

**Veränderte Transkriptionsregulation des Hepatitis B Virus bei
einer Variante mit einer 8-Basenpaar-Deletion im Core-Promotor**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Silke Faina Fischer
aus Stuttgart**

Gießen 2000

**Aus dem Medizinischen Zentrum für
Medizinische Mikrobiologie und Virologie**

Institut für Medizinische Virologie

Leiter: Prof. Dr. Gerlich

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. Bein

Tag der Disputation: 26. April 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis B Virus	1
1.2	Transkriptionsprodukte und Promotoren des Hepatitis B Virus	4
1.3	Varianten des Hepatitis B Virus	6
1.4	Varianten im Bereich des HBV Core-Promotors	7
1.5	Ziel der Arbeit	9
2	Material	10
2.1	Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Verbrauchsmaterialien, Geräte	10
2.2	Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen	10
2.3	Primer für Plasmidkonstruktionen	11
2.4	Antikörper	11
2.5	DNA-Längenstandards	11
2.6	Zelllinien	12
2.7	Bakterienstämme	12
2.8	Plasmide	12
2.8.1	pcDNA3CAT	12
2.8.2	pBLCAT2	12
2.8.3	pGL2 Luciferase Control	13
2.8.4	pSyn06TLuc	13
2.8.5	pH44TLuc	13
2.8.6	pBluescript SK II+	13
2.8.7	prcCMV	13
2.8.8	prcCMV/HNF4	13
2.8.9	RVP16	13
2.8.10	COUP-TF1	14
2.8.11	Plasmid Moe86 und Moe102	14
2.8.12	pKoeX43 und pMoeX2/1	14
2.8.13	pLuci3	14
2.8.14	pGL2	14
2.8.15	pcX+	14
2.8.16	pcX-	15

3 Methoden	16
3.1 Zellkultur	16
3.1.1 Medien	16
3.1.2 Auftauen	16
3.1.3 Kultivierung und Passagieren	17
3.1.4 Konservierung	17
3.1.5 Zellzahlbestimmung	17
3.2 Klonierung	17
3.2.1 Puffer und Medien	17
3.2.2 Restriktionsverdau	18
3.2.3 Agarosegelelektrophorese	19
3.2.4 Elution von DNA aus Agarose und Reinigung mit GeneClean®	19
3.2.5 Dephosphorylierung von 5'-Enden	20
3.2.6 Ligation und Transformation	20
3.2.7 Analytische Plasmid-Präparation	20
3.2.8 Maxipräparation	21
3.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA	21
3.3 Polymerase Chain Reaktion (PCR)	22
3.4 Gelretardationsanalyse	23
3.4.1 Beschreibung der Methode	23
3.4.2 EMSA-Puffer	23
3.4.3 Herstellung des Kernextraktes	24
3.4.4 Radioaktive Primermarkierung	25
3.4.5 Gießen des Polyacrylamidgeles	25
3.4.6 Bindungsreaktion	26
3.4.7 Elektrophorese	26
3.5 Transfektion von Reportergenen	27
3.5.1 Zellausplattierung	27
3.5.2 Transfektion mit Lipofectamine™	27
3.5.3 Zellernte	27
3.5.4 Bestimmung der in den Zellysaten enthaltenen Proteinmenge	28

3.6 Messung der CAT-Aktivität	29
3.7 Messung der Luciferase-Aktivität	29
3.7.1 Puffer	29
3.7.2 Testdurchführung	30
4 Ergebnisse	31
4.1 Übersicht über die Elemente Enhancer II, PräC- und Core-Promotor	31
4.2 Konstruktion von Plasmiden	32
4.2.1 Klonierung des kompletten HBx-ORF	32
4.2.2 Klonierung des EnhII/Core-Promotors in ein CAT-Reportergen	33
4.2.3 Klonierung des LHBs-Promotors als bekannte HNF1-Bindungsstelle in ein CAT-Reportergen	34
4.2.4 Klonierung des PräC-Promotors in ein Luciferase-Reportergen	34
4.2.5 Klonierung des Core-Promotors in ein Luciferase-Reportergen	35
4.3 Auswirkung der 8-bp-Deletion auf die CAT-Expression	36
4.3.1 Austesten der Aktivität der Vektoren pBLCAT2-wt-EnhII und pBLCAT2-del-EnhII	36
4.3.2 Einfluß von HNF1 und HNF4 auf den Enhancer II	37
4.4 Auswirkung der 8-bp-Deletion auf die Luciferase-Expression	39
4.4.1 Austesten der Aktivität der Vektoren pSyn06TLuc und pH44TLuc	39
4.4.2 Vergleich der Transaktivierung des SV40-Enhancers durch wt-HBx bzw. del-HBx	40
4.4.3 Messung der Grundaktivität der Konstrukte des PräC-Promotors	41
4.4.4 Einfluß der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1 auf die Aktivität des Wildtyp und Varianten PräC-Promotors	42
4.4.5 Messung der Grundaktivität der Konstrukte des Core-Promotors	45
4.4.6 Einfluß der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1 auf die Expression von Wildtyp und Varianten Core-Promotor	46
4.5 Bindung von HNF1 an die Oligonukleotide mit und ohne 8-bp-Deletion	49
4.5.1 EMSA1 mit den Oligonukleotiden Wildtyp Pos. 1756-1778 und der 8-bp-Deletion Pos. 1763-1770	50
4.5.2 EMSA2 als Kompetitionsversuch an radioaktiv markiertem HNF1-Oligo durch nicht markiertes Varianten-, Wildtyp- und HNF1-consensus-Oligo	52

5	Diskussion	54
5.1	Funktion des HBx-offenen-Leserahmens	54
5.2	Basisaktivität von transkriptionellen Elementen des Wildtyp-Genoms und der Deletionsvariante	55
5.3	Effekte der Transkriptionsfaktoren HNF1 und HNF4 auf die Aktivität des Wildtyp- und Varianten-Enhancer II	56
5.4	Untersuchung einer HNF1-Bindungsstelle im EMSA	57
5.5	Einfluß des Transkriptionsfaktors COUP-TF1	58
5.6	Effekt der 8-bp-Deletion auf die Transkription und Replikation	62
6	Zusammenfassung	64
7	Literatur	65

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört einer Gruppe von Viren an, die aufgrund ihres Lebertropismus (Nowoslawski et al., 1972; Johnson et al., 1978; Mason et al., 1980) und ihres DNA-Genoms als Hepadnaviren bezeichnet werden. Durch ähnliche Merkmale in der Epidemiologie, des Infektionsverlaufes, der molekularen Struktur und der hohen Wirtsspezifität werden dieser Familie weitere Viren zugeordnet (Robinson, 1980; Robinson et al., 1982; Gust et al., 1986). So wurden als Säuger-Hepadnaviren das Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) des nordamerikanischen Waldmurmeltiers (*Marmota monax*; Summers et al., 1978) sowie das Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV) des Erdhörnchens der amerikanischen Westküste (*Spermophilus beecheyi*; Marion et al., 1980) identifiziert. Zu den Avihepadnaviren, die bei ähnlicher Größe, Genomorganisation und Replikationszyklus kein mittleres Hüllprotein aufweisen (Schödel et al., 1989), gehören das Duck Hepatitis B Virus (DHBV) der Pekingente (*Anas Domesticus*; Mason et al., 1980) und das Heron Hepatitis B Virus (HHBV) des Graureihers (*Adrea cinerea*; Sprengel et al., 1988). Neben diesen gut untersuchten Virusarten wurden Hepadnaviren noch bei Primaten bzw. anderen Vogelarten gefunden.

Da virale Hepatitiden weltweit zu den am häufigsten beobachteten Infektionskrankheiten gehören, ist das Interesse an der Erforschung des Hepatitis B Virus sehr groß. Mit dem Hepatitis B Virus sind etwa 350 Millionen Menschen chronisch infiziert, schwerpunktmäßig im tropischen Teil Afrikas und im ostasiatischen Raum (Szmuness et al., 1978). Das Virus zeigt ein breites Spektrum klinischer Symptome, die vom inapparenten Krankheitsverlauf mit Ausheilung über eine stille Infektion ohne serologische HBV-Marker bis hin zur akuten bzw. fulminanten Infektion mit Leberversagen reichen. Patienten mit persistierender aktiver Hepatitis B weisen ein erhöhtes Risiko auf, eine Leberzirrhose zu entwickeln. Auch die Entwicklung eines hepatocellulären Carcinoms (HCC), das mit einer geschätzten Inzidenz von 500000 bis 1 Million pro Jahr eine der häufigsten Krebsarten der Welt darstellt (Popper, 1988), ist bei chronischen HBV-Trägern 100- bis 200-fach häufiger als in nicht infizierten Populationen (Beasley et al., 1981; Fattovich et al., 1988). Dabei stellt HBV eine Hauptursache für die Entstehung des HCCs dar.

Das Wildtyp-HBV selbst ist nicht cytopathogen. Die ausgelöste Hepatitis wird als immunologische Antwort des Organismus verstanden (Chisari et al., 1995). Antikörper werden gegen alle Virusproteine, das große (LHBs), das mittlere (MHBs) und das kleine virale

Oberflächenprotein (SHBs), sowie gegen das virale Nukleokapsid (HBcAg), das e-Antigen (HBeAg), das P-Protein und das X-Protein (HBx) gebildet. Die zelluläre Immunantwort bei akuter Hepatitis ist für die Ausheilung wichtig, während sie bei chronischer Infektion nahezu vollständig fehlt (Ferrari et al., 1990; Rehermann et al., 1995).

Die animalen Hepadnaviren haben eine ähnliche Virusstruktur (Abbildung 1.1). Das Virion ist ein sphärisch geformtes Partikel mit einem Durchmesser von 45 nm in der Negativkontrast-Elektronenmikroskopie (Dane et al., 1970). Die äußere Virushülle (Hepatitis B surface Antigen, HBsAg) besteht hauptsächlich aus viralen Proteinen und Glycoproteinen und relativ wenig Lipid. Innerhalb der Virushülle befindet sich der ca. 30 nm große ikosaedrische Innenkörper, auch Nukleokapsid oder Core genannt (Almeida et al., 1971). Das Nukleokapsid besteht aus Core-Dimeren (Seifer et al., 1993) und enthält bei reifen Hepatitis B Viren außer der partiell doppelsträngigen viralen DNA (Robinson und Greenman, 1974) auch die virale Polymerase (Kaplan et al., 1973; Robinson und Greenman, 1974) und die zelluläre Proteinkinase C (Kann et al., 1993).

