, 1996; Strnad et al., 2001; Strnad et al., 2002). In der Immunfluoreszenz zeigt sich dies durch eine diffuse Zytokeratin-Färbung im Zytoplasma der Zelle (Strnad et al., 2001). Es wird angenommen, dass es sich hierbei um lösliche Keratin-Einheiten handelt. Bei längerer Einwirkung von OA bzw. höheren Konzentrationen kommt es zur Bildung von zytoplasmatischen Zytokeratin-Granula, einer Reorganisation des KF-Netzwerks und perinukleären Zytokeratin-Aggregaten (Blankson et al., 1995; Kasahara et al., 1993; Strnad et al., 2001; Yatsunami et al., 1993). Da OA zeit- und konzentrationsabhängig zytotoxische Effekte aufweist, wurde zunächst OA bei PTH austitriert (von 10 bis 500 nM). Dabei zeigte sich, dass OA ab 100 nM deutliche zytotoxische Effekte (Zellabrundung, Adhärenzverlust, Verlust der Zellmembranintegrität (Trypanblau-Färbung)) verursachte (Daten nicht gezeigt). Daher wurde OA im HBV-Infektions- und Sekretionsexperiment bei PTH in niedrigeren Konzentrationen (0 bis 50 nM; in 10 nM-Abstufungen) eingesetzt. Bereits mit 10 nM OA konnte eine maximale Steigerung der HBsAg-Konzentration im Zellkultur-Überstand des Infektionsexperiments gesehen werden. Höhere OA-Konzentrationen führten an Tag 4 und 7 der Infektion konzentrationsabhängig zu niedrigeren HBsAg-Steigerungen vs OA-unbehandelten Zellen. Vermutlich sind diese durch weitere Effekte von OA bedingt, über die in der Literatur berichtet werden. U.a. wurde häufig eine verminderte extrazelluläre Sekretion von Proteinen durch OA-Behandlung beobachtet (Lucocq, 1992; Lucocq et al., 1995; Reaven et al., 1993; Sato et al., 1998; Tamaki and Yamashina, 2002; Waschulewski et al., 1996). Auch über eine Induzierung von Apoptose in OA-behandelten Zellen wurde berichtet (Fieber et al., 2012; Hanana et al., 2012; Haneji et al., 2013; Opsahl et al., 2013). In den meisten Fällen wurden hierbei sehr hohe OA-Konzentrationen (> 200 nM) eingesetzt.

Beim Sekretionsexperiment (Kapitel 4.17.3) waren mit den eingesetzten OA-Konzentrationen (0 bis 50 nM) keine signifikanten Unterschiede bei der HBsAg-Sekretion feststellbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die im Infektionsexperiment durch OA-Behandlung detektierten HBsAg-Steigerungen durch eine Steigerung der Infektion, aber nicht durch eine verstärkte Sekretion oder Replikation bedingt sind.

Da der Phosphatasen-Inhibitor OA indirekt zu einer verstärkten Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten von Zytokeratinen, aber auch von einer unbekannt Anzahl zahlreicher anderer intrazellulärer Proteine wie z.B. Intermediärfilamenten (IF) und IF-assoziierten Proteinen (IFAP) führt (Haystead et al., 1989; Reaven et al., 1993), lässt sich die Infektionssteigerung nicht ohne weiteres einer spezifischen Wirkung von OA auf Zytokeratine zuschreiben. Auch eine Induzierung von verschiedenen Kinase-Aktivitäten ist durch OA-Behandlung bekannt (Details s. Einleitung, Kap. 1.2.5).

Beschrieben ist u.a. die Translokation der Protein Kinase C (PKC) vom Zytosol zur Plasmamembran durch OA-Behandlung, was eine wichtige Voraussetzung zur Aktivierung von PKC durch extrazelluläre Stimuli darstellt (Gopalakrishna et al., 1992). Dass PKC an der CK-Phosphorylierung beteiligt ist, zeigt eine andere Studie (Kasahara et al., 1993). Hier konnte Staurosporin, ein Inhibitor von PKC, den durch OA verursachten Zusammensturz von Zytokeratinen verhindern. Die PKC-Familie, die mehr als zwölf Isoformen im Menschen umfasst, besitzt eine zentrale Rolle bei der zellulären Signalweiterleitung, indem sie Phosphatgruppen auf Serin- und Threonin-Reste von Enzymen und anderen Signalmolekülen überträgt (Lipp and Reither, 2011). PKC selbst besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen und ihre intrazelluläre Lokalisierung (Plasma- und subzelluläre Membranen) und Aktivität wird u.a. über ihren Phosphorylierungsstatus reguliert (Newton, 1997; Parekh et al., 2000). PKC ist beteiligt an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie z.B. Zellproliferation, -überleben, Apoptose, Zelladhäsion und -migration (Griner and Kazanietz, 2007).

Interessanterweise führte die Aktivierung von PKC in einer Reihe von Studien zu einer erhöhten Infektion bzw. Replikation bei diversen Viren (Filone et al., 2010; San-Juan-Vergara et al., 2004; Slobbe-van Drunen et al., 1997; Turkki et al., 2013). Umgekehrt bewirkte eine spezifische PKC-Inaktivierung eine Inhibierung der Virus-Infektion bzw. -replikation (Contreras et al., 2012; Hoffmann et al., 2008; Kucic et al., 2005). So konnte z.B. bei Influenza-Viren der Viruseintritt in die Zelle und somit die Infektion durch hochspezifische PKC-Inhibitoren inhibiert werden (Root et al., 2000; Sieczkarski et al., 2003). Das Influenza-Virus gelangt wie HBV durch Endozytose in die Wirtszelle, im Gegensatz zu z.B. Herpes- und vielen Retroviren, die durch Fusion mit der Plasmamembran in die Wirtszelle gelangen

(Marsh and Helenius, 1989). In zwei Studien zu HCV und HBV konnte durch PKC-Inhibitoren zwar eine deutliche Reduzierung der Replikation, aber nur eine leichte Abschwächung der Infektion gesehen werden (Murakami et al., 2009; von et al., 2011).

Bekannt ist, dass verschiedene PKC-Isoformen mit den Zytokeratinen 8 und 18 interagieren, diese phosphorylieren und zu einer Reorganisation des Keratin-Netzwerks führen können (Omary et al., 1992; Ridge et al., 2005; Sivaramakrishnan et al., 2009; Sun et al., 2013b; Yano et al., 1991). Unter der Annahme, dass die HBV-Rezeptorbindung an die Wirtszelle und der nachfolgende Viruseintritt zu einer PKC-Aktivierung führen, könnte über die Phosphorylierung von Zytokeratinen deren intrazelluläre Löslichkeit erhöht werden. Die Folge wäre eine grössere Anzahl von kleinen und löslichen Keratin-Einheiten, die im intrazellulären Keratinzyklus quasi ein Transportmittel für HBV darstellen könnten, falls diese z.B. in der Lage sind an LHBs im Virion zu binden. Eine PKC $\alpha$ -induzierende Wirkung durch Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung wurde erst kürzlich für das Protein pUL37x1 des humanen Zytomegalovirus gezeigt (Sharon-Friling and Shenk, 2014).

Vorstellbar ist auch, dass durch eine PKC-Aktivierung die kortikale Aktin-Barriere destabilisiert wird. Literaturdaten zeigen, dass PKC auch an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist und seine Aktivierung zur Destabilisierung des kortikalen Aktins führte (Larsson, 2006; Yang et al., 2013). Da Zytokeratine über IFAP teilweise mit Aktinfilamenten verknüpft sind (Coulombe and Omary, 2002; Jefferson et al., 2004), ist zusätzlich zur o.g. direkten Wirkung von PKC auch eine indirekte Veränderung der kortikalen Zytokeratin-Organisation zu erwarten. Insbesondere das Aktin-Zytoskelett und assoziierte Proteine spielen allgemein eine wichtige Rolle bei der Endozytose (Girao et al., 2008; McPherson, 2002; Qualmann and Kessels, 2002; Schafer, 2002). Bei HBV wird wie bei HCV eine Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle nach Rezeptor-Bindung angenommen (Blanchard et al., 2006; Cooper and Shaul, 2006; Huang et al., 2012). Eine lokale Veränderung des kortikalen Zytoskeletts könnte die Aufnahme der HBV-enthaltenen Endosomen in die Zelle erleichtern. Anschließend findet über Mikrotubuli der weitere gerichtete Transport der frühen Endosomen statt (Soldati and Schliwa, 2006).

Auch andere Kinasen sind in der Literatur hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Infektion und Replikation bei verschiedenen Viren beschrieben. So wurde z.B. bei Influenza-Viren ein verminderter Viruseintritt und Replikation durch Inhibierung der Akt-Kinase-Aktivität beobachtet (Hirata et al., 2014). Von Bedeutung, speziell für den Endozytose-abhängigen Viruseintritt von Influenza-Viren, sind Rho-Kinase, Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-kinase (PIP5K) and Phospholipase C (PLC) (Fujioka et al., 2013). Bei HCV sind die Aktivierung von

Protein Kinase A (PKA), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und MAPK interagierende Serin/Threonin-Kinase 1 (MKNK1) als wichtig für den Viruseintritt beschrieben (Zhu et al., 2014). Zusätzlich scheint u.a. Phosphatidylinositol 4-Kinase Typ III (PI4KIII) und Rho-Kinase eine Bedeutung bei der Membran- und Aktin-Remodellierung sowie dem Virus-Transport während des HCV-Eintritts zuzukommen (Berger et al., 2009; Brazzoli et al., 2008; Trotard et al., 2009). Es ist wahrscheinlich, dass der Phosphatase-Inhibitor OA die Phosphorylierung und Aktivität von verschiedenen Kinasen verstärkt, was wiederum die Aktivierung von Signaltransduktionswegen (z.B. PI3K-Akt, Ras/MEK/ERK) zur Folge hat. Zuvor genannte sind bereits als fördernd auf die HCV-Infektion beschrieben (Kim et al., 2013; Liu et al., 2012).

Die Infektionssteigerung durch OA-Behandlung könnte auch durch eine verstärkte Phosphorylierung der HBV-Nukleokapsid-Partikel bedingt sein. Deren Phosphorylierung ist für ihre Bindung an den Kernporen-Komplex und weiteren Transport des viralen Genoms in den Zellkern notwendig (Kann et al., 1999). Natürlicherweise erfolgt eine Phosphorylierung der Nukleokapsid-Partikel durch die wirtseigene PKC (Kann et al., 1999). Dies ist wichtig für die Verpackung der pgRNA von HBV in die Viruspartikel (Gazina et al., 2000; Melegari et al., 2005). Die PKC wird dabei in die Virionen mitverpackt und ist somit ein Bestandteil infektiöser Viruspartikel (Kann et al., 1999). Inwieweit PKC eine Rolle bei einer *de novo* HBV-Infektion spielt, ist bis dato nicht bekannt.

Im Sekretionsexperiment wurde eine dreitägige Behandlung mit verschiedenen OA-Konzentrationen bei PTH durchgeführt. Es konnte keine Steigerung des sekretierten HBsAg gesehen werden. Dies spricht gegen die These, dass es durch verstärkte Phosphorylierung von HBV-Nukleokapsiden zu der Infektionssteigerung im Infektionsexperiment gekommen sein könnte. Der Grund ist, dass HBV durch einen intrazellulären Selbstinfektionszyklus (sog. nukleärer HBV-Reimport) die Zahl seiner cccDNA im Zellkern erhöht. Durch eine verstärkte Phosphorylierung (OA-Behandlung) wäre eine Erhöhung der intrazellulären Selbstinfektion zu erwarten, was sich in einer gesteigerten HBsAg- und HBeAg-Sekretion auch im Sekretionsexperiment widerspiegeln müsste. Beide Parameter waren jedoch im Gegensatz zum Infektionsexperiment durch OA-Behandlung nicht erhöht (HBeAg-Werte nicht gezeigt). Nicht ausgeschlossen ist aber, dass die dreitägige OA-Inkubationsdauer zu kurz bzw. Tag 7 der Infektion zu früh ist, um hier entsprechende Steigerungen sehen zu können.

## 5.6 Limitationen der Arbeit

Das zentrale Ergebnis dieser Arbeit ist die Entdeckung einer bisher noch nicht bekannten Interaktion zwischen LHBs und CK8/18. Diese wurde in LHBs/HBx-transgenen Huh7- und AML-12-Zelllinien nachgewiesen. Diese Zellen enthielten nur einen Teil des HBV-Genoms. Gesteuert wurde die Expression über einen CMV-Promotor, während die natürliche Expression des LHBs über den präS1-Promotor erfolgt. Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, kam es in allen drei Zelllinien mit dem LHBs/HBx-Konstrukt zwar zu einer sehr starken LHBs-Expression, aber zu einer Beeinträchtigung der SHBs- und MHBs-Expression. Eine Verifizierung der LHBs/CK8/18-Interaktion in primären humanen Hepatozyten bzw. in Leberschnitten von HBV-Infizierten anderer Genotypen würde ihre Aussagekraft verstärken. Dies gilt noch mehr für die nachgewiesene HBV-Infektionssteigerung bei PTH durch OA-Behandlung, da diese über die Phosphatasen-Inhibierung nicht nur zu einer erhöhten Phosphorylierung von Zytokeratinen, sondern auch einer unbekannt Anzahl anderer Proteine in der Zelle führt. Eine spezifische Herunterregulierung von CK8/18 durch RNA-Interferenz in z.B. NTCP-transgenen Huh7- und/oder HepG2-Zellen, könnte hier einen spezifischen Effekt von CK8/18 auf die Infektion zeigen.

Bei der Untersuchung zum Einfluss von extrazellulär applizierten CK8/18 auf die HBV-Infektion bei PTH ist die Aussagekraft wegen der schlechten Löslichkeit der eingesetzten Zytokeratine limitiert. Einen Einsatz von löslichen CK18-Fragmenten bzw. CK18-Keratinfilament-Vorläuferpeptiden würde der natürlichen Situation *in vivo* entsprechen, bei der diese im Blut nachweislich zirkulieren.

## 5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal eine direkte Interaktion der Zytokeratine 8 und 18 mit dem großen Oberflächenprotein des Hepatitis B Virus. Eine sehr schwache bzw. schwache Kolo-kalisation und Interaktion war mit Mikrotubuli bzw. Mikrofilamenten feststellbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Letztere indirekt über die teilweise Verknüpfung von Mikrofilamenten mit Zytokeratinen bedingt ist. Die intrazelluläre Verteilung von LHBs könnte abhängig vom CK18 zu CK8-Proteinverhältnis in der Zelle sein. Huh7-Zellen wiesen ein grösseres CK18 zu CK8-Verhältnis als AML-12-Zellen auf bei gleichzeitiger LHBs-Feinverteilung. AML-12-Zellen zeigten LHBs-Aggregate und

feinverteiltes LHBs. Da zudem eine CK18-Expression zu einer Feinverteilung von LHBs in NIH3T3 führte, aber eine Proteinreduzierung von CK18 und CK8 im gleichen Verhältnis nicht eine LHBs-Aggregatbildung in Huh7-Zellen bewirkte, ist es vorstellbar, dass das CK18-Protein die Feinverteilung und das CK8-Protein die Aggregatbildung von LHBs fördert. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien zu CK8 und CK18 zeigen gleiche Effekte bei anderen Proteinaggregaten (sog. Mallory-Denk-Körperchen) und stützen unsere These. Eine Überexpression von CK8 in Huh7-Zellen müsste vor diesem Hintergrund zu einer Bildung von LHBs-Aggregaten führen. Dies wäre mit einer transienten Transfektion eines CK8-exprimierenden Plasmids in Folgearbeiten zu überprüfen.

Welche genaue Funktion die Zytokeratine 8 und 18 im HBV-Lebenszyklus einnehmen, konnte bis dato nicht eindeutig geklärt werden. Zwar führte eine OA-Behandlung bei der HBV-Infektion von primären Hepatozyten aus Tupaia (PTH) zu einer Verdoppelung der Infektionsrate, jedoch wirkt OA als Phosphatase-Inhibitor zu unspezifisch. Eine verstärkte Phosphorylierung von Zytokeratinen erhöht ihre Löslichkeit und die Anzahl von kleineren Keratineinheiten im Zytoplasma. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass diese Einheiten ständig und dynamisch durch den intrazellulären Keratinzyklus vom Zellkern zur Plasmamembran und wieder zurück durch die Zelle transportiert werden. Dies, verbunden mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktion von CK8/18 mit LHBs könnte eine Transportfunktion für das Hepatitis B Virus und / oder seine Oberflächenproteine in der Zelle darstellen. Interessant wäre, ob CK8/18 auch mit SHBs und MHBs interagiert. Hierfür wäre die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie aufgrund ihrer sehr hohen Spezifität bestens geeignet.

Inwieweit CK8 und CK18 eine Rolle bei der HBV-Infektion spielen, soll spezifisch über eine Herunterregulierung von CK18 mittels RNA-Interferenz in NTCP-exprimierenden Huh7- bzw. HepG2-Zellen ermittelt werden. Diese Experimente sind derzeit noch in Vorbereitung.

Auch der extrazelluläre Einsatz von kleineren und löslichen CK8 und CK18-Einheiten erscheint vielversprechend, da diese nachweislich im menschlichen Blut zirkulieren.

Sollte sich bei diesen Untersuchungen ein deutlicher Einfluss auf die HBV-Infektion zeigen, könnte dies bedeutsam für innovative therapeutische Optionen in der HBV-Therapie sein.

## 6 Zusammenfassung

Eine chronische Hepatitis B (CHB) Virusinfektion (HBV) kann zu Leberfibrose und –zirrhose, bis hin zu einem hepatozellulärem Karzinom führen. Die Pathogenese beruht hauptsächlich auf den Folgen der adaptiven, zellulären Immunantwort des Wirtes gegen infizierte Hepatozyten. Jedoch tragen auch direkte zytotoxische Effekte von viralen Komponenten, wie z.B. die Akkumulierung und Aggregatbildung der Hepatitis B-Oberflächenproteine (HBs) im Endoplasmatischen Retikulum (ER), hierzu bei. Hepatozyten exprimieren große Mengen an Zytokeratin 8 und 18 (CK8/18), die zytoprotektive und anti-apoptotische Eigenschaften aufweisen. Bei einer CHB finden sich gehäuft Hyperphosphorylierungen und Mutationen von CK8/18, die mit einem schwereren Krankheitsverlauf korrelieren. Zudem sind eine Reihe von Zytokeratin-Pathogen-Interaktionen, wie auch bei Hepatitis-Viren bekannt, die einen direkten Einfluss von CK auf die Infektion, Replikation oder Freisetzung der Pathogene aus den Wirtszellen zeigen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zunächst die Fragestellung, ob Zytoskelett-Komponenten wie CK, Mikrofilamente (MF) und Mikrotubuli (MT) an der intrazellulären Verteilung des großen HBs-Proteins (LHBs) beteiligt sind. Dazu wurde ein für HBs-Proteine transgenes *in-vitro* Zellkulturmodell geschaffen, das eine separate Analyse dieser Proteine in den Hepatozyten-Zelllinien Huh7 und AML-12 sowie der Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 ermöglicht.