Hepatitis B Virus

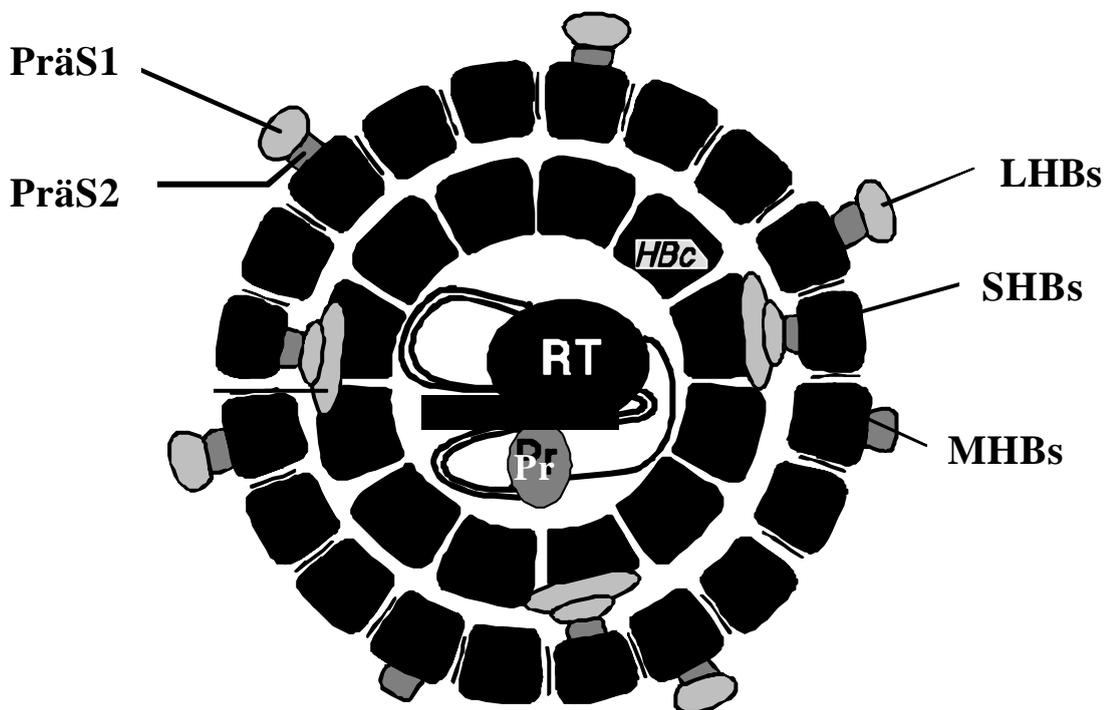


Abbildung 1.1: Struktur des Hepatitis B Virus. Dargestellt sind die Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs mit ihren PräS1- und PräS2-Domänen, das HBcAg, die reverse Transkriptase (RT) und das terminale Protein (Pr) am 5'-Ende der 3,2 kb (-)-Strang-DNA (aus Gerlich, 1993).

Die Genomorganisation der Säuger-Hepadnaviren ist sehr ähnlich (Abbildung 1.2). Die 3,2 kb lange DNA (Tiollais et al., 1981) liegt als zirkuläres und partiell doppelsträngiges Molekül vor (Summers et al., 1975). Die beiden DNA-Stränge sind nicht kovalent geschlossen. Der Plusstrang ist unvollständig, der Minusstrang besitzt an seinem 5'-Ende ein kovalent gebundenes terminales Protein (Gerlich und Robinson, 1980), die virale Polymerase (Bartenschlager und Schaller, 1988). Die zirkuläre Konfiguration des DNA-Moleküls wird durch Basenpaarung zwischen dem Minusstrang und dem Plusstrang ermöglicht (Charnay et al., 1979; Sattler und Robinson, 1979; Siddiqui et al., 1979; Dejean et al., 1984; Summers, 1984; Will et al., 1987).

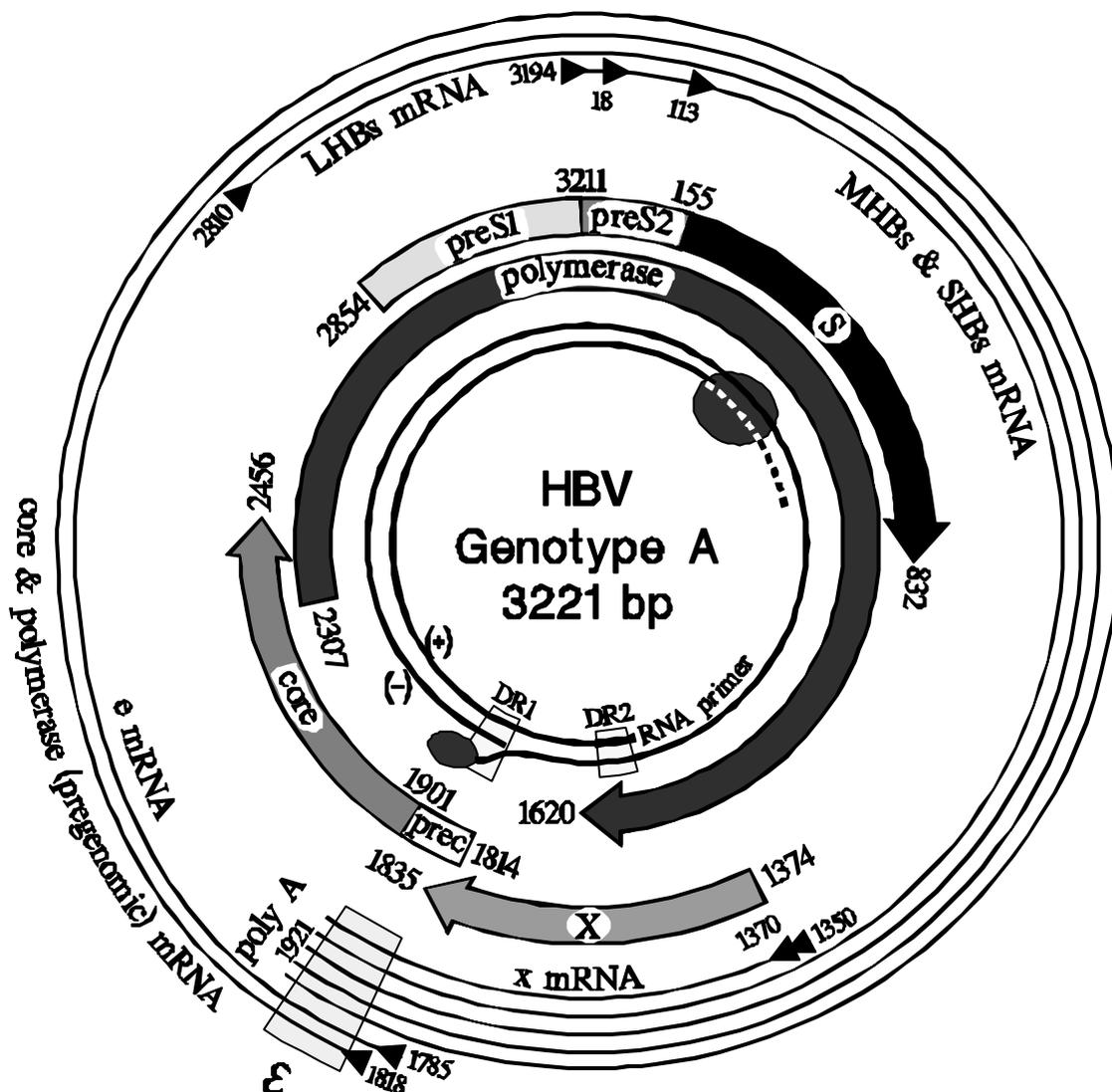


Abbildung 1.2: Genomorganisation des Hepatitis B Virus. Dargestellt ist das virale Genom mit der viralen Polymerase und der Primase, die verschiedenen auf ihm lokalisierten offenen Leserahmen und die von ihnen transkribierten Messenger-RNAs (aus Kann und Gerlich, 1998).

Das Genom beinhaltet vier offene Leserahmen (ORF), die sich teilweise überlappen und alle auf dem Minusstrang kodiert sind. Der größte offene Leserahmen kodiert für die virale Polymerase, deren unterschiedliche Domänen als terminales Protein (Primase), reverse Transkriptase bzw. DNA-abhängige DNA-Polymerase und Ribonuklease H fungieren. Ein anderer Leserahmen mit zwei verschiedenen Startcodons dient für die Kodierung des HBcAg und des HBeAg. Die Virushülle besteht aus den Oberflächenantigenen (HBsAg), welche von einem weiteren Leserahmen kodiert werden. Die Startcodons für LHBs, MHBs und SHBs liegen im gleichen Leseraster. Der letzte und kleinste ORF der animalen Hepadnaviren kodiert für das HBx (Meyers et al., 1986). Die Rolle des HBx ist noch weitgehend ungeklärt. Beschrieben wurden eine Vielzahl regulatorischer Funktionen in der transkriptionellen Aktivierung zellulärer und viraler Gene. Dabei wirkt das X-Protein als indirekter Transkriptionsaktivator, der zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren über Protein-Protein-Wechselwirkungen interagiert und durch die Proteinkinase C die zelluläre Signaltransduktion aktiviert (Tsu und Schloemer, 1987; Zahm et al., 1988; Colgrove et al., 1989; Koike et al., 1989; Kekulé et al., 1993). Versuche mit Mutationen im HBx-Bereich legen nahe, daß das HBx-Protein nach der Transfektion permanenter Zellkulturen *in vitro* entbehrlich für die Virusproduktion ist (Blum et al., 1992). Dagegen ruft jedoch die Transfektion von WHV-DNA ohne funktionellen HBx-ORF in die Leber von Waldmurmeltieren keine Infektion hervor, was somit zeigt, daß HBx für die Replikation *in vivo* notwendig ist (Chen et al., 1993; Zoulim et al., 1994). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß das HBx-Protein die Transkription vieler Gene durch die Transaktivierung von Promotoren aktiviert (Übersicht bei Rossner et al., 1992). HBx interagiert mit Proteinen im Zellkern und Cytoplasma, die unter anderem in zelluläre Prozesse wie Proteolyse, Transkription, Regulation des Zellzyklus und DNA-Reparatur eingebunden sind (Maguire et al., 1991; Feitelson et al., 1994; Takada et al., 1994; Fischer et al., 1995; Lee et al., 1995; Haviv et al., 1996; Huang et al., 1996; Lin et al., 1997).

1.2 Transkriptionsprodukte und Promotoren des Hepatitis B Virus

In HBV-infizierten Hepatocyten lassen sich vier virale Haupttranskripte nachweisen (Abbildung 1.2). Die Transkription dieser viralen RNAs beginnt an verschiedenen Startpunkten auf der DNA, sie enden jedoch alle an einem gemeinsam genutzten Polyadenylierungssignal. Die übergeordnete

Steuerung erfolgt von vier verschiedenen Promotoren, diese sind der PräC/Core-, der PräS1-, der PräS2/S und der X-Promotor.

Die viralen Transkripte werden in genomische und subgenomische RNAs eingeteilt. Die genomischen RNAs besitzen mit 3,5 kb mehr als eine Genomlänge (3,2 kb) und sind terminal redundant. Man unterscheidet aufgrund der heterogenen 5'-Enden zwei Klassen. Die längere präC-mRNA startet 29 Nukleotide vor dem PräC-Startcodon und weist gegenüber der kürzeren ein zusätzliches Startcodon auf. Von dieser RNA wird das HBe-Protein translatiert. Die etwas kürzere Core-mRNA beginnt 4 Nukleotide nach dem PräC-ATG und enthält dadurch nur das Core-Startcodon. Sie dient zum einen als Matrize zur Synthese des HBc-Proteins und der viralen Polymerase, zum anderen als Core-mRNA für die Synthese des genomischen Minus-DNA-Stranges. Eine Übersicht über die verschiedenen Elemente ist in Abbildung 1.3 als auch im Ergebnisteil in Abbildung 4.1 gegeben.

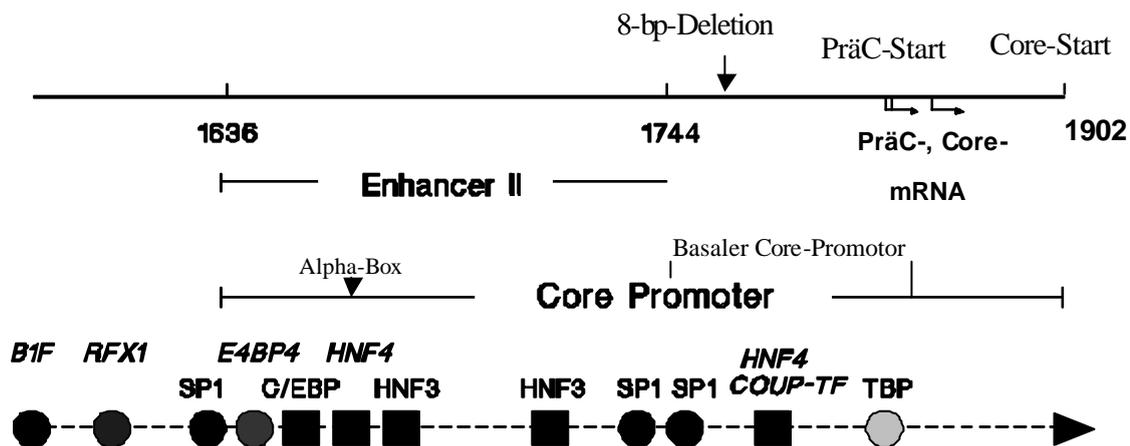


Abbildung 1.3: Bindungsstellen für Mitglieder der Kernrezeptorfamilie im Bereich des PräC-Promotors, des Core-Promotors und des Enhancer II.

Der Core-Promotor liegt 50 Nukleotide vor dem Start des Core-Gens und ist leberspezifisch. Er umfaßt Bindungsstellen für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie, wie den heptonukleären Faktor 4 (HNF4) und COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1) (Raney et al., 1997; Yu und Mertz, 1997). In ihm kann der basale Core-Promotor (BCP) von Pos. 1744-1851 abgegrenzt werden. Er ist für die leberspezifische Aktivität des Core-Promotors (Zhang und McLachlan, 1994) wichtig, der die Transkription der PräC- und Core-mRNA steuert.

Die subgenomischen mRNAs codieren für die viralen Oberflächenproteine und das X-Protein. Der für das LHBs zuständige SPI-Promotor ist hoch leberspezifisch und gilt als der schwächste im HBV-Genom. Er benötigt zu seiner Aktivierung den leberspezifischen Transkriptionsfaktor HNF1 (Courtois et al., 1988). Das MHBs und SHBs stehen unter der Kontrolle des PräS2/S-Promotors (SPII-Promotor), der nicht leberspezifisch ist. Die kleinste subgenomische mRNA kodiert für das X-Protein und wird vom X-Promotor aus reguliert.

Weiterhin enthält das HBV-Genom zwei Enhancer: Der Enhancer I (EnhI), der vor dem X-Gen liegt, verstärkt die Expression des X-Gens und vor allem die des Core-Gens (Antonucci und Rutter, 1989). Der Enhancer II (EnhII) liegt stromaufwärts vom Core-Promotor im Leseraster des X-Proteins und wird auch als stromaufwärts gelegene regulatorische Sequenzen (URS) (Yuh et al., 1992) bezeichnet. Ein wichtiger Bestandteil dieses Bereiches ist die Alpha-Box (Pos.1646-1668), die CCAAT/Enhancer-bindendes-Protein α (C/EBP α) oder mit diesem im Zusammenhang stehende Transkriptionsfaktoren bindet (Lopez-Cabrera et al., 1990; Yuh und Ting, 1993). Der EnhII verstärkt die Expression des Core-, S- und X-Gens (Yee et al., 1989). Während der Enhancer I nicht nur durch leberspezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert wird, bindet der Enhancer II nur Transkriptionsfaktoren, die für die Leber spezifisch sind (Yuh et al., 1992). Für die leberspezifische Expression der HBV-Gene ist vermutlich die kombinierte Aktivität der beiden Enhancer verantwortlich.

Allgemein sind Promotoren Bereiche, die eine Erkennungs- und Bindungsstelle für RNA-Polymerasen darstellen und die Transkription bestimmter mRNAs regulieren. Sie befinden sich stromaufwärts in der Nähe des Starts der mRNAs. Der Core-Promotor speziell ist für die Transkription der Core- und PräC-mRNA verantwortlich. Dabei können der PräC- und Core-Promotor in ihrer Funktion nur artefiziell getrennt werden (Yu und Mertz, 1996). Dagegen ist die Funktion von Enhancern weitreichender als die von Promotoren. Sie können bis zu mehreren Kilobasenpaaren stromauf oder -abwärts eines Promotors liegen und auf mehrere Promotoren Einfluß nehmen. Der Enhancer II im Bereich des X-Gens aktiviert die Expression sowohl des Core-Gens als auch des S- und X-Gens.

1.3 Varianten des Hepatitis B Virus

Hepatitis B Virus-Träger können sowohl stark unterschiedliche Krankheitsbilder als auch verschieden hohe HBV-DNA-Titer im Serum aufweisen. Dabei können hohe Titer als auch niedrige Titer mit stiller Hepatitis ohne Krankheitserscheinungen einhergehen.

In hochvirämischen HBV-Trägern werden bis zu 10^{13} Viruspartikel am Tag produziert. Geht man von einer Fehlerrate der reversen Transkriptase von $1:10^4$ - 10^5 aus (Roberts et al., 1988), so könnten täglich 10^9 Genome mit einer neu aufgetretenen Mutation gebildet werden. Punktmutationen werden häufig während der reversen Transkription beobachtet. Deletionen im HBV-Genom entstehen zusätzlich beim Spleißen der Core-RNA (Su et al., 1989; Suzuki et al., 1989), durch Topoisomerase I Spaltung oder Ligation von HBV-DNA (Wang und Rogler, 1991). Dies tritt auch während nicht homologer Rekombination von linearer HBV-DNA, die bei aberranter Genomreplikation entsteht (Yang und Summers, 1995; Yang et al., 1996), auf.

Spontane Veränderungen an mehreren Positionen des HBV-Genoms werden häufiger bei gleichzeitiger Infektion eines Patienten mit stark verschiedenen HBV-Genomen, Genomtypen und Subtypen beobachtet (Tran et al., 1991; Günther et al., 1992; Kremsdorf et al., 1996; Bahn et al., 1997; Gerner et al., 1998) als nach Neumutationen.

Die so entstandenen Varianten können entweder eine selbständige Replikation aufweisen, auf die Verbindung mit einem Wildtyp-Virus oder partiell defekten Virus angewiesen sein oder komplett defekt und somit unfähig zur Replikation sein.

HBV-Genome von Patienten, die durch nosokomiale Hepatitis B Ausbrüche infiziert wurden, haben nahezu homologe Genome (Repp et al., 1993, [a]; Yusof et al., 1994; Asahina et al., 1996; Hardie et al., 1996).

1.4 Varianten im Bereich des HBV Core-Promotors

Laskus et al. (1994, [b]) stellten fest, daß natürlich vorkommende HBV-Varianten des PräC-Promotors den HBx-ORF beeinflussen und somit zu einer möglichen Reduktion der Transkription führen. Mutationen im Core-Promotor haben einen negativen Effekt auf die Expression von HBeAg (Buckwold et al., 1996; Günther et al., 1996; Scaglioni et al., 1997), das möglicherweise notwendig ist, um eine chronische Infektion durch HBV hervorzurufen (Milich et al., 1990). HBx ist dabei gehäuft von Mutationen betroffen (Kidd-Ljunggren et al., 1997).

Innerhalb des Core-Promotors können verschiedenartige Mutationen unterschieden werden, die sich in struktureller, funktioneller und epidemiologischer Weise unterscheiden. Der Großteil findet sich im Bereich der Bindungsstelle des Core-Promotors, der kleinere Teil beeinflusst die URS. Die häufigste Mutation im Core-Promotor ist ein A nach T Basenaustausch an Pos. 1762, kombiniert mit einem Basenaustausch von G nach A an Pos. 1764.