Durch Immunfluoreszenz-Färbungen wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung und Verteilung der HBs-Proteine untersucht. Ein Einfluss o.a. Zytoskelett-Komponenten auf die LHBs-Verteilung wurde mit selektiv auf diese Komponenten depolymerisierend-wirkenden Substanzen wie Okadainsäure (OA), Cytochalasin D und Nocodazol getestet. Zudem wurden Analysen zur Kolokalisation von LHBs mit CK, MF und MT mittels *Proximity Ligation Assay* und Konfokal-Mikroskopie vorgenommen. Eine Interaktion von LHBs mit CK8/18 wurde mit Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie bestätigt.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis einer bisher unbekanntenen Kolokalisation und Interaktion von LHBs mit CK8 und CK18. Dagegen waren MF und MT kaum mit LHBs kolokalisiert. Zudem könnte möglicherweise die intrazelluläre LHBs-Verteilung in den getesteten Zelllinien, wie bei Mallory-Denk-Körperchen, die hauptsächlich hyperphosphorylierte CK-Aggregate darstellen, vom CK18 zu CK8-Verhältnis abhängig sein.



CK18 fördert demnach die Verteilung von LHBs, während CK8 die Aggregatbildung unterstützt.

Da LHBs mit der präS1-Domäne von LHBs interagiert, wurde auch der Fragestellung nachgegangen, ob CK8 und CK18 einen Einfluss auf die HBV-Infektion und Sekretion von Hepatitis B Oberflächenprotein-Antigen (HBsAg) haben. Dazu wurde das in der HBV-Forschung etablierte HBV-Infektionssystem mit aus südostasiatischen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) isolierten primären Hepatozyten (PTH), eingesetzt.

CK8/18-Proteine liegen nicht nur intrazellulär in Hepatozyten vor, sondern lassen sich auch im menschlichen Blut nachweisen. Erhöhte Konzentrationen finden sich insbesondere in Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, die zu Leberschädigungen führen. Deshalb wurden zunächst mögliche Effekte von extrazellulär applizierten CK8/18-Proteinen untersucht. Jedoch konnte hierbei kein Einfluss auf die HBsAg-Sekretion und somit Infektion nachgewiesen werden.

Ein möglicher Einfluss von intrazellulären CK auf die Infektion und HBsAg-Sekretion wurde durch Inkubation der PTH mit dem Phosphatase-Inhibitor OA analysiert, der u.a. zur Depolymerisierung von CK führt. Hierbei kam es bei OA-Behandlung von PTH während der HBV-Infektion zu einer Verdopplung der HBV-Infektionsrate. Eine Verifizierung dieser Ergebnisse, z.B. über eine spezifische Herunterregulierung von CK18 bzw. CK8 in HBV-infizierbaren Hepatozyten-Zelllinien, ist aufgrund der unspezifischen Wirkung von OA erforderlich.

Die Zytokeratine 8 und 18 sind verantwortlich für die intrazelluläre Verteilung von LHBs und könnten einen Einfluss auf die HBV-Infektiosität haben. Diese neuen Erkenntnisse könnten bedeutsam für innovative therapeutische Optionen in der HBV-Therapie sein.

## 7 Summary

Chronic hepatitis B (CHB) virus infections (HBV) can lead to fibrosis and cirrhosis of the human liver and even to development of hepatocellular carcinoma. The pathogenesis is mainly due to the responses of the host's adaptive cellular immune system against infected hepatocytes. However, also direct cytotoxic effects of viral components, such as the accumulation and aggregation of hepatitis B surface proteins (HBs) in the endoplasmic reticulum (ER) contribute to liver injury. Hepatocytes express large amounts of cytokeratins (CKs) 8 and 18 (CK8 / CK18), which are known to have cytoprotective and anti-apoptotic functions. In patients with CHB, hyperphosphorylated and / or mutated forms of CK8 and CK18 are often found, that correlate with a more severe disease course. In addition, a number of cytokeratin-pathogen interactions as with hepatitis viruses are known to show direct effects of CKs to the infection, replication and release of pathogens from the host cells.

The present study first examined the question whether cytoskeletal components such as CKs, microfilaments (MF) and microtubule (MT) are involved on the intracellular distribution of the large HBs protein (LHBs). For this purpose, an *in vitro* cell culture model, transgenic for HBs proteins was generated. This allowed the separate analyses of these proteins in the hepatocyte cell lines Huh7 and AML-12 as well as the fibroblast cell line NIH3T3. The subcellular localization and distribution of HBs proteins was examined by immunofluorescence. The effects of the aforementioned cytoskeletal components on the LHBs distribution were further analyzed by depolymerizing them with okadaic acid (OA), cytochalasin D and nocodazole. Moreover, co-localization analyses of LHBs with CKs, MF and MT by proximity ligation assay and confocal microscopy were performed. An interaction of LHBs with CK8/18 was examined by surface plasmon resonance spectroscopy. An important result of this work is the detection of a previously unknown co-localization and interaction of LHBs with CK8 and CK18. In contrast, MF and MT were hardly colocalized with LHBs.

In addition, the intracellular LHBs distribution in the cell lines tested, could be dependent on the CK18 to CK8 ratio, as seen with Mallory-Denk-bodies, which are mainly composed of hyperphosphorylated CK aggregates. Thus CK18 promotes the distribution of LHBs, whereas CK8 the formation of LHBs aggregates.

Since LHBs interacted with the preS1 domain of LHBs, the question raised whether CK8 and CK18 have an effect on HBV infection and secretion of hepatitis B surface protein antigen

(HBsAg). For this purpose, the established HBV infection system with primary hepatocytes from Southeast Asian tree shrews (*Tupaia belangeri*) (PTH) were used.

CKs are not only found intracellularly in hepatocytes, but also extracellularly in the human blood. This is particularly the case in patients suffering from various liver diseases, which lead to liver injury. Therefore the effects of extracellularly applied CK8/18 proteins were analyzed. However, no influence on HBsAg secretion and thus infection was detected. A possible influence of intracellular CKs on the infection and HBsAg secretion was analyzed by incubation of PTH with the phosphatase inhibitor OA, which leads to the depolymerization of CKs. A treatment of PTH with OA during the HBV infection resulted in a doubling of the HBV infection rate. However, because of non-specific effects of OA, a verification of these results is necessary. This could be achieved by a specific downregulation of CK8 and CK18 in HBV infectable hepatocyte cell lines, e.g. by means of RNA interference.

CK8 and 18 are responsible for intracellular distribution of LHBS and could have an impact on HBV infectivity. These new findings might be relevant for novel therapeutic options in HBV therapy.

## 8 Literaturverzeichnis

(2003). EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J. Hepatol.* *38*, 533-540.

Akhshi,T.K., Wernike,D., and Piekny,A. (2014). Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division. *Cytoskeleton (Hoboken. )* *71*, 1-23.

Alam,H., Kundu,S.T., Dalal,S.N., and Vaidya,M.M. (2011). Loss of keratins 8 and 18 leads to alterations in alpha6beta4-integrin-mediated signalling and decreased neoplastic progression in an oral-tumour-derived cell line. *J. Cell Sci.* *124*, 2096-2106.

Amann,K.J. and Pollard,T.D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 15009-15013.

Ameen,N.A., Figueroa,Y., and Salas,P.J. (2001). Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *J. Cell Sci.* *114*, 563-575.

Amos,L.A. (2011). What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 916-926.

Andrisani,O.M. (2013). Deregulation of epigenetic mechanisms by the hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis. *Viruses.* *5*, 858-872.

Aravalli,R.N., Cressman,E.N., and Steer,C.J. (2013). Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch. Toxicol.* *87*, 227-247.

Asabe,S., Wieland,S.F., Chattopadhyay,P.K., Roederer,M., Engle,R.E., Purcell,R.H., and Chisari,F.V. (2009). The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. *J. Virol.* *83*, 9652-9662.

Awe,K., Lambert,C., and Prange,R. (2008). Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett.* *582*, 3179-3184.

Baribault,H., Price,J., Miyai,K., and Oshima,R.G. (1993). Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes Dev.* *7*, 1191-1202.

Bartenschlager,R., Junker-Niepmann,M., and Schaller,H. (1990). The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* *64*, 5324-5332.

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.

Beck,J. and Nassal,M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* *13*, 48-64.

Becker,S.A., Lee,T.H., Butel,J.S., and Slagle,B.L. (1998). Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J. Virol.* *72*, 266-272.

Benhenda,S., Cougot,D., Buendia,M.A., and Neuveut,C. (2009). Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Adv. Cancer Res.* *103*, 75-109.

- Berger, K.L., Cooper, J.D., Heaton, N.S., Yoon, R., Oakland, T.E., Jordan, T.X., Mateu, G., Grakoui, A., and Randall, G. (2009). Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 7577-7582.
- Berting, A., Hahnen, J., Kroger, M., and Gerlich, W.H. (1995). Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein. *Intervirology* *38*, 8-15.
- Bertolino, P., McCaughan, G.W., and Bowen, D.G. (2002). Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol. Cell Biol.* *80*, 84-92.
- Bhat, K.M. and Setaluri, V. (2007). Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2849-2854.
- Bialojan, C. and Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* *256*, 283-290.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* *80*, 6964-6972.
- Blanchet, M. and Sureau, C. (2007). Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J. Virol.* *81*, 5841-5849.
- Blankson, H., Holen, I., and Seglen, P.O. (1995). Disruption of the cyokeratin cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Exp. Cell Res.* *218*, 522-530.
- 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.
- Bola, B. and Allan, V. (2009). How and why does the endoplasmic reticulum move? *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 961-965.
- Bordeleau, F., Galarneau, L., Gilbert, S., Loranger, A., and Marceau, N. (2010). Keratin 8/18 modulation of protein kinase C-mediated integrin-dependent adhesion and migration of liver epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1698-1713.
- Bouchard, M.J. and Navas-Martin, S. (2011). Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. *Cancer Lett.* *305*, 123-143.
- Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., and Crotta, S. (2008). CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J. Virol.* *82*, 8316-8329.
- Bruss, V. (1997). A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J. Virol.* *71*, 9350-9357.
- Bruss, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* *13*, 65-73.
- Bruss, V. and Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 1059-1063.
- Bruss, V., Gerhardt, E., Vieluf, K., and Wunderlich, G. (1996a). Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* *39*, 23-31.
- Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E., and Galle, P.R. (1996b). Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* *218*, 396-399.

- Bruss,V. and Vieluf,K. (1995). Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J. Virol.* *69*, 6652-6657.
- 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.
- Candi,E., Tarcsa,E., Digiovanna,J.J., Compton,J.G., Elias,P.M., Marekov,L.N., and Steinert,P.M. (1998). A highly conserved lysine residue on the head domain of type II keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 2067-2072.
- Caselmann,W.H., Meyer,M., Kekule,A.S., Lauer,U., Hofschneider,P.H., and Koshy,R. (1990). A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 2970-2974.
- Caulin,C., Ware,C.F., Magin,T.M., and Oshima,R.G. (2000). Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* *149*, 17-22.
- Chang,L. and Goldman,R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 601-613.
- Chen,K.D., Lai,M.T., Cho,J.H., Chen,L.Y., and Lai,Y.K. (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and mitochondrial Ca(2+)-mediated oxidative stress are essential for the enhanced expression of grp78 induced by the protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A. *J. Cell Biochem.* *76*, 585-595.
- Chen,L. (2011). Okadaic acid induces apoptosis through the PKR, NF-kappaB and caspase pathway in human osteoblastic osteosarcoma MG63 cells. *Toxicol. In Vitro* *25*, 1796-1802.
- Chen,P.H., Ornelles,D.A., and Shenk,T. (1993). The adenovirus L3 23-kilodalton proteinase cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. *J. Virol.* *67*, 3507-3514.
- Cheng,K.C., Smith,G.L., and Moss,B. (1986). Hepatitis B virus large surface protein is not secreted but is immunogenic when selectively expressed by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* *60*, 337-344.
- Cheng,T.J. and Lai,Y.K. (1998). Identification of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2 as a vimentin kinase activated by okadaic acid in 9L rat brain tumor cells. *J. Cell Biochem.* *71*, 169-181.
- Cheng,T.J., Lin,Y.L., Chiang,A.S., and Lai,Y.K. (2000). Association of protein phosphatase 2A with its substrate vimentin intermediate filaments in 9L rat brain tumor cells. *J. Cell Biochem.* *79*, 126-138.
- Chirillo,P., Pagano,S., Natoli,G., Puri,P.L., Burgio,V.L., Balsano,C., and Levrero,M. (1997). The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 8162-8167.
- Chisari,F.V. and Ferrari,C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* *13*, 29-60.
- Chisari,F.V., Filippi,P., Buras,J., McLachlan,A., Popper,H., Pinkert,C.A., Palmiter,R.D., and Brinster,R.L. (1987). Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 6909-6913.

- Chisari, F.V., Filippi, P., McLachlan, A., Milich, D.R., Riggs, M., Lee, S., Palmiter, R.D., Pinkert, C.A., and Brinster, R.L. (1986). Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J. Virol.* *60*, 880-887.
- Chisari, F.V., Isogawa, M., and Wieland, S.F. (2010). Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol. Biol. (Paris)* *58*, 258-266.
- Chisari, F.V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquini, C., Dunsford, H.A., Sell, S., Pinkert, C.A., Brinster, R.L., and Palmiter, R.D. (1989). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* *59*, 1145-1156.
- Cho, H.K., Cheong, K.J., Kim, H.Y., and Cheong, J. (2011). Endoplasmic reticulum stress induced by hepatitis B virus X protein enhances cyclo-oxygenase 2 expression via activating transcription factor 4. *Biochem. J.* *435*, 431-439.
- Chou, C.F. and Omary, M.B. (1993). Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *J. Biol. Chem.* *268*, 4465-4472.
- Chou, Y.H., Flitney, F.W., Chang, L., Mendez, M., Grin, B., and Goldman, R.D. (2007). The motility and dynamic properties of intermediate filaments and their constituent proteins. *Exp. Cell Res.* *313*, 2236-2243.
- Chung, T.W., Lee, Y.C., and Kim, C.H. (2004). Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J.* *18*, 1123-1125.
- Churin, Y., Roderfeld, M., Stiefel, J., Wurger, T., Schroder, D., Matono, T., Mollenkopf, H.J., Montalbano, R., Pompaiah, M., Reifenberg, K., Zahner, D., Ocker, M., Gerlich, W., Glebe, D., and Roeb, E. (2014). Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background. *PLoS. One.* *9*, e90608.
- Clayton, R.F., Owsianka, A., and Patel, A.H. (2001). Evidence for structural differences in the S domain of L in comparison with S protein of hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* *82*, 1533-1541.
- Cohen, P., Klumpp, S., and Schelling, D.L. (1989). An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett.* *250*, 596-600.
- Colakoglu, G. and Brown, A. (2009). Intermediate filaments exchange subunits along their length and elongate by end-to-end annealing. *J. Cell Biol.* *185*, 769-777.
- Contreras, X., Mzoughi, O., Gaston, F., Peterlin, M.B., and Bahraoui, E. (2012). Protein kinase C-delta regulates HIV-1 replication at an early post-entry step in macrophages. *Retrovirology.* *9*, 37.
- Cooper, A. and Shaul, Y. (2006). Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. *J. Biol. Chem.* *281*, 16563-16569.
- Coulombe, P.A. and Omary, M.B. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 110-122.
- Crispe, I.N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 51-62.
- da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA, Zaia, C.T., and Greengard, P. (1995). Inhibition of protein phosphatase 1 stimulates secretion of Alzheimer amyloid precursor protein. *Mol. Med.* *1*, 535-541.
- Dale, B.A., Resing, K.A., and Lonsdale-Eccles, J.D. (1985). Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *455*, 330-342.

- 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.
- Davidson,H.W., McGowan,C.H., and Balch,W.E. (1992). Evidence for the regulation of exocytic transport by protein phosphorylation. *J. Cell Biol.* *116*, 1343-1355.
- de,F.H., Bouissou,A., and Perez,F. (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 266-274.
- Deery,W.J. (1993). Role of phosphorylation in keratin and vimentin filament integrity in cultured thyroid epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* *26*, 325-339.
- Dehmelt,L. and Halpain,S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* *6*, 204.
- Depianto,D., Kerns,M.L., Dlugosz,A.A., and Coulombe,P.A. (2010). Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin. *Nat. Genet.* *42*, 910-914.
- Diao,J., Khine,A.A., Sarangi,F., Hsu,E., Iorio,C., Tibbles,L.A., Woodgett,J.R., Penninger,J., and Richardson,C.D. (2001). X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 8328-8340.
- Domachowske,J.B., Bonville,C.A., and Rosenberg,H.F. (2000). Cytokeratin 17 is expressed in cells infected with respiratory syncytial virus via NF-kappaB activation and is associated with the formation of cytopathic syncytia. *J. Infect. Dis.* *182*, 1022-1028.
- Dong,F., Su,H., Huang,Y., Zhong,Y., and Zhong,G. (2004). Cleavage of host keratin 8 by a Chlamydia-secreted protease. *Infect. Immun.* *72*, 3863-3868.
- dos Remedios,C.G., Chhabra,D., Kekic,M., Dedova,I.V., Tsubakihara,M., Berry,D.A., and Nosworthy,N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* *83*, 433-473.
- Drake,P.J., Griffiths,G.J., Shaw,L., Benson,R.P., and Corfe,B.M. (2009). Application of high-content analysis to the study of post-translational modifications of the cytoskeleton. *J. Proteome. Res.* *8*, 28-34.
- Drexler,J.F., Geipel,A., Konig,A., Corman,V.M., van,R.D., Leijten,L.M., Bremer,C.M., Rasche,A., Cottontail,V.M., Maganga,G.D., Schlegel,M., Muller,M.A., Adam,A., Klose,S.M., Carneiro,A.J., Stocker,A., Franke,C.R., Gloza-Rausch,F., Geyer,J., Annan,A., du-Sarkodie,Y., Oppong,S., Binger,T., Vallo,P., Tschapka,M., Ulrich,R.G., Gerlich,W.H., Leroy,E., Kuiken,T., Glebe,D., and Drosten,C. (2013). Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *110*, 16151-16156.
- Dryden,K.A., Wieland,S.F., Whitten-Bauer,C., Gerin,J.L., Chisari,F.V., and Yeager,M. (2006). Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol. Cell* *22*, 843-850.
- Dubois,M.F., Pourcel,C., Rousset,S., Chany,C., and Tiollais,P. (1980). Excretion of hepatitis B surface antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *77*, 4549-4553.
- Duygu,F., Karsen,H., Aksoy,N., and Taskin,A. (2012). Relationship of oxidative stress in hepatitis B infection activity with HBV DNA and fibrosis. *Ann. Lab Med.* *32*, 113-118.
- Dyson,M.R. and Murray,K. (1995). Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: association of the core and surface antigens of hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 2194-2198.