Fünf weitere, jedoch seltener auftretende Mutationen im Bereich der Bindungsstelle des Core-Promotors konnten isoliert werden: Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Deletion der Nukleotide 1763-1770 erzeugt eine schwache Bindungsstelle für HNF1 (Günther et al., 1996). Desweiteren werden Insertionen und Deletionen, kombiniert mit Punktmutationen gefunden (Günther et al., 1996; Pult et al., 1997), die starke HNF1-Bindungsstellen darstellen, Punktmutationen oder Insertionen, die Ähnlichkeit mit HNF3-Bindungsstellen zeigen, Deletionen, die keinerlei Ähnlichkeit zu Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aufweisen und Punktmutationen an Pos. 1766 und 1768. Diese selteneren Varianten produzieren im Vergleich zum Wildtyp weniger PräC-mRNA und HBeAg in der Zellkultur (Günther et al., 1996; Moriyama, 1997; Scaglioni et al., 1997), zeigen jedoch erhöhte Transkription von Core-mRNA (Baumert et al., 1996; Günther et al., 1996; Moriyama, 1997), was ein Grund für die gesteigerte Replikation ist (Baumert et al., 1996; Günther et al., 1996; Moriyama, 1997; Pult et al., 1997; Scaglioni et al., 1997). Bei Vorliegen einer HNF1-Bindungsstelle sind sowohl Transkription als auch Replikation erhöht (Günther et al., 1996; Pult et al., 1997). Die Selektion der selteneren Core-Promotor-Varianten ist noch nicht geklärt, sie steht möglicherweise im Zusammenhang mit ihrer reduzierten HBeAg-Synthese.

Durch die Überlappung des Core-Promotors mit dem X-Gen beeinflussen die Core-Promotor-Varianten häufig die Struktur und somit auch die Funktion des X-Proteins. Nahezu alle Deletionen und Insertionen im Core-Promotor verschieben den X-Gen-Leserahmen und führen dann zu der Produktion von verkürzten X-Proteinen mit verändertem C-terminalen Bereich, der für die Transaktivierung und die Interaktion mit zellulären Proteinen wichtig ist (Arii et al., 1992; Runkel et al., 1993; Fischer et al., 1995; Huang et al., 1996). Dieses verkürzte X-Protein ist dann jedoch nicht mehr in der Lage, Apoptose zu induzieren. In WHV ist diese Domäne notwendig für die Infektion in vivo (Chen et al., 1993), das gleiche mag für HBV gelten. Dies liefert eine Erklärung dafür, daß Core-Promotor-Varianten in vivo normalerweise zusammen mit HBV-Varianten auftreten, welche das gesamte X-Gen exprimieren.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Deletion von 8 Basenpaaren Pos. 1763-1770 im Bereich des Enhancer II/Core- und PräC-Promotor (carboxyterminal) des HBx wurde entweder sporadisch (Kidd-Ljunggren et al., 1997) oder gehäuft bei Patienten unter Immunsuppression (Günther et al., 1996; Repp et al., 1992; Schläger et al., in Revision) beschrieben. In der von Repp et al. (1992) beschriebenen immunsupprimierten Patientenpopulation, HBsAg-Subtyp ayw2, Genotyp D, zeigte sich keine oder nur eine sehr schwache Immunantwort gegenüber dem

Hepatitis B Virus. Es entwickelte sich keine oder nur eine minimale Hepatitis und die Transaminasen lagen im Normbereich. Außer Antikörpern gegen HBcAg waren keine weiteren gegen HBV-Antigene gerichteten Antikörper nachweisbar (Repp et al., 1992). Es fanden sich jedoch sehr hohe HBV-DNA-Titer (bis über 10^9 Genomäquivalente/ml). Die 8-bp-Deletion war in 5-24 % aller Genome nachweisbar.

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die HBV-Variante mit einer 8-Basenpaar-Deletion (Pos.1763-1770) im X-Genbereich im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Transkription aufweist, und inwieweit heptonukleäre Transkriptionsfaktoren hierauf Einfluß nehmen.

Um die Grundaktivität des Wildtyp-Enhancer II mit der 8-bp-Deletionsvariante zu vergleichen, sollten diese in Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) exprimierende Vektoren kloniert werden, um anschließend in CAT-Versuchen die CAT-Expression zu messen.

Des weiteren sollten der PräC-Promotor und der Core-Promotor der 8-bp-Deletion und des Wildtyps in Luciferase-Vektoren kloniert werden. Durch Zugabe der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1 sollte deren Einfluß auf die Expression dieses Genomabschnittes in Luciferase-Versuchen untersucht werden.

Mittels Gelretardationsanalyse sollte die Bindung von HNF1 an die Sequenz mit der 8-bp-Deletion dargestellt und durch Kompetition die Stärke dieser Bindung bestimmt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Verbrauchsmaterialien, Geräte

Die Chemikalien, soweit nicht anders im Text vermerkt, wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) in der Qualität pro analysi oder reinst bezogen. Als Radiochemikalien wurde [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mM) von der Firma Amersham (Braunschweig) und dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) von Pharmacia (Freiburg) erhalten. Das verwendete Wasser stammte aus der Reinstwasseranlage des Instituts für Medizinische Virologie, Gießen. Puffer, Lösungen, Medien, Verbrauchsmaterialien und Geräte werden an entsprechender Stelle im Text aufgeführt.

2.2 Oligonukleotide für Gelretardationsanalysen (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

Als Wildtyp-Oligonukleotide wurden die HBV-Sequenzen von Pos.1756-78 verwendet:

Wildtyp-s 5'-CGGTAAAGGTCTTTGTATTAGGAT-3'

Wildtyp-as 5'-CTAGATCCTAATAACAAAGACCTTTAACC*GCATG*-3'

Das Varianten-Oligonukleotid unterscheidet sich nur in der 8-bp-Deletion von Pos.1763-70:

Variante-s 5'-CGGTAAATATTAGGAT-3'

Variante-as 5'-CTAGATCCTAATATTTAACC*GCATG*-3'

Als Nachweis der Bindungsstelle für HNF1 wurden die Oligonukleotide HNF1-consensus-s und -as verwendet, die als ds-DNA die Bindungsstelle für HNF1 aus dem Promotor des humanen Albumingens bilden (Mendel und Crabtree, 1991).

HNF1-consensus-s 5'-CGTAGATTATTA*ACT*-3'

HNF1-consensus-as 5'-CTAGAGTTAATAATCTAC*GCATG*-3'

Die kursiven Nukleotide stellen die überhängenden Enden als Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen dar, die Sequenz CTAG ist für XbaI, CATG für SphI spezifisch.

2.3 Primer für Plasmidkonstruktionen

HBV-X-s(1)	(1374-1407)	5'-CCCAAGCTTATGGCTGCTAGGCTGTGCTGC-3'
HBV-X-as(1)	(1838-1818)	5'-GGAATTCATGGCTGCTAGGCTGTG-3'
LHBs1-s	(2842-2861)	5'-CCTCCCATGGTGTAGCTCTT-3'
LHBs2-as	(2699-2681)	5'-GGGGTACCGCCCTTTGACAAAGGAAT-3'
HBV-X-s(2)	(1730-1750)	5'-GAAGATCTGACTGGGAGGAGTTGGG-3'
HBV-X-as(2a)	(1822-1800)	5'-GTTCCATGGTGTGCTGGTGCAGCAGA-3'
HBV-X-as(2b)	(1907-1886)	5'-ATGTCCATGGCCCAAAGCCAC-3'
HBV-s		5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTTACCTCTGCCTAATCA-3'
HBV-as		5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGTGCTGG-3'

2.4 Antikörper

RAD1: Der Xenopus-HNF1-spezifische monoklonale Antikörper RAD1 wurde von Herrn Prof. Ryffel, Virologisches Institut der Universität Essen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er erkennt humanes HNF1 und ist für EMSAs geeignet.

x-AKD: Der HBx-Peptid-spezifische monoklonale Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Schröder, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

2.5 DNA-Längenstandards

DNA-Längenstandard VIII, Größe der Banden in bp: 1114; 900; 692; 501/489; 404; 320; 242; 190; 147; 124; 110; 67; 37/34/26/19

1 kb-DNA-Ladder, Größe der Banden in bp: 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506/517; 396; 344; 298; 220/201/154/134/75

Beide Standards wurden von der Firma Boehringer Mannheim, bezogen.

2.6 Zelllinien

Die Versuche wurden mit der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 durchgeführt. Diese Zellen produzieren HNF1. Sie wurden aus dem Biopsiematerial eines primären humanen Leberzellkarzinoms isoliert (Aden et al., 1979). Hierbei handelt es sich um hochdifferenzierte Leberparenchymzellen, die keine HBV-DNA enthalten. Ursprünglich wurden diese Zellen von Herrn Prof. D. Ganem (UCSF San Francisco, USA) bezogen und werden seit Jahren im Institut für Medizinische Virologie, Gießen, kultiviert.

Des Weiteren wurden 3T3-Zellen verwendet. Diese wurden aus murinen embryonalen Fibroblasten gewonnen. Die Zellen werden im Institut für Medizinische Virologie, Gießen, kultiviert.

2.7 Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL1-Blue MRF

Die Bakterien wurden von Stratagene (Heidelberg) bezogen, von Herrn Dr. S. Schaefer nach der Methode von Perbal (1988) kompetent gemacht (Institut für Medizinische Virologie) und zur Verfügung gestellt.

2.8 Plasmide

2.8.1 pcDNA3CAT

Dieses Plasmid enthält den Leserahmen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT). Es wird als Positivkontrolle in den CAT-Versuchen benutzt. In die NotI Schnittstelle des Expressionsvektors pcDNA3 (Invitrogen) wurde der CAT-Leserahmen kloniert. Dieses Plasmid wurde bei der Bestellung des Vektors pcDNA3 gratis von der Firma Invitrogen mitgeliefert.

2.8.2 pBLCAT2

Dieser Vektor enthält Elemente des Vektors puc19 und ein Ampicillin-Resistenzgen. Weiter enthält er den CAT-Leserahmen. Er ist zur Promotoranalyse geeignet und wurde von der Firma Promega bezogen.

2.8.3 pGL2 Luciferase Control

Bei diesem Expressionsvektor für Luciferase (Luci) erfolgt die Expression vom stromaufwärts gelegenen SV40-Promotor und vom SV40-Enhancer, welcher stromabwärts vom Luciferasegen lokalisiert ist. Weiter enthält er ein Ampicillin-Resistenzgen. Er wurde von der Firma Promega, Madison, USA bezogen.

2.8.4 pSyn06TLuc

In den Vektor pT81Luc wurden sechs Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HNF1 kloniert. Die Luciferase-Expression wird somit durch Kotransfektion von HNF1-Expressionsvektoren gesteigert. Der Vektor wurde von Herrn Prof. Ryffel, Essen, zur Verfügung gestellt.

2.8.5 pH44TLuc

Es wurden vier Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HNF4 in den Vektor pT81Luc kloniert. Der Vektor wurde von Herrn Prof. Ryffel, Essen, zur Verfügung gestellt.

2.8.6 pBluescript SK II+

Der Vektor pBluescript SK II+ (Stratagene) ist ein kleines E.coli Plasmid mit einer hohen Kopienzahl und wurde als Klonierungsvektor mit multipler Klonierungsstelle verwendet.

2.8.7 prcCMV

Dieser Expressionsvektor enthält sowohl Enhancer- als auch Promotor-Sequenzen des immediate-early-Gens des humanen Cytomegalievirus. Der Vektor wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

2.8.8 prcCMV/HNF4

Bei diesem Expressionsvektor für HNF4 erfolgt die Expression ebenfalls vom CMV-Enhancer (Zapp et al., 1993). Der Vektor wurde von Herrn Prof. Ryffel, Essen, zur Verfügung gestellt.

2.8.9 RVP16

Bei diesem HNF1-Expressionsvektor wurde die native Aktivatordomäne von HNF1 gegen die wesentlich stärkere Aktivatordomäne des Herpes Simplex Virus-Proteins RVP16 ausgetauscht (Denecke et al., 1993). Der Vektor wurde von Herrn Prof. Ryffel, Essen, zur Verfügung gestellt.

2.8.10 COUP-TF1

Hierbei handelt es sich um einen Expressionsvektor für COUP-TF1, wobei die Expression vom Rous Sarkom Virus-Enhancer erfolgt (Wang et al., 1989). Der Vektor wurde von Herrn Prof. Tsai, Houston (Texas), USA, zur Verfügung gestellt.

2.8.11 Plasmid Moe86 und Moe102

In den Vektor pBluescript SK II+ wurde über HindIII und KpnI ein komplettes HBV-Genom, mit und ohne 8-bp-Deletion, vom Genotyp D (Subtyp ayw2) kloniert (F. Schläger, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Genome (Genomsequenz in Repp et al., 1992) wurden aus dem Serum einer im Verlauf einer Hepatitis B-Epidemie infizierten Patientin isoliert (Repp et al., 1993, [b]). Sie wurden von Herrn Dr. S. Schaefer zur Verfügung gestellt.

2.8.12 pKoeX43 und pMoeX2/1

Aus dem Serum von chronisch infizierten Patienten (Genotyp D, Subtyp ayw2, identisches Genom wie in Plasmid Moe 86 und Moe 102) wurde der HBx-ORF (Pos. 1354-1854) in den Vektor puc19 kloniert (Repp et al., 1991). Beide Ausgangsplasmide wurden von Herrn Dr. R. Repp, Kinderklinik Gießen, zur Verfügung gestellt und sind in Repp et al. (1993, [b]) beschrieben.

2.8.13 pLuci3

Hierbei handelt es sich um einen Vektor mit dem kompletten Luciferase-Leserahmen, vor welchen die multiple Klonierungsstelle kloniert wurde. Er beinhaltet keinen Enhancer. Der Vektor wurde von der Firma Promega bezogen.

2.8.14 pGL2

Bei dem Vektor pGL2 handelt es sich um ein Reporterplasmid für das Luciferasegen, dessen Transkription durch den SV40-Enhancer reguliert wird.

2.8.15 pcX+

Dieser Vektor kodiert für das komplette offene Leseraster des X-Gens unter Kontrolle des CMV-Promotors. Dazu wurde die HBx-Sequenz mittels Pfu-Polymerase mit den Primern EcoHBx-s und HBx-asXbaI aus dem Plasmid pc1820 amplifiziert, mit EcoRI und XbaI verdaut, über ein

Agarosegel aufgereinigt und schließlich das geschnittene Amplifikat in den ebenso geschnittenen Vektor pcDNA3 ligiert. Der Vektor wurde von Herrn Dr. R. Schuster am Institut für Medizinische Virologie in Gießen konstruiert und zur Verfügung gestellt (Schuster et al., 2000).

2.8.16 pcX-

Dieser Vektor ist in Herstellungsweg und Sequenz dem Vektor pcX+ bis auf zwei Basenaustausche identisch, die zwei Stoppkodons in den Leserahmen des X-Proteins einfügen und somit die Expression des X-Gens verhindern. Bei diesem Vektor diente das Plasmid pc1820xx- als Ursprungs-DNA für die Amplifikation. Der Vektor wurde von Herrn Dr. R. Schuster am Institut für Medizinische Virologie in Gießen konstruiert und zur Verfügung gestellt (Schuster et al., 2000).

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Medien

Mixed-Medium: 19,72 g Instamed Medium199 Eagle (Seromed, Berlin)
 83,20 g Instamed RPMI 1640 (Seromed, Berlin)
 20,00 g NaHCO₃ (Merck, Berlin)
 100,00 ml Non-Essential Amino Acids (Gibco, Eggenstein)
 100,00 ml Antibiotic/Antimycotic Solution (Gibco, Eggenstein)
 100,00 ml 100 mM Natriumpyruvat (Seromed, Berlin)
 mit 8,6 l H₂O auffüllen und sterilisieren, mit CO₂ auf pH 7,5 einstellen, vor
 Gebrauch mit FKS ad 10 % versetzen.

Einfriermedium: 70 % Mixed-Medium
 20 % FKS (Foetales Kälberserum) (PAA, Linz, Österreich)
 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)

PBS, pH 7,8: 137,0 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 8,1 mM Na₂HPO₄×H₂O
 1,8 mM KH₂PO₄

3.1.2 Auftauen

Zur Anzucht der Zelllinien wurden die bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen durch Zugabe von 37 °C warmem Mixed-Medium (Peters et al., 1985) aufgetaut. Um das im Einfriermedium enthaltene zellschädigende DMSO zu entfernen, wurden die Zellen für 5 Min. bei 1200 Upm und 4 °C pelletiert (Jouan-Zentrifuge CR422) und das Einfriermedium wurde abgesaugt. Danach wurden die Zellen in Mixed-Medium mit 10 % FKS resuspendiert und auf eine 95 mm Zellkulturschale (Greiner, Nürtingen) ausplattiert. Die weitere Kultivierung erfolgte auf 95 mm und 145 mm Zellkulturschalen sowie 6-Loch-Platten (35 mm Durchmesser pro Loch; Renner, Darmstadt) in jeweils 10 ml, 30 ml und 4 ml Mixed-Medium mit 10 % FKS im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO₂.

3.1.3 Kultivierung und Passagieren

Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz, in der Regel alle 2-3 Tage, umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit sterilem PBS gewaschen und 5-10 Min. (bis zur Ablösung) mit einer 10 % Trypsinlösung (Gibco, Eggenstein) in PBS bei 37 °C inkubiert. Die abtrypsinieren Zellen wurden in Mixed-Medium/10 % FKS aufgenommen und im Verhältnis 1:3 auf neuen Zellkulturschalen ausplattiert. Die HepG2 Zellen wurden fortwährend in Mixed-Medium mit 10 % FKS vermehrt.

3.1.4 Konservierung

Zum Konservieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen, wie oben beschrieben, von einer 145 mm Schale abtrypsinieren und 5 Min. bei 1200 Upm und RT (Jouan-Zentrifuge) abzentrifugieren. Das Zellpellet wurde in 8 ml Einfriermedium aufgenommen und in 4 Portionen in Einfrieröhrchen (Nalgene, Hamburg) aliquotieren. Das Einfrieren erfolgte schrittweise: 1 h bei -20 °C und anschließend bei -70 °C. Über längere Zeit wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.5 Zellzahlbestimmung

Für eine typische Transfektion wurde eine adäquate Anzahl Zellkulturschalen trypsinieren. Die trypsinieren Zellen wurden in Mixed-Medium/10 % FKS aufgenommen. Diese Suspension wurde mehrere Male mit Hilfe einer 10 ml Spritze durch eine Kanüle (18G11/2, 1,2×40 T.W P.W) gezogen, um vorhandene Zellaggregate aufzulösen. Die Zellzahl wurde mit der verbesserten Neubauer-Zählkammer (Spencer[®]) im Binokularmikroskop (Leitz, Wetzlar) bestimmt.

3.2 Klonierung

3.2.1 Puffer und Medien

LB-Medium:

10 g	Trypton (Difco, Detroit, USA)
5 g	Hefeextrakt (Difco, Detroit, USA)
10 g	NaCl

ad 1000 ml H₂O, autoklavieren
für LB-Amp-Medium Zusatz von 200 µg/ml Ampicillin

LB-Agarplatten:	10 g	Trypton	
	5 g	Hefeextrakt	
	10 g	NaCl	
	20 g	Bakterienagar (Difco, Detroit, USA)	
	ad 1000 ml H ₂ O, autoklavieren, auf 55 °C abkühlen lassen,		
	Zusatz von 200 µg/ml Ampicillin, Plattengießen		
Agarose-Probenpuffer (6×):	60,0 ml	Glycerin	
	0,1 g	Bromphenolblau	
	ad 100 ml TE-Puffer		
Agarose-Laufpuffer: (TAE pH 7,8)	40 mM	Tris-Acetat	
	1 mM	EDTA	
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl pH 8,0	
	1 mM	EDTA pH 8,0	
Tris-HCl pH 7,8:	250 mM	Tris	
	pH mit HCl auf 7,8 einstellen		

3.2.2 Restriktionsverdau

Der Verdau mit Restriktionsenzymen wurde in dieser Arbeit sowohl zum analytischen Überprüfen von Plasmid-DNA-Fragmenten auf ihre Sequenz und Ausrichtung als auch zur Herstellung von geschnittenen Inserts und Vektoren zu Klonierungszwecken verwendet.