- Eble, B.E., MacRae, D.R., Lingappa, V.R., and Ganem, D. (1987). Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol. Cell Biol.* *7*, 3591-3601.
- El-Serag, H.B. and Rudolph, K.L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* *132*, 2557-2576.
- Eriksson, J.E., Brautigan, D.L., Vallee, R., Olmsted, J., Fujiki, H., and Goldman, R.D. (1992). Cytoskeletal integrity in interphase cells requires protein phosphatase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 11093-11097.
- Eriksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H.M., and Goldman, R.D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J. Clin. Invest* *119*, 1763-1771.
- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *29*, 471-499.
- Evans, L.L. and Bridgman, P.C. (1995). Particles move along actin filament bundles in nerve growth cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 10954-10958.
- Fan, W., Shi, B., Wei, H., Du, G., and Song, S. (2011). Comparison of hepatitis B X gene mutation between patients with hepatocellular carcinoma and patients with chronic hepatitis B. *Virus Genes* *42*, 162-170.
- Fang, Z.L., Sabin, C.A., Dong, B.Q., Ge, L.Y., Wei, S.C., Chen, Q.Y., Fang, K.X., Yang, J.Y., Wang, X.Y., and Harrison, T.J. (2008a). HBV A1762T, G1764A mutations are a valuable biomarker for identifying a subset of male HBsAg carriers at extremely high risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 2254-2262.
- Fang, Z.L., Sabin, C.A., Dong, B.Q., Wei, S.C., Chen, Q.Y., Fang, K.X., Yang, J.Y., Huang, J., Wang, X.Y., and Harrison, T.J. (2008b). Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study. *J. Gen. Virol.* *89*, 2882-2890.
- Fattovich, G. (2003). Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin. Liver Dis.* *23*, 47-58.
- Feldstein, A.E., Wieckowska, A., Lopez, A.R., Liu, Y.C., Zein, N.N., and McCullough, A.J. (2009). Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* *50*, 1072-1078.
- Ferber, M.J., Montoya, D.P., Yu, C., Aderca, I., McGee, A., Thorland, E.C., Nagorney, D.M., Gostout, B.S., Burgart, L.J., Boix, L., Bruix, J., McMahon, B.J., Cheung, T.H., Chung, T.K., Wong, Y.F., Smith, D.I., and Roberts, L.R. (2003). Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene* *22*, 3813-3820.
- Fieber, L.A., Greer, J.B., Guo, F., Crawford, D.C., and Rein, K.S. (2012). GENE EXPRESSION PROFILING OF HUMAN LIVER CARCINOMA (HepG2) CELLS EXPOSED TO THE MARINE TOXIN OKADAIC ACID. *Toxicol. Environ. Chem.* *24*, 1805-1821.
- Filone, C.M., Hanna, S.L., Caino, M.C., Bambina, S., Doms, R.W., and Cherry, S. (2010). Rift valley fever virus infection of human cells and insect hosts is promoted by protein kinase C epsilon. *PLoS. One.* *5*, e15483.
- Fiorentini, C., Matarrese, P., Fattorossi, A., and Donelli, G. (1996). Okadaic acid induces changes in the organization of F-actin in intestinal cells. *Toxicon* *34*, 937-945.

- Flitney, E.W., Kuczmarowski, E.R., Adam, S.A., and Goldman, R.D. (2009). Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *FASEB J.* *23*, 2110-2119.
- Fortier, A.M., Asselin, E., and Cadrin, M. (2013). Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin 1 up-regulation. *J. Biol. Chem.* *288*, 11555-11571.
- Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., Zhang, Z., Yang, H., Zhang, H., Zhou, C., Yao, J., Jin, L., Wang, H., Yang, Y., Fu, Y.X., and Wang, F.S. (2007). Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* *132*, 2328-2339.
- Fuchs, E. and Karakesisoglou, I. (2001). Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* *15*, 1-14.
- Fuchs, E. and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 345-382.
- Fuchs, E. and Yang, Y. (1999). Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* *98*, 547-550.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Nishiwaki, S., Yoshizawa, S., Yatsunami, J., Matsushima, R., Furuya, H., Okabe, S., Matsunaga, S., and Sugimura, T. (1992). Specific mechanistic aspects of animal tumor promoters: the okadaic acid pathway. *Prog. Clin. Biol. Res.* *374*, 337-350.
- Fujioka, Y., Tsuda, M., Nanbo, A., Hattori, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Miyazaki, T., and Ohba, Y. (2013). A Ca<sup>2+</sup>-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. *Nat. Commun.* *4*, 2763.
- Gagliardi, M.C., Nisini, R., Benvenuto, R., De, P.G., Michel, M.L., and Barnaba, V. (1994). Soluble transferrin mediates targeting of hepatitis B envelope antigen to transferrin receptor and its presentation by activated T cells. *Eur. J. Immunol.* *24*, 1372-1376.
- Gallina, A., Bonelli, F., Zentilin, L., Rindi, G., Muttini, M., and Milanesi, 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.
- Ganem, D. and Prince, A.M. (2004). Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1118-1129.
- Ganem, D. and Varmus, H.E. (1987). The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu. Rev. Biochem.* *56*, 651-693.
- Gazina, E.V., Fielding, J.E., Lin, B., and Anderson, D.A. (2000). Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J. Virol.* *74*, 4721-4728.
- Geng, X., Harry, B.L., Zhou, Q., Skeen-Gaar, R.R., Ge, X., Lee, E.S., Mitani, S., and Xue, D. (2012). Hepatitis B virus X protein targets the Bcl-2 protein CED-9 to induce intracellular Ca<sup>2+</sup> increase and cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *109*, 18465-18470.
- 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.
- Gilbert, S., Loranger, A., Daigle, N., and Marceau, N. (2001). Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J. Cell Biol.* *154*, 763-773.

- Girao,H., Geli,M.I., and Idrissi,F.Z. (2008). Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 582, 2112-2119.
- Glebe,D., Aliakbari,M., Krass,P., Knoop,E.V., Valerius,K.P., and Gerlich,W.H. (2003). Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J. Virol.* 77, 9511-9521.
- Glebe,D. and Bremer,C.M. (2013). The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin. Liver Dis.* 33, 103-112.
- Glebe,D. and Urban,S. (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J. Gastroenterol.* 13, 22-38.
- Glebe,D., Urban,S., Knoop,E.V., Cag,N., Krass,P., Grun,S., Bulavaite,A., Sasnauskas,K., and Gerlich,W.H. (2005). Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology* 129, 234-245.
- Gliksman,N.R., Parsons,S.F., and Salmon,E.D. (1992). Okadaic acid induces interphase to mitotic-like microtubule dynamic instability by inactivating rescue. *J. Cell Biol.* 119, 1271-1276.
- Goldstein,L.S. and Yang,Z. (2000). Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 39-71.
- Gopalakrishna,R., Chen,Z.H., and Gundimeda,U. (1992). Nonphorbol tumor promoters okadaic acid and calyculin-A induce membrane translocation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 950-957.
- Goshima,F., Watanabe,D., Suzuki,H., Takakuwa,H., Yamada,H., and Nishiyama,Y. (2001). The US2 gene product of herpes simplex virus type 2 interacts with cytokeratin 18. *Arch. Virol.* 146, 2201-2209.
- Gottlob,K., Fulco,M., Levrero,M., and Graessmann,A. (1998). The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J. Biol. Chem.* 273, 33347-33353.
- Green,K.J., Bohringer,M., Gocken,T., and Jones,J.C. (2005). Intermediate filament associated proteins. *Adv. Protein Chem.* 70, 143-202.
- Grethe,S., Heckel,J.O., Rietschel,W., and Hufert,F.T. (2000). Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J. Virol.* 74, 5377-5381.
- Griner,E.M. and Kazanietz,M.G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 281-294.
- Gripon,P., Le,S.J., Rumin,S., and Guguen-Guillouzo,C. (1995). Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology* 213, 292-299.
- Guidotti,L.G. and Chisari,F.V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 65-91.
- Guidotti,L.G. and Chisari,F.V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 23-61.
- Guidotti,L.G., Ishikawa,T., Hobbs,M.V., Matzke,B., Schreiber,R., and Chisari,F.V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 4, 25-36.
- Gurel,P.S., Hatch,A.L., and Higgs,H.N. (2014). Connecting the Cytoskeleton to the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Curr. Biol.* 24, R660-R672.

- Gurland,G. and Gundersen,G.G. (1993). Protein phosphatase inhibitors induce the selective breakdown of stable microtubules in fibroblasts and epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 8827-8831.
- Hadziyannis,S.J. (2011). Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African countries. *J. Hepatol.* *55*, 183-191.
- Haim,M., Trost,A., Maier,C.J., Achatz,G., Feichtner,S., Hintner,H., Bauer,J.W., and Onder,K. (2010). Cytokeratin 8 interacts with clumping factor B: a new possible virulence factor target. *Microbiology* *156*, 3710-3721.
- Haines,R.L. and Lane,E.B. (2012). Keratins and disease at a glance. *J. Cell Sci.* *125*, 3923-3928.
- Halpain,S. and Dehmelt,L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* *7*, 224.
- Hanana,H., Talarmin,H., Pennec,J.P., Droguet,M., Morel,J., and Dorange,G. (2012). Effect of okadaic acid on cultured clam heart cells: involvement of MAPkinase pathways. *Biol. Open.* *1*, 1192-1199.
- Haneji,T., Hirashima,K., Teramachi,J., and Morimoto,H. (2013). Okadaic acid activates the PKR pathway and induces apoptosis through PKR stimulation in MG63 osteoblast-like cells. *Int. J. Oncol.* *42*, 1904-1910.
- Harisi,R., Kenessey,I., Olah,J.N., Timar,F., Babo,I., Pogany,G., Paku,S., and Jeney,A. (2009). Differential inhibition of single and cluster type tumor cell migration. *Anticancer Res.* *29*, 2981-2985.
- Hatzfeld,M. and Franke,W.W. (1985). Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J. Cell Biol.* *101*, 1826-1841.
- Haystead,T.A., Sim,A.T., Carling,D., Honnor,R.C., Tsukitani,Y., Cohen,P., and Hardie,D.G. (1989). Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* *337*, 78-81.
- He,T., Stepulak,A., Holmstrom,T.H., Omary,M.B., and Eriksson,J.E. (2002). The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 10767-10774.
- Heermann,K.H., Goldmann,U., Schwartz,W., Seyffarth,T., Baumgarten,H., and Gerlich,W.H. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J. Virol.* *52*, 396-402.
- Heins,S. and Aebi,U. (1994). Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 25-33.
- Helenius,A. and Aebi,M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 1019-1049.
- Helfand,B.T., Chang,L., and Goldman,R.D. (2003). The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 445-467.
- Helfand,B.T., Chang,L., and Goldman,R.D. (2004). Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J. Cell Sci.* *117*, 133-141.
- Herrmann,H. and Aebi,U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 79-90.

- Herrmann,H. and Aebi,U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 749-789.
- Herrmann,H., Bar,H., Kreplak,L., Strelkov,S.V., and Aebi,U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 562-573.
- Hertel,L. (2011). Herpesviruses and intermediate filaments: close encounters with the third type. *Viruses.* *3*, 1015-1040.
- Hesse,M., Franz,T., Tamai,Y., Taketo,M.M., and Magin,T.M. (2000). Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *EMBO J.* *19*, 5060-5070.
- Hildt,E., Munz,B., Saher,G., Reifenberg,K., and Hofschneider,P.H. (2002). The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J.* *21*, 525-535.
- Hildt,E., Saher,G., Bruss,V., and Hofschneider,P.H. (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* *225*, 235-239.
- Hirata,N., Suizu,F., Matsuda-Lennikov,M., Edamura,T., Bala,J., and Noguchi,M. (2014). Inhibition of Akt kinase activity suppresses entry and replication of influenza virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *450*, 891-898.
- Hirokawa,N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* *279*, 519-526.
- Hoffmann,H.H., Palese,P., and Shaw,M.L. (2008). Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. *Antiviral Res.* *80*, 124-134.
- Hofmann,I., Mertens,C., Brettel,M., Nimmrich,V., Schnolzer,M., and Herrmann,H. (2000). Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 13)*, 2471-2483.
- Hsieh,A., Kim,H.S., Lim,S.O., Yu,D.Y., and Jung,G. (2011a). Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/beta-catenin signaling. *Cancer Lett.* *300*, 162-172.
- Hsieh,Y.H., Hsu,J.L., Su,I.J., and Huang,W. (2011b). Genomic instability caused by hepatitis B virus: into the hepatoma inferno. *Front Biosci. (Landmark. Ed)* *16*, 2586-2597.
- Hsieh,Y.H., Su,I.J., Wang,H.C., Chang,W.W., Lei,H.Y., Lai,M.D., Chang,W.T., and Huang,W. (2004). Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis* *25*, 2023-2032.
- Hu,Z., Zhang,Z., Doo,E., Coux,O., Goldberg,A.L., and Liang,T.J. (1999). Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J. Virol.* *73*, 7231-7240.
- Huang,H.C., Chen,C.C., Chang,W.C., Tao,M.H., and Huang,C. (2012). Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J. Virol.* *86*, 9443-9453.
- Huang,J. and Liang,T.J. (1993). A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol. Cell Biol.* *13*, 7476-7486.
- 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.

- Inada,H., Izawa,I., Nishizawa,M., Fujita,E., Kiyono,T., Takahashi,T., Momoi,T., and Inagaki,M. (2001). Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J. Cell Biol.* *155*, 415-426.
- Inoue,S. and Salmon,E.D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1619-1640.
- Ishihara,H., Martin,B.L., Brautigan,D.L., Karaki,H., Ozaki,H., Kato,Y., Fusetani,N., Watabe,S., Hashimoto,K., Uemura,D., and . (1989). Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *159*, 871-877.
- Isogawa,M., Furuichi,Y., and Chisari,F.V. (2005). Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity.* *23*, 53-63.
- Iwai,M., Kashiwadani,M., Okuno,T., Takino,T., and Ibata,Y. (1988). Immunocytochemical investigation of hepatitis B virus-associated antigens in cases of liver cirrhosis and HBsAg antigenemia and their relationship to development of hepatocellular carcinoma. *Histochem. J.* *20*, 283-289.
- Izawa,I., Nishizawa,M., Ohtakara,K., Ohtsuka,K., Inada,H., and Inagaki,M. (2000). Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein. *J. Biol. Chem.* *275*, 34521-34527.
- Jaitovich,A., Mehta,S., Na,N., Ciechanover,A., Goldman,R.D., and Ridge,K.M. (2008). Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of keratin intermediate filaments in mechanically stimulated A549 cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 25348-25355.
- Janke,C. and Bulinski,J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 773-786.
- Jaquemar,D., Kupriyanov,S., Wankell,M., Avis,J., Benirschke,K., Baribault,H., and Oshima,R.G. (2003). Keratin 8 protection of placental barrier function. *J. Cell Biol.* *161*, 749-756.
- Jefferson,J.J., Leung,C.L., and Liem,R.K. (2004). Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 542-553.
- Jin,Y.M., Yun,C., Park,C., Wang,H.J., and Cho,H. (2001). Expression of hepatitis B virus X protein is closely correlated with the high periportal inflammatory activity of liver diseases. *J. Viral Hepat.* *8*, 322-330.
- Jordan,M.A., Thrower,D., and Wilson,L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell Sci.* *102 (Pt 3)*, 401-416.
- Jung,J.K., Arora,P., Pagano,J.S., and Jang,K.L. (2007). Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway. *Cancer Res.* *67*, 5771-5778.
- Kann,M., Sodeik,B., Vlachou,A., Gerlich,W.H., and Helenius,A. (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* *145*, 45-55.
- Karakozova,M., Kozak,M., Wong,C.C., Bailey,A.O., Yates,J.R., III, Mogilner,A., Zebroski,H., and Kashina,A. (2006). Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science* *313*, 192-196.

- Kasahara,K., Kartasova,T., Ren,X.Q., Ikuta,T., Chida,K., and Kuroki,T. (1993). Hyperphosphorylation of keratins by treatment with okadaic acid of BALB/MK-2 mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *268*, 23531-23537.
- Kassenbrock,C.K., Garcia,P.D., Walter,P., and Kelly,R.B. (1988). Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated in vitro. *Nature* *333*, 90-93.
- Kayser,J., Haslbeck,M., Dempfle,L., Krause,M., Grashoff,C., Buchner,J., Herrmann,H., and Bausch,A.R. (2013). The small heat shock protein Hsp27 affects assembly dynamics and structure of keratin intermediate filament networks. *Biophys. J.* *105*, 1778-1785.
- Keasler,V.V., Hodgson,A.J., Madden,C.R., and Slagle,B.L. (2007). Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J. Virol.* *81*, 2656-2662.
- Kekule,A.S., Lauer,U., Meyer,M., Caselmann,W.H., Hofschneider,P.H., and Koshy,R. (1990). The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* *343*, 457-461.
- Kekule,A.S., Lauer,U., Weiss,L., Lubber,B., and Hofschneider,P.H. (1993). Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* *361*, 742-745.
- Kim,C.M., Koike,K., Saito,I., Miyamura,T., and Jay,G. (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* *351*, 317-320.
- Kim,K.H. and Seong,B.L. (2003). Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J.* *22*, 2104-2116.
- Kim,S. and Coulombe,P.A. (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* *21*, 1581-1597.
- Kim,S. and Coulombe,P.A. (2010). Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 75-81.
- Kim,S., Ishida,H., Yamane,D., Yi,M., Swinney,D.C., Fong,S., and Lemon,S.M. (2013). Contrasting roles of mitogen-activated protein kinases in cellular entry and replication of hepatitis C virus: MKNK1 facilitates cell entry. *J. Virol.* *87*, 4214-4224.
- Kim,S., Wong,P., and Coulombe,P.A. (2006). A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* *441*, 362-365.
- Kirmse,R., Portet,S., Mucke,N., Aebi,U., Herrmann,H., and Langowski,J. (2007). A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin. *J. Biol. Chem.* *282*, 18563-18572.
- Klymkowsky,M.W., Maynell,L.A., and Nislow,C. (1991). Cytokeratin phosphorylation, cyto keratin filament severing and the solubilization of the maternal mRNA Vg1. *J. Cell Biol.* *114*, 787-797.
- Kock,J., Rosler,C., Zhang,J.J., Blum,H.E., Nassal,M., and Thoma,C. (2010). Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS. Pathog.* *6*, e1001082.
- Kock,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.

- Kolsch,A., Windoffer,R., and Leube,R.E. (2009). Actin-dependent dynamics of keratin filament precursors. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 976-985.
- Kolsch,A., Windoffer,R., Wurflinger,T., Aach,T., and Leube,R.E. (2010). The keratin-filament cycle of assembly and disassembly. *J. Cell Sci.* *123*, 2266-2272.
- Kouklis,P.D., Hutton,E., and Fuchs,E. (1994). Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J. Cell Biol.* *127*, 1049-1060.
- Kowalczyk,A.P. and Green,K.J. (2013). Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *116*, 95-118.
- Kowalczyk,A.P., Stappenbeck,T.S., Parry,D.A., Palka,H.L., Virata,M.L., Bornslaeger,E.A., Nilles,L.A., and Green,K.J. (1994). Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophys. Chem.* *50*, 97-112.
- Kramer,G., Erdal,H., Mertens,H.J., Nap,M., Mauermann,J., Steiner,G., Marberger,M., Biven,K., Shoshan,M.C., and Linder,S. (2004). Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res.* *64*, 1751-1756.
- Ku,N.O., Azhar,S., and Omary,M.B. (2002a). Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation. *J. Biol. Chem.* *277*, 10775-10782.
- Ku,N.O., Liao,J., and Omary,M.B. (1997). Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J. Biol. Chem.* *272*, 33197-33203.
- Ku,N.O., Liao,J., and Omary,M.B. (1998a). Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J.* *17*, 1892-1906.
- Ku,N.O., Michie,S., Resurreccion,E.Z., Broome,R.L., and Omary,M.B. (2002b). Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 4373-4378.
- Ku,N.O., Michie,S.A., Soetikno,R.M., Resurreccion,E.Z., Broome,R.L., and Omary,M.B. (1998b). Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J. Cell Biol.* *143*, 2023-2032.
- Ku,N.O. and Omary,M.B. (1995). Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. *J. Biol. Chem.* *270*, 11820-11827.
- Ku,N.O. and Omary,M.B. (2000). Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *J. Cell Biol.* *149*, 547-552.
- Ku,N.O. and Omary,M.B. (2006). A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J. Cell Biol.* *174*, 115-125.
- Ku,N.O., Toivola,D.M., Strnad,P., and Omary,M.B. (2010). Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury. *Nat. Cell Biol.* *12*, 876-885.
- Kuang,S.Y., Jackson,P.E., Wang,J.B., Lu,P.X., Munoz,A., Qian,G.S., Kensler,T.W., and Groopman,J.D. (2004). Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 3575-3580.
- Kucic,N., Mahmutefendic,H., and Lucin,P. (2005). Inhibition of protein kinases C prevents murine cytomegalovirus replication. *J. Gen. Virol.* *86*, 2153-2161.