Zur Behandlung der DNA mit Restriktionsenzymen wurden pro 1 µg DNA 2-3 Units einer Restriktionsendonuklease, die bei -20 °C in 50 % Glycerin gelagert wurde, zugesetzt. Die Reaktion erfolgte in dem von der Herstellerfirma mitgelieferten 10× Puffer bei einer Temperatur von 37 °C für mehrere Stunden bzw. über Nacht. Manchen Reaktionsansätzen wurde nach Angaben des Herstellers noch bovines Serumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugefügt. Alle Restriktionsenzyme, 10× Puffer und 100× BSA wurden von der Firma New England Biolabs, Schwalbach, bezogen.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Doppelsträngige DNA wird in einem homogenen elektrischen Feld, erzeugt durch ein Spannungsgerät (Hofer, Lindau), durch Agarose hindurch aufgetrennt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten fand in 0,7-4 % (w/v) Agarosegelen statt. Dazu wurde die Agarose (Seakem, FMC, Biozym, Hess. Oldendorf) in 50 ml 1×TAE in der Mikrowelle aufgekocht, 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro Gel zugegeben und nach kurzem Abkühlen auf die rechteckigen Gelträger (Geldicke 0,5 cm, Gelbreite 5,0 cm und Gellänge 7,5 cm) einer horizontalen Elektrophoresekammer gegossen. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6× Ladebuffer in die durch einen Teflonkamm ausgesparten Taschen aufgetragen und bei 90-110 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Für eine Größenbestimmung der DNA-Banden wurden außerdem 2 µl DNA-Längenstandard aufgetragen.

Zur Auswertung wurden die Gele auf einen Transilluminator (Vilber-Lourmat, Torcy, Frankreich) gelegt und mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des in der DNA interkalierenden Ethidiumbromids konnten die DNA-Banden so dargestellt und mit der Gelkamera C51, Drucker und Monitor (Cybertech, Mitsubishi, Hantarex) dokumentiert werden.

3.2.4 Elution von DNA aus Agarose und Reinigung mit GeneClean®

Das Prinzip von GeneClean® (Dianova, Hamburg) beruht auf der Benutzung von „Glasmilch“, einer wäßrigen Suspension kleinster Siliziumpartikel, die DNA bei hoher Salzkonzentration binden und bei niedriger Salzkonzentration wieder abgeben. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose nach präparativer Restriktionsenzymbehandlung und Agaroseelektrophorese wurde die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten, das dreifache Volumen NaI (6M) zugesetzt und die Agarose durch 10 Min. Inkubation bei 55 °C geschmolzen. Nach Zugabe der Glasmilch (1 µl/0,5 µg DNA) wurde der Ansatz für 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert, dreimal mit 500 µl New-Wash gewaschen, die DNA nach 10 Min. bei 55 °C wieder von der Siliziummatrix gelöst und in einem der Ausgangsmenge der Glasmilch entsprechenden Volumen H₂O aufgenommen. Nach Sedimentation der Glasmilch befand sich die DNA im Überstand und konnte z.B. in einer Ligation eingesetzt werden. Mit der gleichen Methode, allerdings ohne die erste Inkubation bei 55 °C zum Schmelzen der Agarose, konnte DNA auch zwischen zwei Restriktionsendonuklease-Behandlungen von störenden Proteinen befreit werden.

3.2.5 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um eine Selbstligation geschnittener Vektor-DNA zu verhindern, wurde diese mit alkalischer Phosphatase behandelt. Hierbei werden die 5'-Phosphatgruppen, die Ligasen für ihre Katalyse benötigen, entfernt. Da die verwendete alkalische Phosphatase (New England Biolabs, Schwalbach) keinen speziellen Puffer benötigt, konnte die Reaktion in einem beliebigen New England Biolabs-Restriktionspuffer durchgeführt werden. Hierfür wurde das Enzym (0,1 U/μmol DNA-Enden) mit der gewünschten DNA gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Eliminierung des Enzyms und Konzentrierung der DNA wurde der Ansatz mit GeneClean® aufgereinigt.

3.2.6 Ligation und Transformation

Durch den Einsatz von DNA-Ligase wird die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxylenden und den 5'-Phosphatenden von DNA-Molekülen katalysiert. Dazu wurden ca. 100 ng Vektor-DNA mit einem etwa dreifachen molaren Überschuss Insert-DNA, 1 μl T4-DNA-Ligase (400U/μl) und 10× Ligasepuffer in einem 20 μl Ansatz für 1 h bei RT inkubiert. Für die Transformation wurden davon 10 μl mit 100 μl kompetenten *E. coli* Bakterien (Epicurian Coli® XL1-Blue MRF') vorsichtig vermischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Um die Zellen für die DNA durchlässiger zu machen, erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis für 5 Min.. Danach wurden die Bakterien mit 500 μl LB-Medium versetzt, bei 37 °C für 1 h geschüttelt, 60 μl bzw. 300 μl auf eine LB-Amp-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die aus der Transformation hervorgegangenen Ampicillin-resistenten Klone wurden weiter analysiert.

3.2.7 Analytische Plasmid-Präparation

Mit dieser Methode (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) ist eine schnelle Überprüfung des in transformierten Bakterien enthaltenen Plasmids möglich. Dazu wurde von jedem zu untersuchenden Klon eine 2 ml LB-Amp-Kultur (Hoechst AG, Frankfurt) ü.N. bei 37 °C angezogen. Von dieser Kultur wurde 1 ml kurz abzentrifugiert, das Pellet in 300 μl Resuspensionspuffer aufgenommen, mit 300 μl Lysispuffer vorsichtig vermischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden 300 μl einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,5) zugegeben, für weitere 10 Min. auf Eis inkubiert und dann für 10 Min. bei 14000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 20 µl Strataclean™-Harz (Stratagene, Heidelberg) versetzt und für 5 Min. bei RT unter öfterem Vortexen inkubiert. Dieses Harz auf Siliziumbasis bindet Proteine, so daß diese schnell und effizient von der zu reinigenden DNA getrennt werden können.

Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNA im Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt, 15 Min. bei 4 °C und 14000 Upm pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl TE aufgenommen. Danach stand sie zur weiteren Analyse mit Restriktionsenzymen zur Verfügung.

3.2.8 Maxipräparation

Zum Aufreinigen größerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen wurde das Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen (Hilden) mit den darin enthaltenen Puffern und Anionenaustauschersäulen verwendet.

Hierfür wurde eine Übernachtskultur (100 ml bei High-copy-Plasmiden, 500 ml bei Low-copy-Plasmiden, maximale Dauer 16 h) aus Bakterien für 15 Min. bei 4 °C und 4500 Upm zentrifugiert (Jouan-Zentrifuge).

Anschließend nimmt man das Bakterienpellet in 10 ml Resuspensionspuffer auf, fügt 10 ml Lysispuffer hinzu, mischt durch Inversion und inkubiert für 5 Min. bei RT. Dies bewirkt eine Zellyse und eine Freisetzung der Plasmid-DNA. Die Zugabe von 10 ml einer 3 M Kaliumacetat-lösung (pH 5,5) bewirkt ein Ausfällen von chromosomaler DNA, denaturierten Proteinen und Zelltrümmern. Es wird 20 Min. auf Eis inkubiert und dann in der Jouan-Zentrifuge für 30 Min. bei 4500 Upm und 4 °C zentrifugiert.

Zur vollständigen Klärung wurde der Überstand durch einen Papierfilter gegeben und dann auf eine mit 10 ml Äquilibrierungspuffer behandelte Anionenaustauschersäule aufgetragen. Zur Reinigung der an das Säulenmaterial gebundenen Plasmid-DNA wurde zweimal mit je 30 ml Waschpuffer gespült. Anschließend wurde die DNA mit 15 ml Elutionspuffer von der Säule gelöst.

Zum Entsalzen und Konzentrieren wurde die DNA mit dem 0,7-fachen Volumen (10,5 ml) Isopropanol gefällt, bei 12000 Upm in einer Centrikon-Kühlzentrifuge pelletiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und die getrocknete DNA in 50-100 µl H₂O aufgenommen.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die zu messende DNA-Lösung wird mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Messung erfolgt im Spektrophotometer DU-70 (Beckman, Palo Alto, USA). Als Referenzwert

dient destilliertes Wasser. Jeweils 100 µl werden gemessen. Die Extinktion multipliziert mit dem Faktor 5 gibt die Konzentration der Stammlösung in µg/µl an.

3.3 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Die PCR (Polymerase Chain Reaktion, modifiziert nach Mullis et al., 1987) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Die Ausgangs-DNA (Template) wird im ersten Schritt denaturiert, in einem zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung zweier spezifischer Primer (Sense und Antisense), zwischen denen sich die zu amplifizierende Sequenz befindet, an die nun einzelsträngige DNA. Die Primer werden dann in einem dritten Schritt durch eine thermostabile Polymerase verlängert. Die einzelnen Schritte sind durch unterschiedliche Reaktionstemperaturen gekennzeichnet. In den weiteren Reaktionszyklen wird diese Abfolge beibehalten, und da dabei immer die zuvor synthetisierten DNA-Stränge zusätzlich als Matrizen dienen, erfolgt eine exponentielle Vermehrung des betreffenden DNA-Fragments.

In einem Reaktionsansatz für die PCR waren enthalten:

- 0,1 µM Sense-Primer
- 0,1 µM Antisense-Primer
- 0,1 µM dNTP-Mix (0,1 µM)
- 1,5 mM MgCl₂
- 10× PCR-Puffer (Endkonzentration 1×)
- 50 U/ml Taq-Polymerase bzw. Pfu-Polymerase
- Template-DNA

ad 50 µl bzw. 100 µl H₂O

Nach Überschichtung des Reaktionsansatzes mit 2 Tropfen Mineralöl wurde die PCR mit dem Thermocycler Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Überlingen) ausgeführt. Ein typisches Programm mit 20 Zyklen sah folgendermaßen aus:

- 1 Min. 95 °C (Denaturierung)
- 1 Min. 56 °C (Anlagerung)
- 1 Min. 74 °C (Verlängerung)

Nach Beendigung der PCR wurden je 10 µl in einer Agarosegelelektrophorese eingesetzt und dadurch ausgewertet. Taq-Polymerase, Pfu-Polymerase, 10× PCR-Puffer und MgCl₂ wurden von Promega (über Serva, Heidelberg), der dNTP-Mix von Pharmacia (Freiburg) bezogen.

3.4 Gelretardationsanalyse

3.4.1 Beschreibung der Methode

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist eine einfache, schnelle und sehr sensitive Methode, um sequenzspezifische DNA-bindende Proteine in kruden Zellextrakten zu entdecken. Er erlaubt außerdem eine quantitative Bestimmung der Affinität, Menge und Bindungsspezifität der DNA-bindenden Proteine. Spezifische, an markierte DNA-Fragmente bindende Proteine verzögern die Wanderung der Fragmente während der Elektrophorese, was somit zum Verschieben der Banden der gebundenen ds-Oligonukleotide führt, die den individuellen Protein-DNA-Komplexen entsprechen. Dadurch können verschiedene Proteine aufgrund ihrer spezifischen Banden erkannt oder die Interaktion mehrerer Proteine an eine einzelne DNA-Sequenz aufgedeckt werden.

Durch die Zugabe von Antikörpern können Proteine, die in den Protein-DNA-Komplex involviert sind, entdeckt werden (Kristie und Roizman, 1986). Die Zugabe eines spezifischen Antikörpers zu einer Bindungsreaktion kann mehrere Effekte haben. Wenn das Protein, das von dem Antikörper erkannt wird, nicht in die Bindungsreaktion involviert ist, so führt dies zu keinem zusätzlichen Effekt. Ist das erkannte Protein in den Komplex miteinbezogen, so kann die Protein-DNA-Bindungsreaktion dadurch verhindert werden, oder es bildet sich ein Antikörper-Protein-DNA-Komplex, der somit zu einer weiteren Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit des Komplexes führt. Es erscheint eine weitere Bande (Supershift). Als Negativkontrolle dient ein unspezifischer Antikörper, durch welchen kein Supershift hervorgerufen wird.

3.4.2 EMSA-Puffer

EMSA-Puffer A:	10,0 mM	Hepes pH 7,9	(Roth, Karlsruhe)
	1,5 mM	MgCl ₂	
	10,0 mM	KCl	
	0,5 mM	DTT (Dithiothreitol)	
	ad 25 ml H ₂ O		

EMSA-Puffer B:	20,00 mM	Hepes pH 7,6	(Roth, Karlsruhe)
	25 % (v/V)	Glycerin	
	0,42 M	KCl	
	1,50 mM	MgCl ₂	
	0,20 mM	EDTA (Ethylendiamintetraaceticacid)	
	0,50 mM	PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid)	
	ad 25 ml H ₂ O		
Verdünnungspuffer C:	10 mM	Hepes pH 7,9	
	60 mM	KCl	
	1 mM	EDTA	
	1 mM	DTT	
	4 %	Ficoll	(Pharma, Uppsala, Schweden)
TBE-Puffer (10×):	890 mM	Tris	(UBS [®] , Cleveland)
	890 mM	Borsäure	
	20 ml	1 M EDTA (pH 8)	
Bromphenolblau-Marker:	10,0 ml	Glycerin	
	16,6 mg	Bromphenolblau	
	ad 100 ml TE-Puffer		

3.4.3 Herstellung des Kernextraktes

Es werden sowohl unbehandelte HepG2-Zellen als auch mit dem Transkriptionsfaktor HNF1 transfizierte HepG2-Zellen verwendet. Der Versuchsaufbau der Transfektion ist dem unter 3.5.2 identisch. Die HepG2-Zellen werden auf insgesamt 30 Petrischalen (Durchmesser 10 cm) ausplattiert und zu einem konfluenten Zellrasen herangezüchtet. Zuerst werden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen, 1 ml PBS wird auf die Platte gegeben und die Zellen werden daraufhin mit einem autoklavierten Gummischaber von der Schale gekratzt. Sie werden in einer Ultrazentrifuge (Beckmann Model L5 50) bei 1200 Upm, 0 °C, 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl Puffer A resuspendiert. Darauf folgt eine 10-minütige Inkubation auf Eis und eine weitere Ultrazentrifugation (2000 Upm, 0 °C, 5 Min.). Der Überstand wird verworfen. Zum Zellpellet werden 250 µl Puffer A

hinzugefügt und die Suspension mittels eines Dounce-Gerätes homogenisiert. Eine Probe hiervon wird mit 0,4 % Trypan-Blau-Lösung versetzt und unter dem Binokularmikroskop die Zerstörung der Zellen gesichert. Nach einer weiteren Ultrazentrifugation (10000 Upm, 0 °C, 10 Min.) versetzt man das Sediment mit 50 µl Puffer C und mischt mittels eines Vortexers. Es wird 30 Min. auf Eis inkubiert. Eine Ultrazentrifugation (Airfuge, 20 Min., 80000 Upm, 20 Psi) folgt. Der Überstand mit den Zellbestandteilen wird vorsichtig abgezogen und bei -80 °C tiefgefroren. Die Proteinmenge des Kernlysates wurde mit der in 3.5.4 beschriebenen Methode bestimmt.

3.4.4 Radioaktive Primermarkierung

Für die radioaktive Markierung der Primer wurde folgender Ansatz verwendet:

- 1 µl des Doppelstrang-Oligonukleotids (5 pMol/µl)
 - 5 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (50 µCi)
 - 1 µl Klenow Enzym (2 U/µl)
 - 4 µl Klenow-Puffer (5×)
 - 1 µl dATP, dGTP und dTTP
- ad 20 µl H₂O

Es folgt eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird mit 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA (pH 8,0) und 1/80 des Volumens tRNA (10 mg/ml) gestoppt.

Die Aufreinigung des Oligonukleotids erfolgt über Quick-Spin-Columns Sephadex G50 (Boehringer, Mannheim), um überschüssige radioaktive Nukleotide aus dem Überstand zu entfernen. Das Eluat enthält die gereinigte radioaktive DNA und wird bei -20 °C eingefroren. Zur Bestimmung der Radioaktivität dient ein β - γ -TLC-Linear Analyser System (Bertholdt, Calmbach). Es wird vor und nach der Reinigung jeweils 1 µl der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Lösung abgenommen und die Markierungsrate bestimmt.

3.4.5 Gießen des Polyacrylamidgeles

Acrylamidgel (10 %): 25,2 g Harnstoff
 7,2 g TBE (10 %)
 6,0 ml Long Ranger Acrylamidgemisch
 ad 60 ml mit H₂O auffüllen, auf 50 °C erwärmen.

Direkt vor dem Gießen Zusatz von 30 µl TEMED und 300 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

Pro Gel wird benötigt:	0,75 ml	TBE (10×)
	4,00 ml	Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 30:0,8)
	250,00 µl	APS (10 %)
	25,00 µl	TEMED

Vor der Zugabe von APS und TEMED entgast man für 15 Min.. Die fertige Lösung wird in eine EMSA-Gelkammer gegossen und das Festwerden wird abgewartet.

3.4.6 Bindungsreaktion

Pro Ansatz wird benötigt:	5,0 µl	radioaktiv markiertes Oligonukleotid (10000 Upm)
	y µl	Kernextrakt (15 µg Protein)
	1,0 µl	poly dIdC (2 mg/ml)
	1,0 µl	Antikörper
	0,9 µl	Glycerin
	1,0 µl	BSA
	x µl	Verdünnungspuffer C (auf Endmenge von 23,0 µl)

Man inkubiert Verdünnungspuffer, poly dIdC, Kernextrakt, Glycerin und BSA für 15 Min. bei Raumtemperatur. Dann fügt man die Antikörper und das radioaktive Oligonukleotid hinzu und inkubiert weitere 15 Min.. Die Lösung lädt man auf das Polyacrylamidgel. Zur Feststellung der Lauffront verwendet man einen Bromphenolblau-Marker.

3.4.7 Elektrophorese

Nach einer Vorelektrophorese von 30 Min. bei 100 V erfolgt nach der Applikation der Reaktionsansätze die Hauptelektrophorese über 90 Min. ebenfalls bei 100 V. Als Laufpuffer wird 0,25× TBE benutzt. Anschließend wird das Gel über 2 h in einem Vakuumtrockner bei 80 °C getrocknet.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Phosphoimagers BAS 1000 (Fuji, Tokio, Japan) oder durch die Exposition auf einem Autoradiographiefilm Biomax MR (Kodak, über Integra Bioscience, Fernwald) bei -70 °C für mindestens 12 h in einer Filmkassette mit oder ohne Verstärkerfolie. Die Entwicklung erfolgte in einem automatischen Röntgenfilmentwickler.

3.5 Transfektion von Reportergenen

3.5.1 Zellausplattierung

$1-2,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen wurden je Napf einer 6-Loch-Platte ausplattiert und mit 3 ml Mixed-Medium mit 10 % FKS versetzt.

3.5.2 Transfektion mit Lipofectamine™

Lipofectamine™ (Gibco BRL, Paisley, Schottland) besteht aus einem polykationischen Lipid und einem neutralen Lipid im Verhältnis 3:1 (w/w) in H₂O. Dieses Gemisch bildet Liposomen aus, die sich mit DNA zu stabilen Komplexen zusammenlagern und diese durch Fusion mit der Zellmembran in das Zellinnere befördern können.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf 6-Loch-Platten, auf die am Tag zuvor $1-2,5 \times 10^6$ Zellen pro Loch ausplattiert wurden. Bis zu 5 µg DNA wird 10 µl Lipofectamine™, ab 5 µg DNA 20 µl Lipofectamine™ eingesetzt.

24 h nach der Zellausplattierung erfolgt die Transfektion. Das entsprechende Plasmid wird in 100 µl serumfreiem Mixed-Medium, welchem die ausreichende Menge an Wachstumsfaktor fehlt, aufgenommen und mit 20 µl Lipofectamine™, das ebenfalls mit serumfreiem Mixed-Medium auf 100 µl aufgefüllt ist, gemischt. Es wird 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und 2 ml mediumfreies Mixed-Medium wird je Napf dazugegeben. Der vorbereitete DNA-Liposomen-Komplex wird hinzugefügt; nach 4 h erfolgt ein Mediumwechsel mit serumhaltigem Mixed-Medium mit 10 % FKS, ein weiterer nach 24 h. Die Zellernte erfolgt 40-44 h nach der Transfektion.