- Kumemura,H., Harada,M., Omary,M.B., Sakisaka,S., Suganuma,T., Namba,M., and Sata,M. (2004). Aggregation and loss of cytokeratin filament networks inhibit golgi organization in liver-derived epithelial cell lines. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 37-52.
- Kumemura,H., Harada,M., Yanagimoto,C., Koga,H., Kawaguchi,T., Hanada,S., Taniguchi,E., Ueno,T., and Sata,M. (2008). Mutation in keratin 18 induces mitochondrial fragmentation in liver-derived epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 33-40.
- Kuroki,K., Russnak,R., and Ganem,D. (1989). Novel N-terminal amino acid sequence required for retention of a hepatitis B virus glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* 9, 4459-4466.
- Kusakabe,A., Tanaka,Y., Inoue,M., Kurbanov,F., Tatematsu,K., Nojiri,S., Joh,T., Tsugane,S., and Mizokami,M. (2011). A population-based cohort study for the risk factors of HCC among hepatitis B virus mono-infected subjects in Japan. *J. Gastroenterol.* 46, 117-124.
- Labudova,M., Tomaskova,J., Skultety,L., Pastorek,J., and Pastorekova,S. (2009). The nucleoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus facilitates spread of persistent infection through stabilization of the keratin network. *J. Virol.* 83, 7842-7849.
- Lambert,C., Doring,T., and Prange,R. (2007). Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J. Virol.* 81, 9050-9060.
- Lambert,C., Mann,S., and Prange,R. (2004). Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins. *J. Gen. Virol.* 85, 1221-1225.
- Lambert,C. and Prange,R. (2001). Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 22265-22272.
- Lambert,C. and Prange,R. (2003). Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 5199-5204.
- Lambert,C. and Prange,R. (2007). Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein. *Virol. J.* 4, 45.
- Landers,T.A., Greenberg,H.B., and Robinson,W.S. (1977). Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J. Virol.* 23, 368-376.
- Lanford,R.E., Chavez,D., Brasky,K.M., Burns,R.B., III, and Rico-Hesse,R. (1998). Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5757-5761.
- Lara-Pezzi,E., Majano,P.L., Gomez-Gonzalo,M., Garcia-Monzon,C., Moreno-Otero,R., Levrero,M., and Lopez-Cabrera,M. (1998). The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. *Hepatology* 28, 1013-1021.
- Larsson,C. (2006). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal.* 18, 276-284.
- Lavanchy,D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 11, 97-107.
- Lavanchy,D. (2012). Viral hepatitis: global goals for vaccination. *J. Clin. Virol.* 55, 296-302.

- Lee, S.C., Kim, I.G., Marekov, L.N., O'Keefe, E.J., Parry, D.A., and Steinert, P.M. (1993). The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J. Biol. Chem.* *268*, 12164-12176.
- Lee, S.G. and Rho, H.M. (2000). Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* *19*, 468-471.
- Lee, W.C., Yu, J.S., Yang, S.D., and Lai, Y.K. (1992). Reversible hyperphosphorylation and reorganization of vimentin intermediate filaments by okadaic acid in 9L rat brain tumor cells. *J. Cell Biochem.* *49*, 378-393.
- Lee, Y., Park, U.S., Choi, I., Yoon, S.K., Park, Y.M., and Lee, Y.I. (1998). Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells. *Clin. Cancer Res.* *4*, 1711-1717.
- Lehtonen, E., Lehto, V.P., Vartio, T., Badley, R.A., and Virtanen, I. (1983). Expression of cytokeratin polypeptides in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev. Biol.* *100*, 158-165.
- Leistner, C.M., Gruen-Bernhard, S., and Glebe, D. (2008). Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* *10*, 122-133.
- Lepere-Douard, C., Trotard, M., Le, S.J., and Gripon, P. (2009). The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J. Virol.* *83*, 11819-11829.
- Leube, R.E., Moch, M., Kolsch, A., and Windoffer, R. (2011). "Panta rhei": Perpetual cycling of the keratin cytoskeleton. *Bioarchitecture.* *1*, 39-44.
- Leupin, O., Bontron, S., Schaeffer, C., and Strubin, M. (2005). Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J. Virol.* *79*, 4238-4245.
- Levrero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., and Dandri, M. (2009). Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* *51*, 581-592.
- Li, B., Gao, B., Ye, L., Han, X., Wang, W., Kong, L., Fang, X., Zeng, Y., Zheng, H., Li, S., Wu, Z., and Ye, L. (2007). Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response. *Virus Res.* *124*, 44-49.
- Li, W., Miao, X., Qi, Z., Zeng, W., Liang, J., and Liang, Z. (2010). Hepatitis B virus X protein upregulates HSP90alpha expression via activation of c-Myc in human hepatocarcinoma cell line, HepG2. *Virol. J.* *7*, 45.
- Li, X., Hui, A.M., Sun, L., Hasegawa, K., Torzilli, G., Minagawa, M., Takayama, T., and Makuuchi, M. (2004). p16INK4A hypermethylation is associated with hepatitis virus infection, age, and gender in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 7484-7489.
- Liao, G. and Gundersen, G.G. (1998). Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to dephosphorylated tubulin and vimentin. *J. Biol. Chem.* *273*, 9797-9803.
- Liao, J., Lowthert, L.A., Ghori, N., and Omary, M.B. (1995a). The 70-kDa heat shock proteins associate with glandular intermediate filaments in an ATP-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *270*, 915-922.
- Liao, J., Lowthert, L.A., Ku, N.O., Fernandez, R., and Omary, M.B. (1995b). Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. *J. Cell Biol.* *131*, 1291-1301.

- Liao,J. and Omary,M.B. (1996). 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J. Cell Biol.* *133*, 345-357.
- Liao,J., Price,D., and Omary,M.B. (1997). Association of glucose-regulated protein (grp78) with human keratin 8. *FEBS Lett.* *417*, 316-320.
- Liem,R.K. (2013). Intermediate filaments: not just for structure anymore. *Curr. Biol.* *23*, R322-R324.
- Liovic,M., Mogensen,M.M., Prescott,A.R., and Lane,E.B. (2003). Observation of keratin particles showing fast bidirectional movement colocalized with microtubules. *J. Cell Sci.* *116*, 1417-1427.
- Lipp,P. and Reither,G. (2011). Protein kinase C: the "masters" of calcium and lipid. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Liu,C.J. and Kao,J.H. (2013). Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin. Liver Dis.* *33*, 97-102.
- Liu,H., Shi,W., Luan,F., Xu,S., Yang,F., Sun,W., Liu,J., and Ma,C. (2010). Hepatitis B virus X protein upregulates transcriptional activation of human telomerase reverse transcriptase. *Virus Genes* *40*, 174-182.
- Liu,N., Ji,L., Maguire,M.L., and Loeb,D.D. (2004). cis-Acting sequences that contribute to the synthesis of relaxed-circular DNA of human hepatitis B virus. *J. Virol.* *78*, 642-649.
- Liu,Z., Tian,Y., Machida,K., Lai,M.M., Luo,G., Fong,S.K., and Ou,J.H. (2012). Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry. *J. Biol. Chem.* *287*, 41922-41930.
- Loeb,D.D., Hirsch,R.C., and Ganem,D. (1991). Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *EMBO J.* *10*, 3533-3540.
- Loffek,S., Woll,S., Hohfeld,J., Leube,R.E., Has,C., Bruckner-Tuderman,L., and Magin,T.M. (2010). The ubiquitin ligase CHIP/STUB1 targets mutant keratins for degradation. *Hum. Mutat.* *31*, 466-476.
- Long,H.A., Boczonadi,V., McInroy,L., Goldberg,M., and Maatta,A. (2006). Periplakin-dependent re-organisation of keratin cytoskeleton and loss of collective migration in keratin-8-downregulated epithelial sheets. *J. Cell Sci.* *119*, 5147-5159.
- Lucifora,J., Arzberger,S., Durantel,D., Belloni,L., Strubin,M., Levrero,M., Zoulim,F., Hantz,O., and Protzer,U. (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J. Hepatol.* *55*, 996-1003.
- Lucito,R. and Schneider,R.J. (1992). Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J. Virol.* *66*, 983-991.
- Lucocq,J. (1992). Mimicking mitotic Golgi disassembly using okadaic acid. *J. Cell Sci.* *103 (Pt 4)*, 875-880.
- Lucocq,J., Berger,E., and Hug,C. (1995). The pathway of Golgi cluster formation in okadaic acid-treated cells. *J. Struct. Biol.* *115*, 318-330.
- Lucocq,J., Warren,G., and Pryde,J. (1991). Okadaic acid induces Golgi apparatus fragmentation and arrest of intracellular transport. *J. Cell Sci.* *100 (Pt 4)*, 753-759.

- Machida,A., Kishimoto,S., Ohnuma,H., Baba,K., Ito,Y., Miyamoto,H., Funatsu,G., Oda,K., Usuda,S., Togami,S., and . (1984). A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 86, 910-918.
- Magdesian,M.H., Giordano,R., Ulrich,H., Juliano,M.A., Juliano,L., Schumacher,R.I., Colli,W., and Alves,M.J. (2001). Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 19382-19389.
- Majano,P., Lara-Pezzi,E., Lopez-Cabrera,M., Apolinario,A., Moreno-Otero,R., and Garcia-Monzon,C. (2001). Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 34, 1218-1224.
- Marcellin,P. (2009). Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int.* 29 *Suppl 1*, 1-8.
- Marra,M., Sordelli,I.M., Lombardi,A., Lamberti,M., Tarantino,L., Giudice,A., Stiuso,P., Abbruzzese,A., Sperlongano,R., Accardo,M., Agresti,M., Caraglia,M., and Sperlongano,P. (2011). Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *J. Transl. Med.* 9, 171.
- Marsh,M. and Helenius,A. (1989). Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 36, 107-151.
- Mason,W.S., Seal,G., and Summers,J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36, 829-836.
- Matsubara,K. and Tokino,T. (1990). Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol. Biol. Med.* 7, 243-260.
- McAleer,W.J., Buynak,E.B., Maigetter,R.Z., Wampler,D.E., Miller,W.J., and Hilleman,M.R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307, 178-180.
- McPherson,P.S. (2002). The endocytic machinery at an interface with the actin cytoskeleton: a dynamic, hip intersection. *Trends Cell Biol.* 12, 312-315.
- Melegari,M., Wolf,S.K., and Schneider,R.J. (2005). Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J. Virol.* 79, 9810-9820.
- Menon,M.B., Schwermann,J., Singh,A.K., Franz-Wachtel,M., Pabst,O., Seidler,U., Omary,M.B., Kotlyarov,A., and Gaestel,M. (2010). p38 MAP kinase and MAPKAP kinases MK2/3 cooperatively phosphorylate epithelial keratins. *J. Biol. Chem.* 285, 33242-33251.
- Minami,M., Daimon,Y., Mori,K., Takashima,H., Nakajima,T., Itoh,Y., and Okanoue,T. (2005). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 24, 4340-4348.
- Mitchison,T. and Kirschner,M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Mohri,H., Inaba,K., Ishijima,S., and Baba,S.A. (2012). Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 397-415.
- Moll,R., Franke,W.W., Schiller,D.L., Geiger,B., and Krepler,R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.

- Molnar-Kimber,K.L., Jarocki-Witek,V., Dheer,S.K., Vernon,S.K., Conley,A.J., Davis,A.R., and Hung,P.P. (1988). Distinctive properties of the hepatitis B virus envelope proteins. *J. Virol.* *62*, 407-416.
- Moolla,N., Kew,M., and Arbuthnot,P. (2002). Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J. Viral Hepat.* *9*, 323-331.
- Mormone,E., George,J., and Nieto,N. (2011). Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem. Biol. Interact.* *193*, 225-231.
- Murakami,Y., Noguchi,K., Yamagoe,S., Suzuki,T., Wakita,T., and Fukazawa,H. (2009). Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res.* *83*, 112-117.
- Murakami,Y., Saigo,K., Takashima,H., Minami,M., Okanoue,T., Brechot,C., and Paterlini-Brechot,P. (2005). Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* *54*, 1162-1168.
- Mutimer,DJ. and Oo,YH. (2011). Hepatitis B. *Medicine* *39*, 545-549.
- Na,N., Chandel,N.S., Litvan,J., and Ridge,K.M. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxia-induced degradation of keratin intermediate filaments. *FASEB J.* *24*, 799-809.
- Nakabayashi,H., Taketa,K., Miyano,K., Yamane,T., and Sato,J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* *42*, 3858-3863.
- Nakamichi,I., Toivola,D.M., Strnad,P., Michie,S.A., Oshima,R.G., Baribault,H., and Omary,M.B. (2005). Keratin 8 overexpression promotes mouse Mallory body formation. *J. Cell Biol.* *171*, 931-937.
- Nakatake,H., Chisaka,O., Yamamoto,S., Matsubara,K., and Koshy,R. (1993). Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* *195*, 305-314.
- Nassal,M. and Rieger,A. (1996). A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first-strand DNA synthesis. *J. Virol.* *70*, 2764-2773.
- Nava-Acosta,R. and Navarro-Garcia,F. (2013). Cytokeratin 8 is an epithelial cell receptor for Pet, a cytotoxic serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae. *MBio.* *4*, e00838-13.
- Nemeckova,S., Kunke,D., Press,M., Nemecek,V., and Kutinova,L. (1994). A carboxy-terminal portion of the preS1 domain of hepatitis B virus (HBV) occasioned retention in endoplasmic reticulum of HBV envelope proteins expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* *202*, 1024-1027.
- Newton,A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 161-167.
- Ni,M. and Lee,A.S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* *581*, 3641-3651.
- Ni,Y., Sonnabend,J., Seitz,S., and Urban,S. (2010). The pre-s2 domain of the hepatitis B virus is dispensable for infectivity but serves a spacer function for L-protein-connected virus assembly. *J. Virol.* *84*, 3879-3888.
- Norder,H., Ebert,J.W., Fields,H.A., Mushahwar,I.K., and Magnius,L.O. (1996). Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* *218*, 214-223.

- O'Brien,L.M., Walsh,E.J., Massey,R.C., Peacock,S.J., and Foster,T.J. (2002). Staphylococcus aureus clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cyokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol.* 4, 759-770.
- Omary,M.B. (2009). "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J. Clin. Invest* 119, 1756-1762.
- Omary,M.B., Baxter,G.T., Chou,C.F., Riopel,C.L., Lin,W.Y., and Strulovici,B. (1992). PKC epsilon-related kinase associates with and phosphorylates cytokeratin 8 and 18. *J. Cell Biol.* 117, 583-593.
- Omary,M.B., Coulombe,P.A., and McLean,W.H. (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N. Engl. J. Med.* 351, 2087-2100.
- Omary,M.B., Ku,N.O., Liao,J., and Price,D. (1998). Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell. Biochem.* 31, 105-140.
- Omary,M.B., Ku,N.O., Tao,G.Z., Toivola,D.M., and Liao,J. (2006). "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem. Sci.* 31, 383-394.
- Opsahl,J.A., Ljostveit,S., Solstad,T., Risa,K., Roepstorff,P., and Fladmark,K.E. (2013). Identification of dynamic changes in proteins associated with the cellular cytoskeleton after exposure to okadaic acid. *Mar. Drugs* 11, 1763-1782.
- Oriolo,A.S., Wald,F.A., Ramsauer,V.P., and Salas,P.J. (2007). Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp. Cell Res.* 313, 2255-2264.
- Osmanagic-Myers,S., Gregor,M., Walko,G., Burgstaller,G., Reipert,S., and Wiche,G. (2006). Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinases involved in cellular stress response and migration. *J. Cell Biol.* 174, 557-568.
- Osmanagic-Myers,S. and Wiche,G. (2004). Plectin-RACK1 (receptor for activated C kinase 1) scaffolding: a novel mechanism to regulate protein kinase C activity. *J. Biol. Chem.* 279, 18701-18710.
- Ott,J.J., Stevens,G.A., Groeger,J., and Wiersma,S.T. (2012). Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 30, 2212-2219.
- Ou,J.H. and Rutter,W.J. (1987). Regulation of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the preS-1 protein. *J. Virol.* 61, 782-786.
- Owens,D.W. and Lane,E.B. (2003). The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays* 25, 748-758.
- Pan,X., Hobbs,R.P., and Coulombe,P.A. (2013). The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 47-56.
- Paramio,J.M. (1999). A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 33-43.
- Paramio,J.M., Casanova,M.L., Segrelles,C., Mitnacht,S., Lane,E.B., and Jorcano,J.L. (1999). Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol. Cell Biol.* 19, 3086-3094.
- Paramio,J.M., Segrelles,C., Ruiz,S., and Jorcano,J.L. (2001). Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell Biol.* 21, 7449-7459.

- Parekh,D.B., Katso,R.M., Leslie,N.R., Downes,C.P., Procyk,K.J., Waterfield,M.D., and Parker,P.J. (2000). Beta1-integrin and PTEN control the phosphorylation of protein kinase C. *Biochem. J.* *352 Pt 2*, 425-433.
- Park,I.Y., Sohn,B.H., Yu,E., Suh,D.J., Chung,Y.H., Lee,J.H., Surzycki,S.J., and Lee,Y.I. (2007). Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology* *132*, 1476-1494.
- Park,S.G., Chung,C., Kang,H., Kim,J.Y., and Jung,G. (2006). Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF-kappaB2/BCL3 complex through kappaB site of cyclin D1 promoter. *J. Biol. Chem.* *281*, 31770-31777.
- Pasdar,M., Li,Z., and Chan,H. (1995). Desmosome assembly and disassembly are regulated by reversible protein phosphorylation in cultured epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* *30*, 108-121.
- Paterlini-Brechot,P., Saigo,K., Murakami,Y., Chami,M., Gozuacik,D., Mugnier,C., Lagorce,D., and Brechot,C. (2003). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* *22*, 3911-3916.
- Paulin,D., Diguët,N., Xue,Z., and Li,Z. (2011). [Intermediate-filament-associated diseases]. *Biol. Aujourd'hui*. *205*, 139-146.
- Perng,M.D., Cairns,L., van,d, I, Prescott,A., Hutcheson,A.M., and Quinlan,R.A. (1999). Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J. Cell Sci.* *112 ( Pt 13)*, 2099-2112.
- Perrot,R. and Eyer,J. (2009). Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Bull.* *80*, 282-295.
- Persing,D.H., Varmus,H.E., and Ganem,D. (1985). A frameshift mutation in the pre-S region of the human hepatitis B virus genome allows production of surface antigen particles but eliminates binding to polymerized albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 3440-3444.
- Persing,D.H., Varmus,H.E., and Ganem,D. (1986). Inhibition of secretion of hepatitis B surface antigen by a related presurface polypeptide. *Science* *234*, 1388-1391.
- Peterson,D.L., Nath,N., and Gavilanes,F. (1982). Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J. Biol. Chem.* *257*, 10414-10420.
- Poisson,F., Severac,A., Hourieux,C., Goudeau,A., and Roingeard,P. (1997). Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology* *228*, 115-120.
- Pourcel,C., Louise,A., Gervais,M., Chenciner,N., Dubois,M.F., and Tiollais,P. (1982). Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA. *J. Virol.* *42*, 100-105.
- Prange,R., Clemen,A., and Streeck,R.E. (1991). Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J. Virol.* *65*, 3919-3923.
- Prange,R. and Streeck,R.E. (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* *14*, 247-256.
- Prange,R., Werr,M., and Löffler-Mary,H. (1999). Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis. *Biol. Chem.* *380*, 305-314.

- Preiss,S., Littlejohn,M., Angus,P., Thompson,A., Desmond,P., Lewin,S.R., Sasadeusz,J., Matthews,G., Dore,G.J., Shaw,T., Sozzi,V., Yuen,L., Lau,G., Ayres,A., Thio,C., Avihingsanon,A., Ruxrungtham,K., Locarnini,S., and Revill,P.A. (2008). Defective hepatitis B virus DNA is not associated with disease status but is reduced by polymerase mutations associated with drug resistance. *Hepatology* 48, 741-749.
- Pryde,J.G., Farmaki,T., and Lucocq,J.M. (1998). Okadaic acid induces selective arrest of protein transport in the rough endoplasmic reticulum and prevents export into COPII-coated structures. *Mol. Cell Biol.* 18, 1125-1135.
- Pshenichkin,S.P. and Wise,B.C. (1995). Okadaic acid increases nerve growth factor secretion, mRNA stability, and gene transcription in primary cultures of cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 5994-5999.
- Pult,I., Netter,H.J., Bruns,M., Prassolov,A., Sirma,H., Hohenberg,H., Chang,S.F., Frolich,K., Krone,O., Kaleta,E.F., and Will,H. (2001). Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* 289, 114-128.
- Qualmann,B. and Kessels,M.M. (2002). Endocytosis and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 220, 93-144.
- Rabe,B., Glebe,D., and Kann,M. (2006). Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J. Virol.* 80, 5465-5473.
- Rabe,B., Vlachou,A., Pante,N., Helenius,A., and Kann,M. (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9849-9854.
- Radziwill,G., Tucker,W., and Schaller,H. (1990). Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J. Virol.* 64, 613-620.
- Raimondo,G., Pollicino,T., Cacciola,I., and Squadrito,G. (2007). Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 46, 160-170.
- Rall,L.B., Standring,D.N., Laub,O., and Rutter,W.J. (1983). Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* 3, 1766-1773.
- Rao,M.V., Engle,L.J., Mohan,P.S., Yuan,A., Qiu,D., Cataldo,A., Hassinger,L., Jacobsen,S., Lee,V.M., Andreadis,A., Julien,J.P., Bridgman,P.C., and Nixon,R.A. (2002). Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. *J. Cell Biol.* 159, 279-290.
- Reaven,E., Tsai,L., Maffe,B., and Azhar,S. (1993). Effect of okadaic acid on hepatocyte structure and function. *Cell Mol. Biol. Res.* 39, 275-288.
- Redpath,N.T. and Proud,C.G. (1989). The tumour promoter okadaic acid inhibits reticulocyte-lysate protein synthesis by increasing the net phosphorylation of elongation factor 2. *Biochem. J.* 262, 69-75.
- Rehermann,B., Ferrari,C., Pasquinelli,C., and Chisari,F.V. (1996). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat. Med.* 2, 1104-1108.
- Reichelt,J. and Magin,T.M. (2002). Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J. Cell Sci.* 115, 2639-2650.



- Reifenberg,K., Wilts,H., Lohler,J., Nusser,P., Hanano,R., Guidotti,L.G., Chisari,F.V., and Schlicht,H.J. (1999). The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J. Virol.* *73*, 10399-10405.
- Ridge,K.M., Linz,L., Flitney,F.W., Kuczmarski,E.R., Chou,Y.H., Omary,M.B., Sznajder,J.I., and Goldman,R.D. (2005). Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 30400-30405.
- Rogel,M.R., Jaitovich,A., and Ridge,K.M. (2010). The role of the ubiquitin proteasome pathway in keratin intermediate filament protein degradation. *Proc. Am. Thorac. Soc.* *7*, 71-76.
- Rolli,C.G., Seufferlein,T., Kemkemer,R., and Spatz,J.P. (2010). Impact of tumor cell cytoskeleton organization on invasiveness and migration: a microchannel-based approach. *PLoS. One.* *5*, e8726.
- Romashko,A.A. and Young,M.R. (2004). Protein phosphatase-2A maintains focal adhesion complexes in keratinocytes and the loss of this regulation in squamous cell carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis* *21*, 371-379.
- Root,C.N., Wills,E.G., McNair,L.L., and Whittaker,G.R. (2000). Entry of influenza viruses into cells is inhibited by a highly specific protein kinase C inhibitor. *J. Gen. Virol.* *81*, 2697-2705.
- Rosmorduc,O., Petit,M.A., Pol,S., Capel,F., Bortolotti,F., Berthelot,P., Brechot,C., and Kremsdorf,D. (1995). In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology* *22*, 10-19.
- Rossner,M.T., Jackson,R.J., and Murray,K. (1990). Modulation of expression of the hepatitis B virus surface antigen gene by the viral X-gene product. *Proc. Biol. Sci.* *241*, 51-58.
- Rotty,J.D. and Coulombe,P.A. (2012). A wound-induced keratin inhibits Src activity during keratinocyte migration and tissue repair. *J. Cell Biol.* *197*, 381-389.
- Ruzsnavszky,O., Dienes,B., Olah,T., Vincze,J., Gall,T., Balogh,E., Nagy,G., Batori,R., Lontay,B., Erdodi,F., and Csernoch,L. (2013). Differential effects of phosphatase inhibitors on the calcium homeostasis and migration of HaCaT keratinocytes. *PLoS. One.* *8*, e61507.
- Sacher,M.G., Athlan,E.S., and Mushynski,W.E. (1992). Okadaic acid induces the rapid and reversible disruption of the neurofilament network in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *186*, 524-530.
- Sahlgren,C.M., Pallari,H.M., He,T., Chou,Y.H., Goldman,R.D., and Eriksson,J.E. (2006). A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J.* *25*, 4808-4819.
- Saigo,K., Yoshida,K., Ikeda,R., Sakamoto,Y., Murakami,Y., Urashima,T., Asano,T., Kenmochi,T., and Inoue,I. (2008). Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma. *Hum. Mutat.* *29*, 703-708.
- San-Juan-Vergara,H., Peeples,M.E., Lockey,R.F., and Mohapatra,S.S. (2004). Protein kinase C-alpha activity is required for respiratory syncytial virus fusion to human bronchial epithelial cells. *J. Virol.* *78*, 13717-13726.
- Sato,Y., Mariot,P., Detimary,P., Gilon,P., and Henquin,J.C. (1998). Okadaic acid-induced decrease in the magnitude and efficacy of the Ca<sup>2+</sup> signal in pancreatic beta cells and inhibition of insulin secretion. *Br. J. Pharmacol.* *123*, 97-105.

- Savijoki,K., Alvesalo,J., Vuorela,P., Leinonen,M., and Kalkkinen,N. (2008). Proteomic analysis of Chlamydia pneumoniae-infected HL cells reveals extensive degradation of cytoskeletal proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *54*, 375-384.
- Schaefer S., Glebe D., Gerlich WH. (2010). *Hepatitis B Virus (Hepadnaviridae)*. Medizinische Virologie, 2 ed. Thieme, Stuttgart.
- Schafer,D.A. (2002). Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 76-81.
- Schmitt,S., Glebe,D., Alving,K., Tolle,T.K., Linder,M., Geyer,H., Linder,D., Peter-Katalinic,J., Gerlich,W.H., and Geyer,R. (1999). Analysis of the pre-. *J. Biol. Chem.* *274*, 11945-11957.
- Schmitt,S., Glebe,D., Tolle,T.K., Lochnit,G., Linder,D., Geyer,R., and Gerlich,W.H. (2004). Structure of pre-. *J. Gen. Virol.* *85*, 2045-2053.
- Schulze,A., Gripon,P., and Urban,S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* *46*, 1759-1768.
- Schulze,A., Mills,K., Weiss,T.S., and Urban,S. (2012). Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus. *Hepatology* *55*, 373-383.
- Seeger,C., Ganem,D., and Varmus,H.E. (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* *232*, 477-484.
- Seeger,C. and Mason,W.S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 51-68.
- Seipelt,J., Liebig,H.D., Sommergruber,W., Gerner,C., and Kuechler,E. (2000). 2A proteinase of human rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 20084-20089.
- Seitz,S., Urban,S., Antoni,C., and Bottcher,B. (2007). Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J.* *26*, 4160-4167.
- Serres,M., Grangeasse,C., Haftek,M., Durocher,Y., Duclos,B., and Schmitt,D. (1997). Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. *Exp. Cell Res.* *231*, 163-172.
- Shafritz,D.A., Shouval,D., Sherman,H.I., Hadziyannis,S.J., and Kew,M.C. (1981). Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens. *N. Engl. J. Med.* *305*, 1067-1073.
- Shaner,N.C., Campbell,R.E., Steinbach,P.A., Giepmans,B.N., Palmer,A.E., and Tsien,R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1567-1572.
- Sharon-Friling,R. and Shenk,T. (2014). Human cytomegalovirus pUL37x1-induced calcium flux activates PKCalpha, inducing altered cell shape and accumulation of cytoplasmic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *111*, E1140-E1148.
- Shea,T.B., Paskevich,P.A., and Beermann,M.L. (1993). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid increases axonal neurofilaments and neurite caliber, and decreases axonal microtubules in NB2a/d1 cells. *J. Neurosci. Res.* *35*, 507-521.
- Shi,Y., Sun,S., Liu,Y., Li,J., Zhang,T., Wu,H., Chen,X., Chen,D., and Zhou,Y. (2010). Keratin 18 phosphorylation as a progression marker of chronic hepatitis B. *Virology* *407*, 70-77.

- Shih,W.L., Kuo,M.L., Chuang,S.E., Cheng,A.L., and Doong,S.L. (2000). Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* *275*, 25858-25864.
- Shirato,K., Ujike,M., Kawase,M., and Matsuyama,S. (2012). Increased replication of respiratory syncytial virus in the presence of cytokeratin 8 and 18. *J. Med. Virol.* *84*, 365-370.
- Sieczkarski,S.B., Brown,H.A., and Whittaker,G.R. (2003). Role of protein kinase C betaII in influenza virus entry via late endosomes. *J. Virol.* *77*, 460-469.
- Siegrist,S.E. and Doe,C.Q. (2007). Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev.* *21*, 483-496.
- Sivaramakrishnan,S., Schneider,J.L., Sitikov,A., Goldman,R.D., and Ridge,K.M. (2009). Shear stress induced reorganization of the keratin intermediate filament network requires phosphorylation by protein kinase C zeta. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2755-2765.
- Slobbe-van Drunen,M.E., Vossen,R.C., Couwenberg,F.M., Hulsbosch,M.M., Heemskerk,J.W., van Dam-Mieras,M.C., and Bruggeman,C.A. (1997). Activation of protein kinase C enhances the infection of endothelial cells by human cytomegalovirus. *Virus Res.* *48*, 207-213.
- Small,J.V., Stradal,T., Vignal,E., and Rottner,K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* *12*, 112-120.
- Smith,E.A. and Fuchs,E. (1998). Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J. Cell Biol.* *141*, 1229-1241.
- Snider,N.T., Weerasinghe,S.V., Iniguez-Lluhi,J.A., Herrmann,H., and Omary,M.B. (2011). Keratin hypersumoylation alters filament dynamics and is a marker for human liver disease and keratin mutation. *J. Biol. Chem.* *286*, 2273-2284.
- Soldati,T. and Schliwa,M. (2006). Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 897-908.
- Spandau,D.F. and Lee,C.H. (1988). trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* *62*, 427-434.
- Sprengel,R., Kaleta,E.F., and Will,H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* *62*, 3832-3839.
- Srikanth,B., Vaidya,M.M., and Kalraiya,R.D. (2010). O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. *J. Biol. Chem.* *285*, 34062-34071.
- Stauffer,J.K., Scarzello,A.J., Jiang,Q., and Wiltrot,R.H. (2012). Chronic inflammation, immune escape, and oncogenesis in the liver: a unique neighborhood for novel intersections. *Hepatology* *56*, 1567-1574.
- Strelkov,S.V., Herrmann,H., and Aebi,U. (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* *25*, 243-251.
- Strnad,P., Paschke,S., Jang,K.H., and Ku,N.O. (2012). Keratins: markers and modulators of liver disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *28*, 209-216.
- Strnad,P., Windoffer,R., and Leube,R.E. (2001). In vivo detection of cytokeratin filament network breakdown in cells treated with the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Cell Tissue Res.* *306*, 277-293.

- Strnad,P., Windoffer,R., and Leube,R.E. (2002). Induction of rapid and reversible cytokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. *J. Cell Sci.* *115*, 4133-4148.
- Strnad,P., Windoffer,R., and Leube,R.E. (2003). Light-induced resistance of the keratin network to the filament-disrupting tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate. *J. Invest Dermatol.* *120*, 198-203.
- Strnad,P., Zatloukal,K., Stumtner,C., Kulaksiz,H., and Denk,H. (2008). Mallory-Denk-bodies: lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. *Biochim. Biophys. Acta* *1782*, 764-774.
- Su,F. and Schneider,R.J. (1996). Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J. Virol.* *70*, 4558-4566.
- Su,H., Zhao,J., Xiong,Y., Xu,T., Zhou,F., Yuan,Y., Zhang,Y., and Zhuang,S.M. (2008). Large-scale analysis of the genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma from Southeast China. *Mutat. Res.* *641*, 27-35.
- Sugimoto,M., Inoko,A., Shiromizu,T., Nakayama,M., Zou,P., Yonemura,S., Hayashi,Y., Izawa,I., Sasoh,M., Uji,Y., Kaibuchi,K., Kiyono,T., and Inagaki,M. (2008). The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells. *J. Cell Biol.* *183*, 19-28.
- Summers,J., O'Connell,A., and Millman,I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *72*, 4597-4601.
- Summers,J., Smolec,J.M., and Snyder,R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *75*, 4533-4537.
- Sun,M.Z., Dang,S.S., Wang,W.J., Jia,X.L., Zhai,S., Zhang,X., Li,M., Li,Y.P., and Xun,M. (2013a). Cytokeratin 8 is increased in hepatitis C virus cells and its ectopic expression induces apoptosis of SMMC7721 cells. *World J. Gastroenterol.* *19*, 6178-6187.
- Sun,Z., Guo,Y.S., Yan,S.J., Wan,Z.Y., Gao,B., Wang,L., Liu,Z.H., Gao,Y., Samartzis,D., Lan,L.F., Wang,H.Q., and Luo,Z.J. (2013b). CK8 phosphorylation induced by compressive loads underlies the downregulation of CK8 in human disc degeneration by activating protein kinase C. *Lab Invest* *93*, 1323-1330.
- Sureau,C. and Salisse,J. (2013). A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* *57*, 985-994.
- Tamaki,H. and Yamashina,S. (2002). Structural integrity of the Golgi stack is essential for normal secretory functions of rat parotid acinar cells: effects of brefeldin A and okadaic acid. *J. Histochem. Cytochem.* *50*, 1611-1623.
- Tan,Y.J. (2011). Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *17*, 4853-4857.
- Tanaka,Y., Mukaide,M., Orito,E., Yuen,M.F., Ito,K., Kurbanov,F., Sugauchi,F., Asahina,Y., Izumi,N., Kato,M., Lai,C.L., Ueda,R., and Mizokami,M. (2006). Specific mutations in enhancer II/core promoter of hepatitis B virus subgenotypes C1/C2 increase the risk of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *45*, 646-653.
- Tang,H., Banks,K.E., Anderson,A.L., and McLachlan,A. (2001). Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspect.* *14*, 325-334.

- Tang,H., Delgermaa,L., Huang,F., Oishi,N., Liu,L., He,F., Zhao,L., and Murakami,S. (2005). The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. *J. Virol.* *79*, 5548-5556.
- Tarn,C., Bilodeau,M.L., Hullinger,R.L., and Andrisani,O.M. (1999). Differential immediate early gene expression in conditional hepatitis B virus pX-transforming versus nontransforming hepatocyte cell lines. *J. Biol. Chem.* *274*, 2327-2336.
- Tasdelen,F.N., Aydin,B.K., Sarikaya,H., Tanyel,E., Esen,S., Sunbul,M., and Leblebicioglu,H. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis B. *Clin. Lab* *58*, 273-280.
- Teasdale,R.D., Matheson,F., and Gleeson,P.A. (1994). Post-translational modifications distinguish cell surface from Golgi-retained beta 1,4 galactosyltransferase molecules. Golgi localization involves active retention. *Glycobiology* *4*, 917-928.
- Terradillos,O., de La,C.A., Pollicino,T., Neuveut,C., Sitterlin,D., Lecoeur,H., Gougeon,M.L., Kahn,A., and Buendia,M.A. (2002). The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* *21*, 377-386.
- Thung,S.N., Gerber,M.A., Kasambalides,E.J., Gilja,B.K., Keh,W., and Gerlich,W.H. (1986). Demonstration of pre-S polypeptides of hepatitis B virus in infected livers. *Hepatology* *6*, 1315-1318.
- Tian,Y., Yang,W., Song,J., Wu,Y., and Ni,B. (2013). Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol. Cell Biol.* *33*, 2810-2816.
- Toivola,D.M., Baribault,H., Magin,T., Michie,S.A., and Omary,M.B. (2000a). Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* *279*, G1343-G1354.
- Toivola,D.M., Ku,N.O., Ghori,N., Lowe,A.W., Michie,S.A., and Omary,M.B. (2000b). Effects of keratin filament disruption on exocrine pancreas-stimulated secretion and susceptibility to injury. *Exp. Cell Res.* *255*, 156-170.
- Toivola,D.M., Ku,N.O., Resurreccion,E.Z., Nelson,D.R., Wright,T.L., and Omary,M.B. (2004). Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* *40*, 459-466.
- Toivola,D.M., Nieminen,M.I., Hesse,M., He,T., Baribault,H., Magin,T.M., Omary,M.B., and Eriksson,J.E. (2001). Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology* *34*, 1174-1183.
- Toivola,D.M., Tao,G.Z., Habtezion,A., Liao,J., and Omary,M.B. (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* *15*, 608-617.
- Trotard,M., Lepere-Douard,C., Regeard,M., Piquet-Pellorce,C., Lavillette,D., Cosset,F.L., Gripon,P., and Le,S.J. (2009). Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB J.* *23*, 3780-3789.
- Turkki,P., Makkonen,K.E., Huttunen,M., Laakkonen,J.P., Yla-Herttuala,S., Airene,K.J., and Marjomaki,V. (2013). Cell susceptibility to baculovirus transduction and echovirus infection is modified by protein kinase C phosphorylation and vimentin organization. *J. Virol.* *87*, 9822-9835.
- 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.

- Twu, J.S., Lai, M.Y., Chen, D.S., and Robinson, W.S. (1993). Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* *192*, 346-350.
- Ueda, K., Tsurimoto, T., and Matsubara, K. (1991). Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J. Virol.* *65*, 3521-3529.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A.J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J., and Harrison, T.J. (1988). The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J. Gen. Virol.* *69 (Pt 6)*, 1383-1389.
- Vijayaraj, P., Kroger, C., Reuter, U., Windoffer, R., Leube, R.E., and Magin, T.M. (2009). Keratins regulate protein biosynthesis through localization of GLUT1 and -3 upstream of AMP kinase and Raptor. *J. Cell Biol.* *187*, 175-184.
- Vilela, R.C. and Benchimol, M. (2011). Interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with keratin: an important role in parasite infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *106*, 701-704.
- von, H.T., Schulze, A., Chicano, W., I, Heidrich, B., Becker, T., Steinmann, E., Helfritz, F.A., Rohrmann, K., Urban, S., Manns, M.P., Pietschmann, T., and Ciesek, S. (2011). The novel immunosuppressive protein kinase C inhibitor sotrastaurin has no pro-viral effects on the replication cycle of hepatitis B or C virus. *PLoS. One.* *6*, e24142.
- Wagner, O.I., Rammensee, S., Korde, N., Wen, Q., Letierrier, J.F., and Janmey, P.A. (2007). Softness, strength and self-repair in intermediate filament networks. *Exp. Cell Res.* *313*, 2228-2235.
- Walczak, C.E. and Shaw, S.L. (2010). A MAP for bundling microtubules. *Cell* *142*, 364-367.
- Wang, G.H. and Seeger, C. (1992). The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* *71*, 663-670.
- Wang, G.H. and Seeger, C. (1993). Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J. Virol.* *67*, 6507-6512.
- Wang, H., Parry, D.A., Jones, L.N., Idler, W.W., Marekov, L.N., and Steinert, P.M. (2000). In vitro assembly and structure of trichocyte keratin intermediate filaments: a novel role for stabilization by disulfide bonding. *J. Cell Biol.* *151*, 1459-1468.
- Wang, H.C., Wu, H.C., Chen, C.F., Fausto, N., Lei, H.Y., and Su, I.J. (2003). Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress. *Am. J. Pathol.* *163*, 2441-2449.
- Wang, Q., Kennedy, A., Das, P., McIntosh, P.B., Howell, S.A., Isaacson, E.R., Hinz, S.A., Davy, C., and Doorbar, J. (2009). Phosphorylation of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein at T57 by ERK triggers a structural change that enhances keratin binding and protein stability. *J. Virol.* *83*, 3668-3683.
- Warren, K.S., Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto, and Verschoor, E.J. (1999). A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J. Virol.* *73*, 7860-7865.
- Waschulewski, I.H., Kruse, M.L., Agricola, B., Kern, H.F., and Schmidt, W.E. (1996). Okadaic acid disrupts Golgi structure and impairs enzyme synthesis and secretion in the rat pancreas. *Am. J. Physiol* *270*, G939-G947.
- Weng, Y.R., Cui, Y., and Fang, J.Y. (2012). Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. *Mol. Cancer Res.* *10*, 485-493.

- Werner,N.S., Windoffer,R., Strnad,P., Grund,C., Leube,R.E., and Magin,T.M. (2004). Epidermolysis bullosa simplex-type mutations alter the dynamics of the keratin cytoskeleton and reveal a contribution of actin to the transport of keratin subunits. *Mol. Biol. Cell* *15*, 990-1002.
- Westermann,S. and Weber,K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 938-947.
- Westermarck,J., Holmstrom,T., Ahonen,M., Eriksson,J.E., and Kahari,V.M. (1998). Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases Jun N-terminal kinase and p38. *Matrix Biol.* *17*, 547-557.
- Wieland,S., Thimme,R., Purcell,R.H., and Chisari,F.V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 6669-6674.
- Wieland,S.F. and Chisari,F.V. (2005). Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J. Virol.* *79*, 9369-9380.
- Will,H., Reiser,W., Weimer,T., Pfaff,E., Buscher,M., Sprengel,R., Cattaneo,R., and Schaller,H. (1987). Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* *61*, 904-911.
- Wills,W., Larouze,B., London,W.T., Millman,I., Werner,B.G., Ogston,W., Pourtaghva,M., Diallo,S., and Blumberg,B.S. (1977). Hepatitis-B virus in bedbugs (*Cimex hemipterus*) from Senegal. *Lancet* *2*, 217-219.
- Wills,W., Saimot,G., Brochard,C., Blumberg,B.S., London,W.T., Dechene,R., and Millman,I. (1976). Hepatitis B surface antigen (Australia antigen) in mosquitoes collected in Senegal, West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *25*, 186-190.
- Windoffer,R., Beil,M., Magin,T.M., and Leube,R.E. (2011). Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J. Cell Biol.* *194*, 669-678.
- Windoffer,R. and Leube,R.E. (1999). Detection of cytokeratin dynamics by time-lapse fluorescence microscopy in living cells. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 24)*, 4521-4534.
- Windoffer,R., Woll,S., Strnad,P., and Leube,R.E. (2004). Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2436-2448.
- Winheim,S., Hieb,A.R., Silbermann,M., Surmann,E.M., Wedig,T., Herrmann,H., Langowski,J., and Mucke,N. (2011). Deconstructing the late phase of vimentin assembly by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *PLoS. One.* *6*, e19202.
- Wodnicka,M., Pierzchalska,M., Bereiter-Hahn,J., and Kajstura,J. (1992). Comparative study on effects of cytochalasins B and D on F-actin content in different cell lines and different culture conditions. *Folia Histochem. Cytobiol.* *30*, 107-111.
- Woll,S., Windoffer,R., and Leube,R.E. (2007). p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J. Cell Biol.* *177*, 795-807.
- Wu,J.C., Merlino,G., and Fausto,N. (1994). Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 674-678.
- Xu,Z., Bruss,V., and Yen,T.S. (1997a). Formation of intracellular particles by hepatitis B virus large surface protein. *J. Virol.* *71*, 5487-5494.

- Xu,Z., Jensen,G., and Yen,T.S. (1997b). Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* *71*, 7387-7392.
- Xu,Z., Yen,T.S., Wu,L., Madden,C.R., Tan,W., Slagle,B.L., and Ou,J.H. (2002). Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J. Virol.* *76*, 2579-2584.
- Yaginuma,K., Kobayashi,H., Kobayashi,M., Morishima,T., Matsuyama,K., and Koike,K. (1987). Multiple integration site of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma and chronic active hepatitis tissues from children. *J. Virol.* *61*, 1808-1813.
- Yan,H., Zhong,G., Xu,G., He,W., Jing,Z., Gao,Z., Huang,Y., Qi,Y., Peng,B., Wang,H., Fu,L., Song,M., Chen,P., Gao,W., Ren,B., Sun,Y., Cai,T., Feng,X., Sui,J., and Li,W. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife.* (Cambridge) *1*, e00049.
- Yang,H.I., Yeh,S.H., Chen,P.J., Iloeje,U.H., Jen,C.L., Su,J., Wang,L.Y., Lu,S.N., You,S.L., Chen,D.S., Liaw,Y.F., and Chen,C.J. (2008). Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *100*, 1134-1143.
- Yang,Q., Zhang,X.F., Van,G.D., Dunn,A.P., Hyland,C., Medeiros,N., and Forscher,P. (2013). Protein kinase C activation decreases peripheral actin network density and increases central nonmuscle myosin II contractility in neuronal growth cones. *Mol. Biol. Cell* *24*, 3097-3114.
- Yano,T., Tokui,T., Nishi,Y., Nishizawa,K., Shibata,M., Kikuchi,K., Tsuiki,S., Yamauchi,T., and Inagaki,M. (1991). Phosphorylation of keratin intermediate filaments by protein kinase C, by calmodulin-dependent protein kinase and by cAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* *197*, 281-290.
- Yatsunami,J., Komori,A., Ohta,T., Sugauma,M., Yuspa,S.H., and Fujiki,H. (1993). Hyperphosphorylation of cytokeratins by okadaic acid class tumor promoters in primary human keratinocytes. *Cancer Res.* *53*, 992-996.
- Yoo,Y.D., Ueda,H., Park,K., Flanders,K.C., Lee,Y.I., Jay,G., and Kim,S.J. (1996). Regulation of transforming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis. *J. Clin. Invest* *97*, 388-395.
- Yoon,K.H., Yoon,M., Moir,R.D., Khuon,S., Flitney,F.W., and Goldman,R.D. (2001). Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J. Cell Biol.* *153*, 503-516.
- Yoon,S., Choi,J., Yoon,J., Huh,J.W., and Kim,D. (2006). Okadaic acid induces JNK activation, bim overexpression and mitochondrial dysfunction in cultured rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* *394*, 190-195.
- Young,M.R., Kolesiak,K., and Meisinger,J. (2002). Protein phosphatase-2A regulates endothelial cell motility and both the phosphorylation and the stability of focal adhesion complexes. *Int. J. Cancer* *100*, 276-282.
- Yuan,J.M., Ambinder,A., Fan,Y., Gao,Y.T., Yu,M.C., and Groopman,J.D. (2009). Prospective evaluation of hepatitis B 1762(T)/1764(A) mutations on hepatocellular carcinoma development in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *18*, 590-594.
- Yuan,Q.X., Nagao,Y., Gaal,K., Hu,B., and French,S.W. (1998). Mechanisms of mallory body formation induced by okadaic acid in drug-primed mice. *Exp. Mol. Pathol.* *65*, 87-103.



- Zachara,N.E. and Hart,G.W. (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim. Biophys. Acta* *1761*, 599-617.
- Zackroff,R.V. and Goldman,R.D. (1979). In vitro assembly of intermediate filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 6226-6230.
- Zatloukal,K., Stumptner,C., Fuchsbichler,A., Fickert,P., Lackner,C., Trauner,M., and Denk,H. (2004). The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J. Pathol.* *204*, 367-376.
- Zatloukal,K., Stumptner,C., Lehner,M., Denk,H., Baribault,H., Eshkind,L.G., and Franke,W.W. (2000). Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am. J. Pathol.* *156*, 1263-1274.
- Zhang,T., Zhang,J., You,X., Liu,Q., Du,Y., Gao,Y., Shan,C., Kong,G., Wang,Y., Yang,X., Ye,L., and Zhang,X. (2012). Hepatitis B virus X protein modulates oncogene Yes-associated protein by CREB to promote growth of hepatoma cells. *Hepatology* *56*, 2051-2059.
- Zhang,Y. and Schneider,R.J. (1994). Adenovirus inhibition of cell translation facilitates release of virus particles and enhances degradation of the cytokeratin network. *J. Virol.* *68*, 2544-2555.
- Zheng,Y., Liu,D., Feng,D., Tang,H., Li,Y., and You,X. (1995). An animal study on transmission of hepatitis B virus through mosquitoes. *Chin Med. J. (Engl.)* *108*, 895-897.
- Zhong,Q., An,X., Yang,Y.X., Hu,H.D., Ren,H., and Hu,P. (2014). Keratin 8 is involved in hepatitis B virus replication. *J. Med. Virol.* *86*, 687-694.
- Zhu,C., Bai,Y., Liu,Q., Li,D., Hong,J., Yang,Z., Cui,L., Hua,X., and Yuan,C. (2013). Depolymerization of cytokeratin intermediate filaments facilitates intracellular infection of HeLa cells by *Bartonella henselae*. *J. Infect. Dis.* *207*, 1397-1405.
- Zhu,Y.Z., Qian,X.J., Zhao,P., and Qi,Z.T. (2014). How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J. Gastroenterol.* *20*, 3457-3467.
- 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.

## 9 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BPAG1	bullöses Pemphigoid-Antigen 1
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differenziation</i> )
CHB	Chronische Hepatitis B
CK	Zytokeratin
CKF	Zytokeratinfilamente
CMV	Cytomegalie-Virus
C-terminal	Carboxyterminales Ende
CytoD	Cytochalasin D
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt entionisiertes Wasser
Dox	Doxyzyklin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DR	Direkte Wiederholungssequenzen ( <i>direct repeats</i> )
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER – Golgi Intermediärkompartiment
FCS	fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GRP-78	<i>Glucose-related protein 78</i>
HBcAg	Hepatitis B Kapsid-Antigen
HBeAg	<i>Hepatitis B early antigen</i>
HBs	HBV-Oberflächenproteine

---

HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	X-Protein von HBV
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGM	Hepatozyten-Wachstummedium
IC	Immunzytochemie
I.E.	Internationale Einheiten
IF	Intermediärfilamente bzw. Immunfluoreszenz
IFAP	Intermediärfilament-assoziierte Proteine
KAP	Keratin-assoziierte Proteine
KF	Keratinfilamente
KFN	Keratinfilament-Netzwerk
LHBs	Grosses HBV-Oberflächenprotein
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MDB	Mallory-Denk-Körperchen
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MF	Mikrofilamente
MHBs	Mittleres HBV-Oberflächenprotein
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I
MT	Mikrotubuli
NC	Negativkontrolle
Noc	Nocodazol
NTCP	<i>Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
N-terminal	Aminoterminales Ende
OA	Okadainsäure
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS + 0,1% Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pgDNA	prägenomische DNA
PKC	Proteinkinase C
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PTH	Primäre Hepatozyten von <i>Tupaia belangeri</i>

---

RRE	<i>Rev responsive element</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
R10-Medium	vollständiges Medium für DC (RPMI 1640 + Zusätze)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHBs	Kleines HBV-Oberflächenprotein
SPR	Oberflächen-Plasmonresonanz
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
TAE	<i>Tris</i> -(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-EDTA
TGF- $\alpha$	<i>Transforming-growth-factor-alpha</i>
TM	Tunicamycin
Ü/N	Über-Nacht-Inkubation
ÜS	Überstand
ZK	Zellkultur

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Genom-Struktur des Hepatitis B Virus (HBV) .....	9
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Hepatitis B Virus und der subviralen Partikel .....	11
Abbildung 3: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus (HBV) .....	13
Abbildung 4: Reverse Transkription des Hepatitis B Virus .....	15
Abbildung 5: Membran-Topologie der HBV-Oberflächenproteine (HBs) .....	17
Abbildung 6: HBV-Oberflächenproteine (HBs) .....	22
Abbildung 7: Aufbau und Bildung von Mikrotubuli .....	27
Abbildung 8: Zusammenbau, Organisation und Regulierung von Keratin-Filamenten (KF) ...	36
Abbildung 9: Schematischer Ablauf der lentiviralen Herstellung, Transfektion und Transduktion .....	67
Abbildung 10: Schematische Abbildung des <i>Proximity Ligation Assays</i> zur Detektion einer Protein-Kolokalisation .....	73
Abbildung 11: Expression von mCherry in lentiviral transduzierten 293T Zellen .....	79
Abbildung 12: Zeitverlauf der Dox-induzierten LHBs-Expression in Huh7 (A) und NIH3T3 (B) Zellen .....	81
Abbildung 13: Intrazelluläre Verteilung von SHBs und LHBs in transgenen Zelllinien .....	82
Abbildung 14: HBsAg-Verteilung in Paraffinschnitten humaner und muriner Leber .....	83
Abbildung 15: Analysen zur Kolokalisation von LHBs mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat .....	84
Abbildung 16: Inhibierung der N-Glykosylierung von LHBs und intrazelluläre LHBs- Verteilung .....	86
Abbildung 17: Quantifizierung von sekretierten und intrazellulären HBs-Proteinen .....	87
Abbildung 18: Einfluss von Okadainsäure auf die intrazelluläre Verteilung von Zytokeratinen und LHBs .....	89
Abbildung 19: Einfluss von Cytochalasin D auf die intrazelluläre Verteilung von $\beta$ -Aktin und LHBs .....	91
Abbildung 20: Einfluss von Nocodazol auf die intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli und LHBs .....	92
Abbildung 21: Einfluss von Cytochalasin D auf die Zytokeratin-Struktur .....	93
Abbildung 22: OA induziert einen LHBs-, jedoch keinen ER-Zusammensturz .....	94
Abbildung 23: Partielle ER-Komprimierung und Kolokalisation mit fokalen LHBs/CK18- Aggregaten nach OA-Behandlung .....	95
Abbildung 24: Zytokeratin-Profil von Huh7-, NIH3T3- und AML-12-Zellen $\pm$ LHBs- Expression .....	96

Abbildung 25: Konfokale Mikroskopie zeigt Kollokalisierungen von LHBs/HBs mit Zytokeratinen .....	97
Abbildung 26: <i>Proximity ligation assay</i> (PLA) zur Analyse von Protein-Kollokalisierungen in Huh7-Zellen .....	98
Abbildung 27: <i>Proximity ligation assay</i> (PLA) zur Analyse von Protein-Kollokalisierungen ....	99
Abbildung 28: Quantitative Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie zeigt eine Bindung/Interaktion der myr-präS1-Domäne von LHBs mit CK8 und CK18 .....	101
Abbildung 29: Prävention der LHBs-Aggregatbildung durch CK18-Expression in NIH3T3-Zellen .....	102
Abbildung 30: Überexpression des BiP-Proteins in NIH3T3-Zellen.....	103
Abbildung 31: Herunterregulierung von CK18-mRNA in Huh7-Zellen durch RNA-Interferenz.....	104
Abbildung 32: Herunterregulierung von CK8/18-Protein in Huh7-Zellen durch RNA-Interferenz .....	105
Abbildung 33: CK18-Knockdown und LHBs-Verteilung in Huh7-Zellen.....	106
Abbildung 34: Einfluss von extrazellulären Zytokeratinen auf die HBV-Infektion .....	107
Abbildung 35: Einfluss von Okadainsäure auf die HBV-Infektion .....	109
Abbildung 36: Einfluss von Okadainsäure auf die HBsAg-Sekretion bereits infizierter PTH-Zellen .....	111
Abbildung 37: Interaktion von LHBs mit Zytokeratinen und $\beta$ -Aktin bei AML-12-Zellen...	174
Abbildung 38: Interaktion von LHBs mit $\alpha$ -Tubulin bei AML-12-Zellen.....	175
Abbildung 39: PLA-Assay zur Analyse von Protein-Kollokalisierungen bei AML-12-Zellen .	176

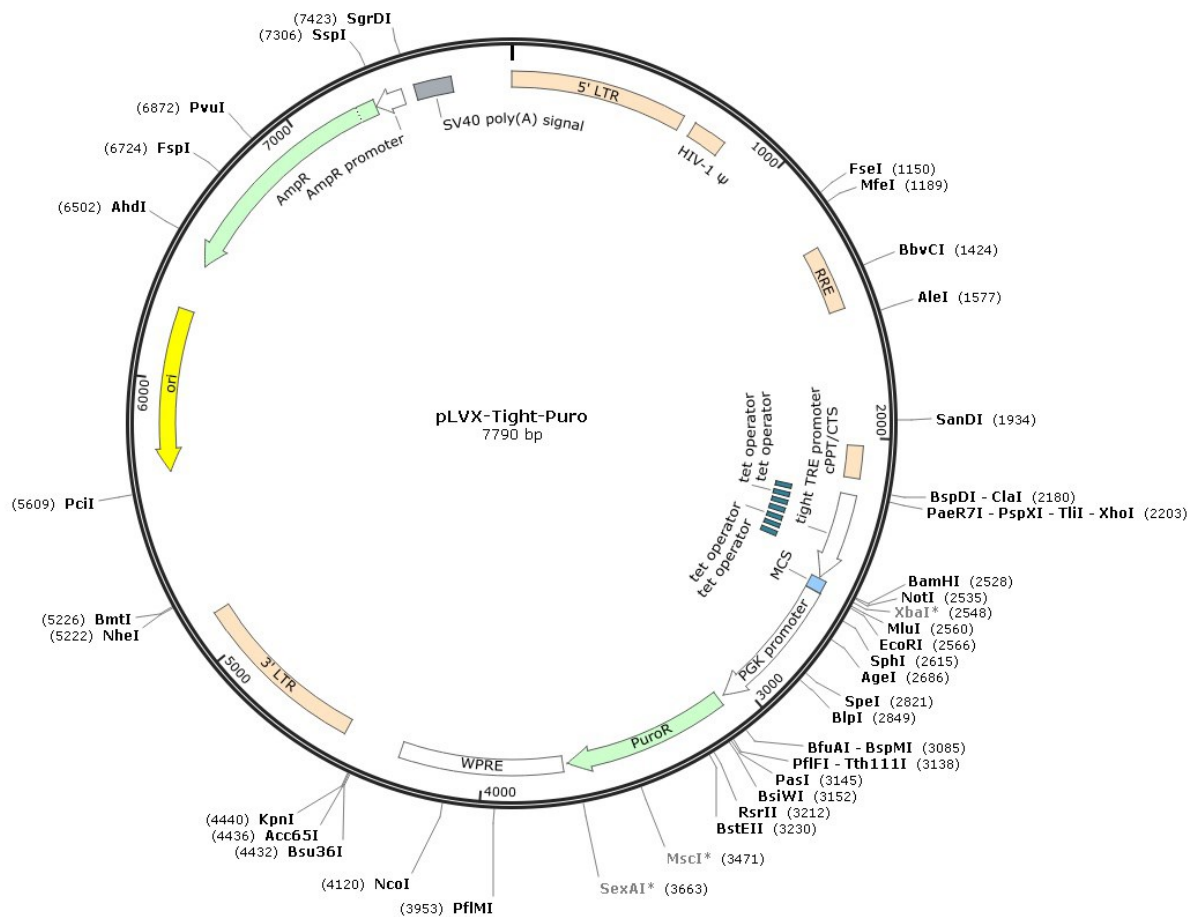
## 10.2 Tabellenverzeichnis

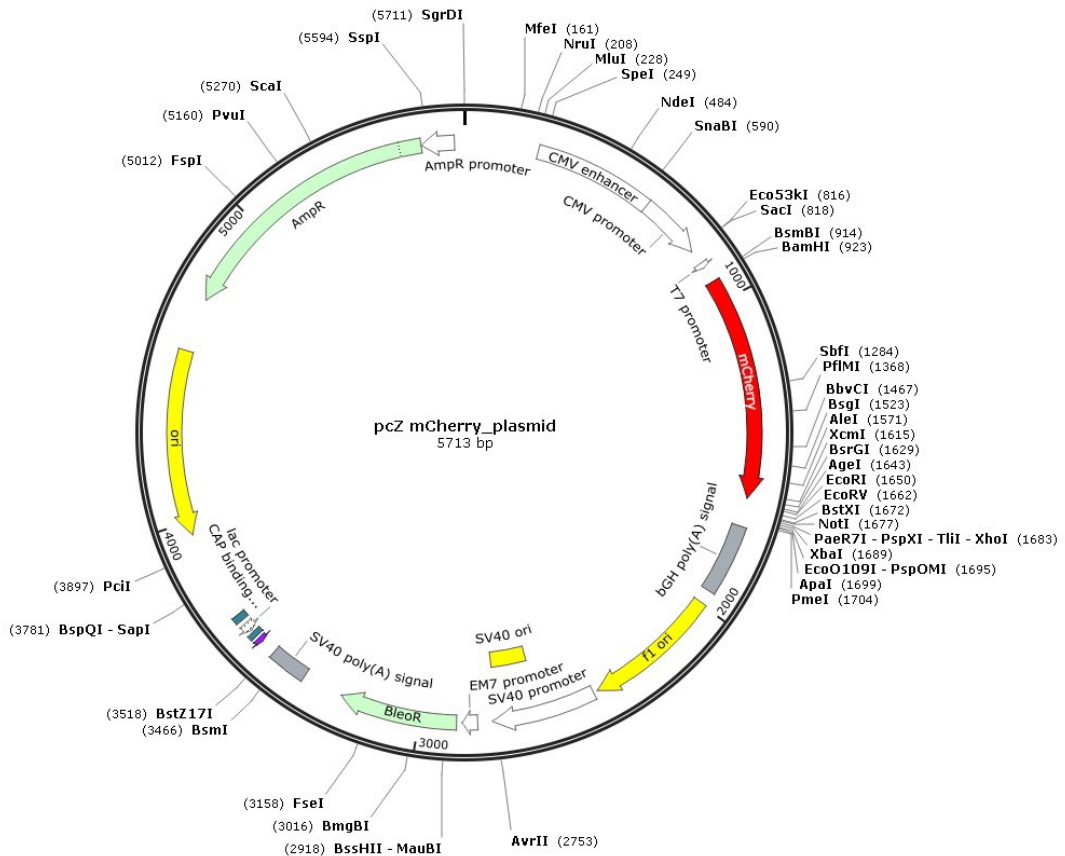
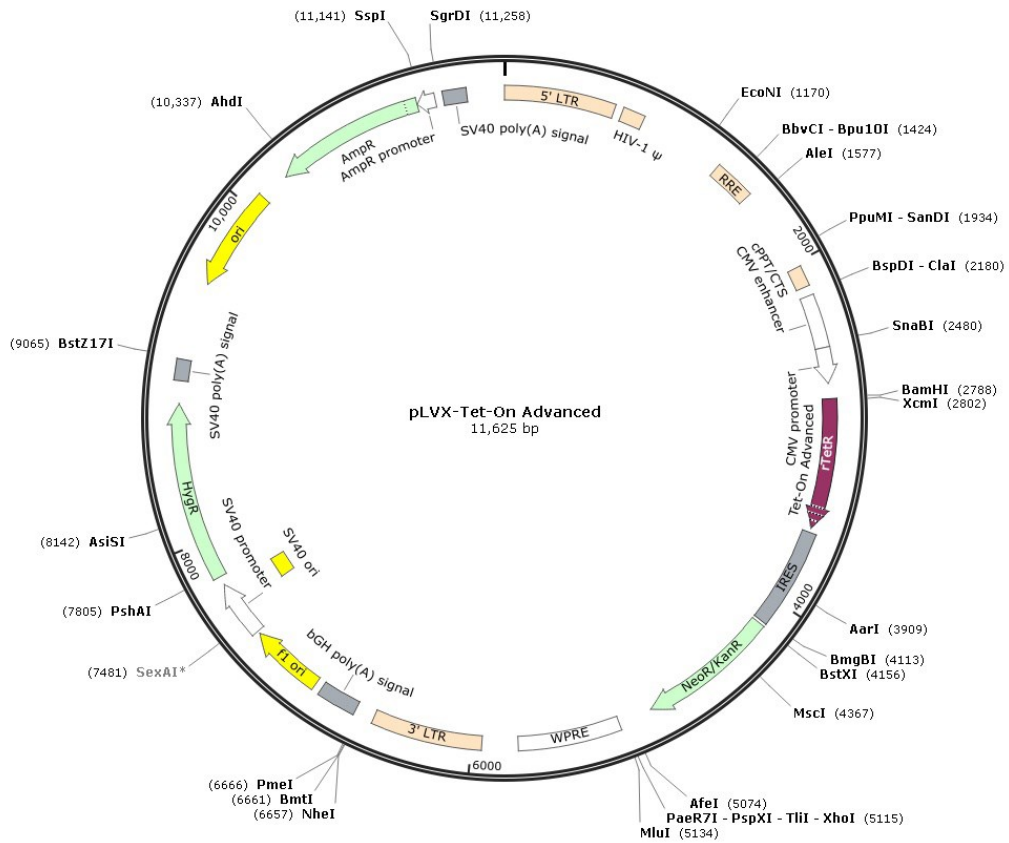
Tabelle 1: Übersicht der Intermediärfilament-Proteinfamilie .....	30
Tabelle 2: Primäre Antikörper.....	49
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper.....	49
Tabelle 4: Klonierungsprimer.....	53
Tabelle 5: Sequenzierprimer.....	54
Tabelle 6: Primer für Echtzeit-PCR.....	54
Tabelle 7: PCR-Mastermix .....	62
Tabelle 8: PCR-Programm .....	63
Tabelle 9: Sequenzspezifische PCR-Bedingungen.....	63
Tabelle 10: Vergleiche der HBsAg-Sekretionssteigerungen durch OA-Behandlungen und zugehörige Signifikanzen.....	110

### 10.3 Plasmidkarten

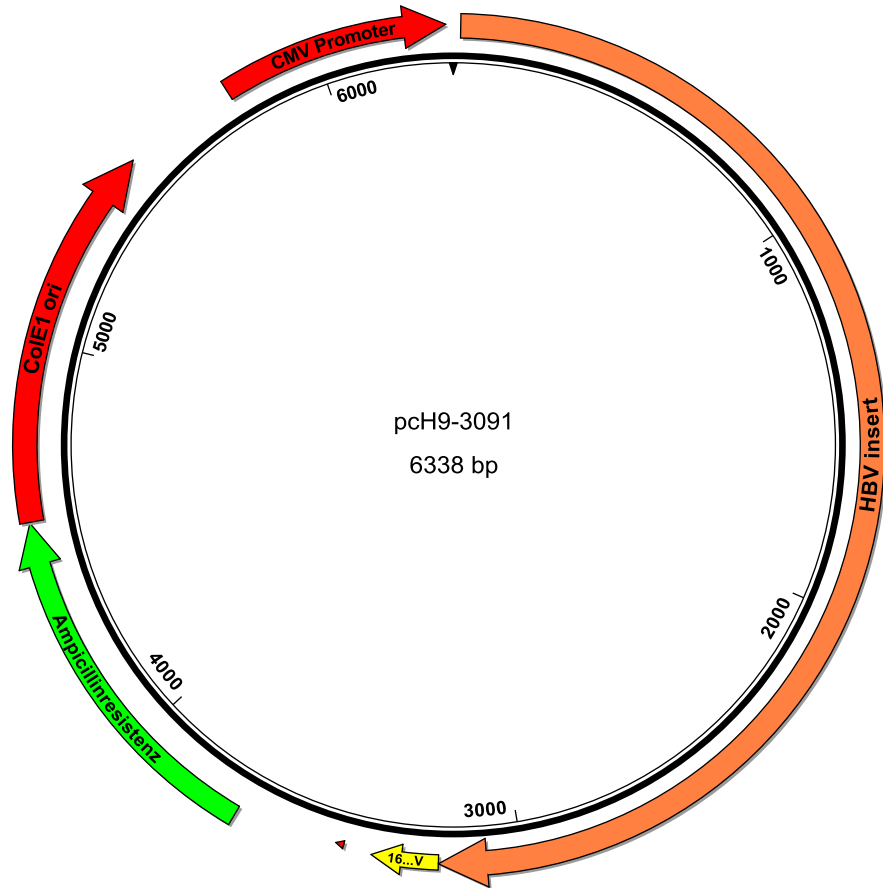
Plasmidkarten für folgende Plasmide befinden sich auf den nächsten Seiten:

- Lentivirales Transferplasmid pLVX Tight-Puro
- Lentivirales Regulator-Plasmid pLVX-Tet-On Advanced
- pcH9-3091-Plasmid (mit HBV-Insert)
- pcZ mCherry Plasmid









## 10.4 Einklonierte Sequenzen der HBV-Oberflächenproteine

Die Sequenzen der HBV-Oberflächenproteine wurden aus dem Plasmid pCH9 3091 mit sequenzspezifischen Primern und angehängten Restriktionsschnittstellen-Sequenzen (Not I und Mlu I) herausamplifiziert und in das lentivirale Transferplasmid pLVX Tight-Puro einkloniert.

### 10.4.1 LHBs/HBx-Insert

5' -

```
ggccgcAGCATGGGGCAGAATCTTCCACCAGCAATCCTCTGGGATTCCTTCCCGACCACCAGTTGGATCCAGCCT
TCAGAGCAAACACCGCAAATCCAGATTGGGACTTCAATCCCAACAAGGACACCTGGCCAGACGCCAACAAAGGTAGG
AGCTGGAGCATTTCGGGCTGGGTTTACACCCACCGCACGGAGGCCCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCATA
CTACAAACTTTGCCAGCAAATCCGCCCTCCTGCCTCCACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGTCTC
CACCTTTGAGAAACTCATCTCAGGCCATGCAGTGGAAATCCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCAG
AGTGAGAGGCCTGTATTTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCCTGTTCTGACTACTGCCTCTCCC
TTATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGGGGACCTGCGCTGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCC
TTCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGAC
TTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCA
ACCTCTTGTCCTCCAACCTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCCTCTTCATCCTGC
TGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTTGTCTCTAATTCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGC
TGTACCAAACCTTTCGGACGGAAATTCACCTGTATTTCCCATCCCATCATCTCGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGG
AGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCAC
TGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCG
CTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTTAAACCCTAACAAAACAAGAGATGGGGTTACTCTCTAAA
TTTTATGGGTATATGTCATTGGATGTTATGGGTCTTGGCACAAGAACAACATCATACAAAAAATCAAAGAATGTTTT
AGAAAATCTCCTATTAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTTGGGTTTTGTGCC
CTTTTACACAATGTGGTTATCCTGCGTTGATGCCTTTGTATGCATGTATTCAATCTAAGCAGGCTTTCACCTTCTC
GCCAACTTACAAGGCCCTTCTGTGTAAACAATACCTGAACCTTTACCCCGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTGC
CAAGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCTTGGTCATGGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACCTTTTCGG
CTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGTCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACATTATCGG
GACTGATAACTCTGTTGTCTATCCCGCAAATATACATCGTTTCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATC
CTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCTGCGGACGACCCTTCTCGGGGTGCTTGGGAC
TCTCTCGTCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCGGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACCGGACTCCCCGTCTGT
GCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACCTTCGCTTACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACCGTGAACGCCACC
AAATATTGCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGGAGGCATACTT
CAAAGACTGTTTGTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGT
AGGCATAAATTTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTTCACCTCTGCCTAATATCATCTCTTGTTCATGTCCTAC
TGTTCAAGCCTCCAAGtgccgc - 3'
```

**ggccgc**: Rest der Not I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

1. **ATG**: Startcodon LHBs-ORF
2. **ATG**: Startcodon SHBs-ORF
1. **TAA**: Stoppcodon SHBs-ORF
3. **ATG**: Startcodon HBx-ORF
2. **TAA**: Stoppcodon HBx-ORF

**tgccgc** : Rest der Mlu I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

Gesamtlänge restringiertes und einkloniertes PCR-Produkt für LHBs+HBx: 2225 bp

Reine LHBs/HBx-Länge: 2170 bp

### 10.4.2 LHBs-Insert

5´ –

**ggccgc**AGC**ATG**GGGCAGAATCTTTCCACCAGCAATCCTCTGGGATTCCTTTCCCGACCACCAGTTGGATCCAGCCTTCAGAGCAAACACCGCAAATCCAGATTGGGACTTCAATCCCAACAAGGACACCTGGCCAGACGCCAACAAGGTAGGAGCTGGAGCATTTCGGGCTGGGTTTCACCCCACCGCACGGAGGCCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCATACTACAAACTTTGCCAGCAAATCCGCCCTCCTGCCCTCCACCAATCGCCAGTCAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGTCTCACCTTTGAGAAACTCATCTCAGGCCATGCACTGGAATTCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTATTTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCCTGTTCTGACTACTGCCTCTCCCTTATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGGGGACCTGCGCTGAAC**ATG**GAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCTCGTGTACAGGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCCCTCCAACCTGTCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCCTTTCATCTCTGTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCACCCACCTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTT**TAA**ACCCTAACAAAACAAAGAGATGGGG**tgccgc** – 3´

**ggccgc**: Rest der Not I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

1. **ATG**: Startcodon LHBs-ORF

2. **ATG**: Startcodon SHBs-ORF

**TAA**: Stoppcodon SHBs-ORF

**tgccgc**: Rest der Mlu I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

Gesamtlänge restringiertes und einkloniertes PCR-Produkt für LHBs: 1209 bp

Reine LHBs-Länge: 1167 bp

### 10.4.3 SHBs-Insert

5´ –

**ggccgc**CAATCTTCTCGAGGATTGGG**ATG**GAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCTCGTGTACAGGC GGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTA GGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCTTGTCTCCAA CTTGTCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCCTTTCATCTCTGCTGTATGCCTCATCTT CTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCCAGGATCCTCAACAACCAGCACG GGACCATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGG ACGGAAAATGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCG TTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCACCCACTGTTTGGCTTTCAGTT ATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCT TTTGTCTTTGGGTATACATTT**TAA**ACCCTAACAAAACAAAGAGATGGGG**tgccgc** – 3´

**ggccgc**: Rest der Not I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

**ATG**: Startcodon SHBs-ORF

**TAA**: Stoppcodon SHBs-ORF

**tgccgc**: Rest der Mlu I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

Gesamtlänge restringiertes und einkloniertes PCR-Produkt für SHBs: 752 bp

Reine SHBs-Länge: 678 bp

## 10.5 Einklonierte mCherry-Sequenz

Die mCherry-Sequenz wurde aus dem Plasmid pcZ mCherry mit sequenzspezifischen Primern und angehängten Restriktionsschnittstellen-Sequenzen (Not I und Mlu I) herausamplifiziert und in das lentivirale Transferplasmid pLVX Tight-Puro einkloniert.

### mCherry-Insert

```
ggccgcCCTACGTCTCATCAGCATGATGGGATCCCACGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGT
TCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCG
CCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTG
TCCCCCTCAGTTTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCT
TCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCGAGTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAG
AAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGC
AGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCCTGCA
GCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAG
TACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAGATCTACCGGTTTGAATTCTGC
AGATATCCAGCACAGTGGtgccgc
```

**ggccgc**: Rest der Not I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

**ATG**: Startcodon mCherry-ORF

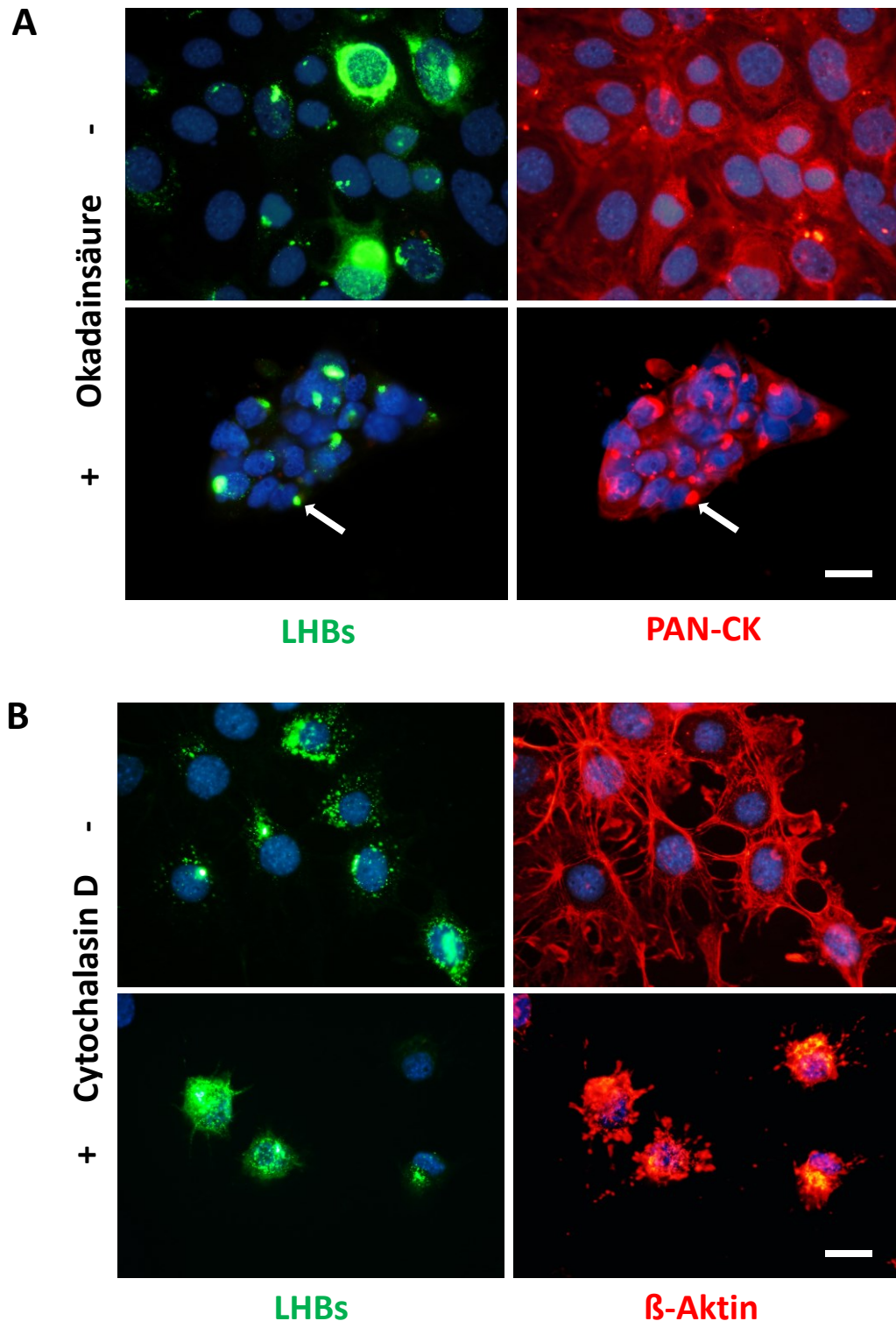
**TGA**: Stoppcodon mCherry-ORF

**tgccgc**: Rest der Mlu I-Restriktionsschnittstellen-Sequenz

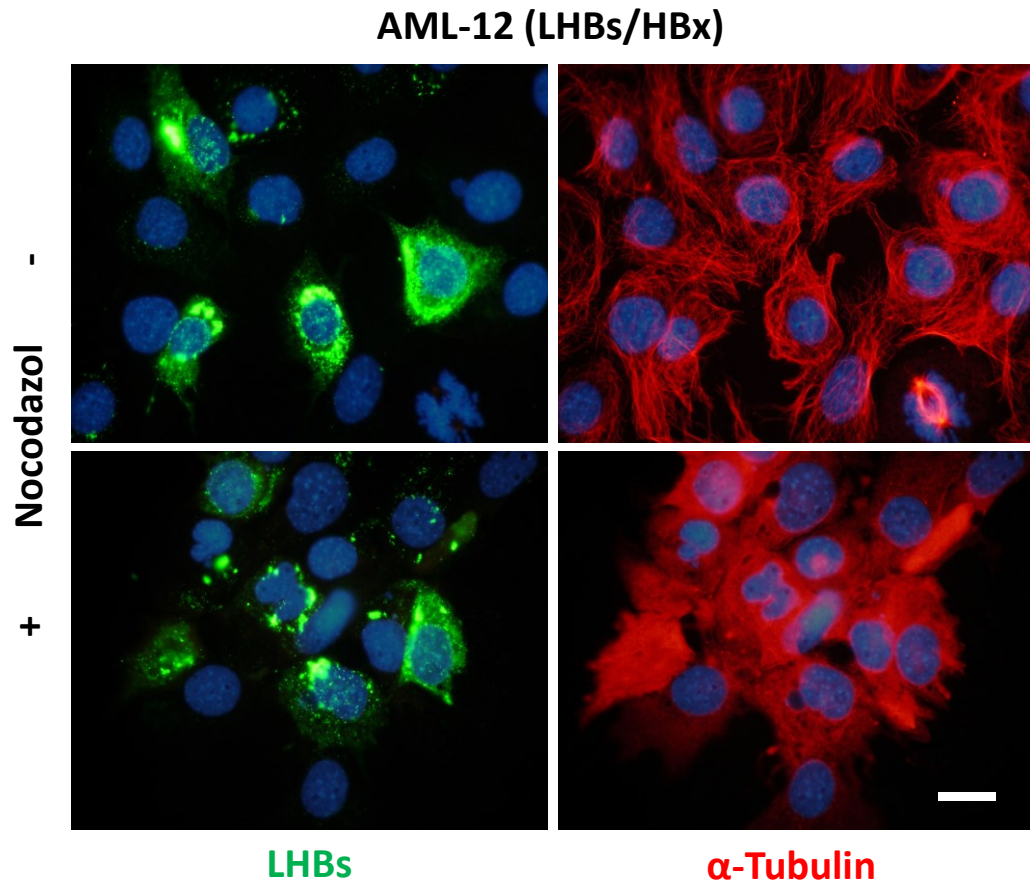
Gesamtlänge restringiertes und einkloniertes PCR-Produkt für mCherry: 784 bp

Reine mCherry –Länge (ORF): 732 bp

## 10.6 Interaktion von LHBs mit dem Zytoskelett bei AML-12-Zellen (LHBs/HBx)

Abbildung 37: Interaktion von LHBs mit Zytokeratinen und  $\beta$ -Aktin bei AML-12-Zellen

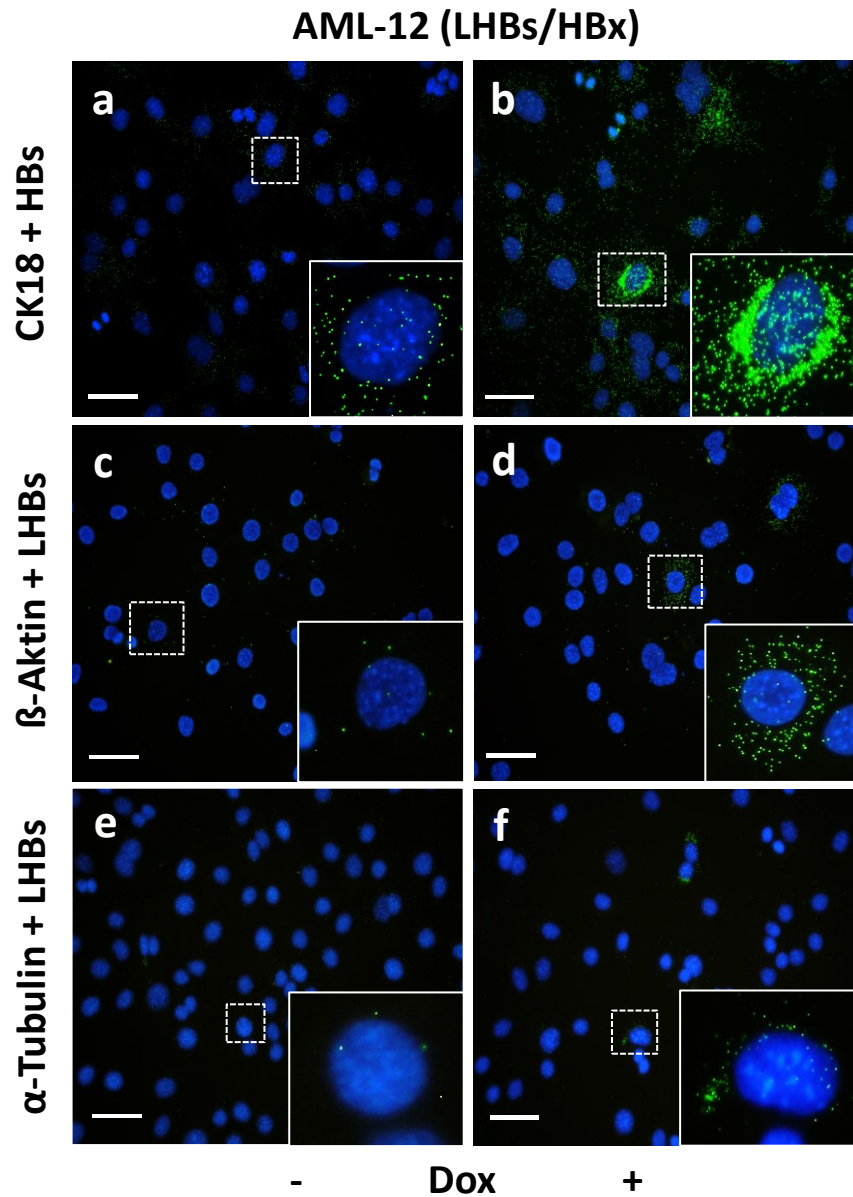
AML-12-Zellen (LHBs/HBx) wurden zur LHBs-Expression 3 d mit Dox (500 ng/ml) und danach mit **(A)**  $\pm$  5 nM OA für 16 h, **(B)**  $\pm$  1  $\mu$ g/ml Cytochalasin D für 2 h behandelt. Es folgten Immun-Doppelfärbungen (IC-IF) auf LHBs (linke Bilder; grün) und **(A)** PAN-CK bzw. **(B)**  $\beta$ -Aktin (jeweils rechte Bilder; rot) Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Fluoreszenzbilder (1000x): Pfeile in **(A)** zeigen den punktuellen und perinukleären Co-Zusammensturz von LHBs und PAN-CK. Messbalken repräsentativ für alle Bilder, 20  $\mu$ m.



**Abbildung 38: Interaktion von LHBs mit  $\alpha$ -Tubulin bei AML-12-Zellen**

AML-12-Zellen (LHBs/HBx) wurden zur LHBs-Expression 3 d mit Dox (500 ng/ml) und danach  $\pm$  2.5  $\mu$ M Nocodazol für 16 h zur Depolymerisierung von Mikrotubuli behandelt. Von fixierten Zellen erfolgten Immun-Doppelfärbungen (IC-IF) auf LHBs (linke Bilder; grün) und  $\alpha$ -Tubulin (rechte Bilder; rot). Zellkern-Färbungen mit DAPI (blau). Dargestellt sind 1000fache Vergrößerungen von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Messbalken repräsentativ für alle Bilder, 20  $\mu$ m.

## 10.7 Proximity Ligation Assay



**Abbildung 39: PLA-Assay zur Analyse von Protein-Kolokalisationen bei AML-12-Zellen**

Fixierte AML-12-Zellen (LHBs/HBx) wurden zunächst mit Primär-Antikörpern gegen die auf Kolokalisation zu testenden Proteine inkubiert und danach der PLA-Assay durchgeführt: (a+b) CK18 und HBs; (c+d)  $\beta$ -Aktin und LHBs; (e+f)  $\alpha$ -Tubulin und LHBs. Dargestellt sind 400fache Vergrößerungen von mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen: Linke Bildseite ohne LHBs-Expression (-Dox); rechte Bildseite mit LHBs-Expression (+Dox). Vergrößerungen von repräsentativen Einzelzellen sind jeweils im Bildausschnitt rechts unten zu sehen. Kernfärbung mit DAPI; Messbalken 50  $\mu$ m.

## 11 Publikationsbeteiligungen und Kongressbeiträge

### 11.1 Publikationsbeteiligungen

#### Projektrelevant:

**Erstautor-Publikation** für mein Hauptprojekt „**Interaction of large hepatitis B surface protein and cytokeratin 8 and 18 influences hepatitis B virus infectivity**“ in Vorbereitung.

Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, Würger T, **Schröder D**, Matono T, Mollenkopf HJ, Montalbano R, Pompaiah M, Reifenberg K, Zahner D, Ocker M, Gerlich W, Glebe D, Roeb E. **Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background.** PLoS One. 2014 Mar 4; 9(3):e90608.

#### Sonstige:

Meier FM, Frommer KW, Peters MA, Brentano F, Lefèvre S, **Schröder D**, Kyburz D, Steinmeyer J, Rehart S, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. **Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis.** J Biol Chem. 2012 Aug 17; 287(34):28378-85.

Frommer KW, Zimmermann B, Meier FM, **Schröder D**, Heil M, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. **Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum. 2010 Oct; 62(10):2886-99.

Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, **Schröder D**, Klues HG, Hanrath P, McKenna WJ. **Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene.** Heart. 2002 Mar; 87(3):270-5.



Jeschke B, Uhl K, Weist B, **Schröder D**, Meitinger T, Döhlemann C, Vosberg HP. **A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated beta-myosin heavy chain genes.** Hum Genet. 1998 Mar;102(3):299-304.

## 11.2 Kongressbeiträge und publizierte Abstracts:

Martin Roderfeld, **Dirk Schröder**, Yury Churin, Dieter Glebe, Elke Roeb. **Cytokeratins 8 and 18 are responsible for intracellular distribution of the large hepatitis B virus surface protein.** AASLD Annual Meeting 2014, Boston, USA (Poster); Hepatology Oktober 2014, Vol. 60, Issue Supplement S1, S. 1014A – 1039A; Poster-Nr. 1728.

**Schröder D.**, Churin Y., Roderfeld M., Glebe D., Roeb E. **Cytokeratins 8 and 18 are responsible for distribution and secretion of hepatitis B virus surface proteins.** GASL-Jahrestagung 01/2014, Tübingen (Vortrag); Z Gastroenterol 2014, Ausgabe 1, Vol. 52, Vortrags-Nr. V\_5\_01.

Graumann F, Churin Y, Roderfeld M, **Schröder D**, Glebe D, Roeb E. 01/2014. **Spontaner Verlust der Expression des HBV-Hüllproteins schützt Alb1-HBV-transgene Mäuse vor Leberschädigung.** GASL- Jahrestagung 01/2014, Tübingen (Poster); Z Gastroenterol 2014; Ausgabe 1, Vol. 52, Poster-Nr. P\_5\_44.

Matono T, Churin Y, Reinhard H, Roderfeld M, **Schröder D**, Zahner D, Glebe D, Roeb E. **Signaling pathways involved in carcinogenesis in a double hit mouse model of cholangiopathy and hepatitis B virus.** GASL- Jahrestagung 01/2014, Tübingen (Poster); Z Gastroenterol 2014; Ausgabe 1, Vol. 52, Poster-Nr. P\_5\_43.

**Schröder D.**, Churin Y., Roderfeld M., Glebe D., Roeb E. **Zytokeratine sind verantwortlich für die intrazelluläre Verteilung von Hepatitis B-Oberflächenproteinen.** DVGS-Jahrestagung 09/2013, Nürnberg (Vortrag); Z Gastroenterol 2013; Ausgabe 08, Vol. 51, Kurzvortrag-Nr. K142.

**Schröder D.**, Churin Y. , Roderfeld M., Glebe D., Roeb E. **Hepatitis B surface antigen induces ER stress.** GASL- Jahrestagung 01/2013, Hannover (Poster); Z Gastroenterol 2013; Ausgabe 08, Vol. 51, Poster-Nr. P\_5\_63.

Churin Y, Würger T, Roderfeld M, Stiefel J, Reifenberg K, Mollenkopf H-J, **Schröder D**, Roberta Montalbano, Ocker M, Glebe D, Roeb E. **Direkte zytotoxische Effekte des Hepatitis B Virus Oberflächenproteins in der Leber.** GASL- Jahrestagung 01/2013, Hannover (Poster); Z Gastroenterol 2013, Ausgabe 08, Vol. 51, Poster-Nr. P\_5\_07.

### **11.3 Nicht publizierte Abstracts und sonstige Kongressbeiträge:**

**Schröder D.**, Churin Y. , Roderfeld M., Glebe D., Roeb E. **Different distribution pattern of hepatitis B surface proteins and their impact on the unfolded protein response in the Huh7 and NIH3T3 cell line.** Konferenz der Gießener Graduierten Schule für Lebenswissenschaften (GGL) 09/2012, Gießen (Poster).

**Schröder, D.**, Roderfeld, M., Roeb, E. **Hepatic carcinogenesis in hepatitis B transgenic mice: Molecular basics and potential therapeutic approaches concerning the cannabinoid receptor CB1.** Konferenz der Gießener Graduierten Schule für Lebenswissenschaften (GGL) 09/2011, Gießen (Poster).

## 12 Danksagung

**Frau Prof Dr. med. Elke Roeb** möchte ich für die Möglichkeit, dieses sehr interessante Promotionsthema bearbeiten zu können und der Begutachtung der Promotionsarbeit als Zweitbetreuerin danken.

**Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Martin** danke ich für die kurzfristige Übernahme der Erstbetreuung und Begutachtung der Promotionsarbeit.

Bei **Frau Prof. Dr. rer. nat. Annegret Wilde** möchte ich mich für die vorherige Erstbetreuung bedanken.

**Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld** danke ich insbesondere für die Vermittlung der bei den Kooperationspartnern stattgefundenen Experimente und die konstruktiven Arbeitsbesprechungen.

**Herrn Dr. rer. nat. Yuri Churin** danke ich für die Initiierung des Promotionsthemas, wertvollen Gedanken und Vorschläge zu Experimenten und seine wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt ebenfalls den **Kooperationspartnern**, insbesondere **Herrn PD Dr. Dieter Glebe** von der Medizinischen Virologie, JLU Gießen für die Möglichkeit sämtliche S2-Arbeiten in seinem Labor durchzuführen. Vielen Dank für die Bereitstellung der Plasmide, Antikörper, Hepatitis B Viren, primären Tupaia-Hepatozyten, etc. Vielen Dank auch an seine **Mitarbeiter** für die fachliche Unterstützung.

**Herrn Dr. Oleg Pak** von der AG Herr Prof. Norbert Weißmann, JLU Gießen möchte ich für die Durchführung der konfokalen Mikroskopie danken.

**Frau Dr. Monika Burg-Roderfeld** von der AG Frau Prof. Mazurek, Institut für Veterinär-Physiologie und Biochemie, JLU Gießen danke ich für die Anleitung und Mithilfe bei der Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie.

**Herrn Prof. H.P. Dienes** vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Köln, danke ich für die zur Verfügung gestellten Leberschnitte von HBV-Patienten.

Vielen Dank auch an meine **Eltern und Brüder** für ihre Unterstützung während der Promotion und meines Lebens.

### **13 Eidesstattliche Erklärung**

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

---

Dirk Schröder