3.5.3 Zellernte

Für die Zellernte (Kingston, 1987) wurden die Zellen einmal mit 10 ml 4 °C kaltem PBS gewaschen und dieses vollständig abgesaugt. Danach wurde je 1 ml eiskaltes PBS auf die Schalen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Kühn+Bayer, Nidderau) abgekratzt und mit einer Gilsonpipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 5 Min. bei 14000 Upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415 C, Hamburg) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 170 µl 4 °C kaltem 0,25 M Tris-HCl (pH 7,8) aufgenommen und resuspendiert. Die Ansätze wurden in flüssigem Stickstoff 5 Min. tiefgefroren und 5 Min. bei

37 °C aufgetaut. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Diese Zellysate wurden für 5 Min. bei 14000 Upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415 C, Hamburg) herabzentrifugiert. Der Überstand, der einem hauptsächlich zytosolischen Extrakt entspricht, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zellysate wurden nun, nachdem für die Proteinbestimmung jeweils 10 µl abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert worden waren, zusammen mit den Aliquots bei -70 °C eingefroren.

Die in den Zellysaten enthaltene Proteinmenge wird nach der in 3.5.4 beschriebenen Methode bestimmt.

3.5.4 Bestimmung der in den Zellysaten enthaltenen Proteinmenge

Um die Ergebnisse der CAT-ELISA- und Luciferase-Versuche untereinander vergleichen zu können, wurde die im Zellysat enthaltene Menge der zytosolischen Proteine mit dem BCA-Protein-Assay (Pierce, über Paesel und Lorel, Frankfurt/Main) bestimmt.

Der Proteinassay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf dem Nachweis von Proteinen durch die Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen (nach Lowry et al., 1951). Das dabei verwendete Reagenz BCA (bicinchoninic acid) reagiert spezifisch mit Cu^{1+} -Ionen zu einem Komplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen wird.

Um die Proteinbestimmung auszuwerten, wurde parallel eine Standardreihe mit bekannter BSA-Konzentration mitgeführt. Ausgehend von einer Stammlösung, die eine Konzentration von 2 µg/µl besitzt, wurden die Mengen 16 µg, 12 µg, 10 µg, 8 µg, 4 µg, 2 µg und als Nullwert 10 µl H_2O eingesetzt.

Es wurden jeweils 5 µl der zu messenden aliquotierten Lysate pipettiert. Sowohl die Proben als auch die Standards und der Nullwert wurden im Doppelansatz angelegt. Die Reaktion wurde anschließend nach Anleitung des Herstellers (Pierce, über Paesel und Lorel, Frankfurt/Main) mit je 200 µl Arbeitslösung, bestehend aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B, gestartet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 550 nm im Mikrotiterplattenphotometer und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

3.6 Messung der CAT -Aktivität

Die in den transienten Transfektionen exprimierte CAT wurde quantitativ durch einen CAT-ELISA (Boehringer, Mannheim) bestimmt. Der Test beruht auf dem Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip. Die Oberfläche der Mikrotitermodule ist vom Hersteller mit einem polyklonalen Antikörper gegen das CAT-Protein beschichtet. Das in den Zellysaten enthaltene CAT-Protein bindet spezifisch an die Festphase-gebundenen Anti-CAT-Antikörper. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Lysatanteile wurde ein zweiter, Digoxigenin (DIG)-markierter polyklonaler Anti-CAT-Antikörper hinzugegeben, der an das gebundene CAT bindet. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Anteile dieses Antikörpers konnte der gebundene Anteil durch einen Anti-DIG-Antikörper, der Peroxidase-markiert ist, erkannt werden. Der Nachweis des Antikörper-Enzym-Komplexes erfolgt über den Umsatz des Substrates ABTS[®] bzw. BM blue (Boehringer Mannheim) durch die gebundene Peroxidase. Dies führt zu einem farbigen Produkt, dessen Extinktion sich im Photometer (Behringwerke, Marburg) bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm messen läßt.

Der CAT-ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In den Versuchen wurden Proteinmengen von 50-100 µg eingesetzt. Um den Versuch auszuwerten, wurde parallel eine Reihe CAT-Protein-Standards nach Angaben des Herstellers (0,125 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml und 1,0 ng/ml) mitgemessen. Das Reaktionsvolumen betrug 200 µl; es wurden jeweils Doppelansätze eingesetzt.

3.7 Messung der Luciferase-Aktivität

3.7.1 Puffer

Luciferin-Reaktionsgemisch:	470,00 µM	Luciferin
	270,00 µM	Koenzym A
	530,00 µM	ATP
	33,30 mM	DTT
	0,10 mM	EDTA
	20,00 mM	Tricine
	1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ ×5H ₂ O
	2,67 mM	MgSO ₄ ×7H ₂ O
	ad 100 ml mit H ₂ O auffüllen; pH 7,8 einstellen	

3.7.2 Testdurchführung

Der Luciferase-Versuch erlaubt eine quantitative Analyse von Faktoren, welche die Genexpression eukaryontischer Zellen beeinflussen. Dazu werden die Zellen transient mit einem Reportergenkonstrukt transfiziert, das für das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodiert (de Wet et al., 1987). Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Oxidierung des Substrats Luciferin, wodurch dieses aktiviert wird und Licht mit einem Emissionsmaximum bei 562 nm ausstrahlt. Da die Expression des Luciferasegens von vorgeschalteten Promotor-/Enhancerelementen kontrolliert wird, ist die gemessene Enzymaktivität ein direktes Maß für die Beeinflussung der Transkriptionsrate dieser Elemente durch zu untersuchende Faktoren, wie z.B. Proteine aus kotransfizierten Expressionsvektoren.

Am Tag vor der Transfektion wurden $2,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen mit Mixed-Medium/10 % FKS pro Napf einer 6-Loch-Schale ausplattiert und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen transfiziert.

Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 ml PBS überschichtet und 5 Min. auf Eis inkubiert, um dann mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale entfernt zu werden. Die Zellen wurden für 5 Min. bei 20000 g (4 °C) abzentrifugiert und in 150 µl Tris-HCl (0,25 M) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch dreimaliges Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und wieder Auftauen bei 37 °C für je 5 Min.. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und Teile des Zellysats zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einem BCA-Assay eingesetzt. Für den Luciferase-Versuch wurden aus dem Zellysat jeweils 50 µg Protein eingesetzt und auf 50 µl mit Tris-HCl aufgefüllt.

Um den Versuch auszuwerten, wurde parallel eine Luciferase-Standardreihe (1pg, 500fg, 250fg, 125fg, 63fg, 31fg, 15fg und 7fg) mitgemessen. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl; es wurden jeweils Doppelansätze eingesetzt.

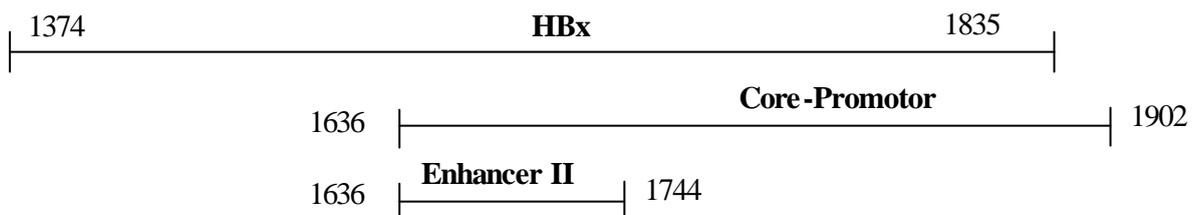
Die Luciferaseaktivität wurde im Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) unter automatischer Zugabe des Luciferin-Reaktionsgemisches in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht über die Elemente Enhancer II , PräC- und Core-Promotor

Da die Auswirkung der 8-bp-Deletion auf den PräC- und Core-Promotor untersucht werden sollte, mußte der sonst in seiner Funktion nicht trennbare Bereich des PräC- und Core-Promotors artefiziell aufgetrennt werden. Dabei entsteht der Core-Promotor aus dem gesamten Core-Promotor ohne den Bereich des Enhancer II. Als PräC-Promotor werden die Sequenzen bis zum PräC-Start definiert. Als Enhancer II wurde hier ein längerer Abschnitt bezeichnet, in welchem möglichst viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren liegen. Die konstruierten Plasmide enthalten im folgenden diese Bereiche (Abbildung 4.1).

A)



B)

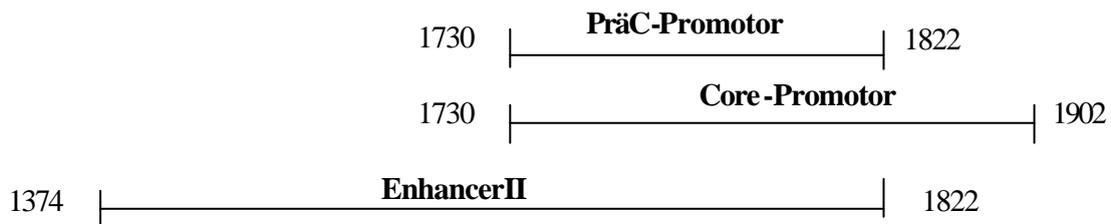


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Enhancer II, PräC- und Core-Promotors. A) Darstellung der Nomenklatur in der Literatur. B) In der Arbeit verwendete Nomenklatur für die klonierten Reporterkonstrukte.

4.2 Konstruktion von Plasmiden

4.2.1 Klonierung des kompletten HBx-ORF

Um zu untersuchen, ob die Funktion des HBx-ORF durch die 8-bp-Deletion (del) verändert ist, wurde der komplette HBx-ORF aus den Plasmiden pKoeX43 (wt) und pMoeX2/1 (del) amplifiziert (die Herstellung beider Plasmide ist unter 2.8.12 beschrieben) und in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3 kloniert (Abbildung 4.2). Es wurden somit die Konstrukte Wildtyp pcDNA3-wt-HBx und Variante pcDNA3-del-HBx hergestellt, wobei letzteres die zu untersuchende 8-bp-Deletion enthält. In späteren CAT- und Luciferase-Versuchen sollte die Aktivität der Vektoren als Transaktivator untersucht werden. Das X-Gen wurde mit den Primern HBV-X-s(1) und HBV-X-as(1) mittels PCR im HBV-Bereich Position 1374-1838 amplifiziert (unter 3.3 beschrieben). Später wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI geschnitten und die weitere Klonierung, wie unter 3.2 erläutert, durchgeführt. Eine Sequenzierung des X-Gen-Bereiches (Kinderklinik Gießen) bestätigte die erwarteten Sequenzen.

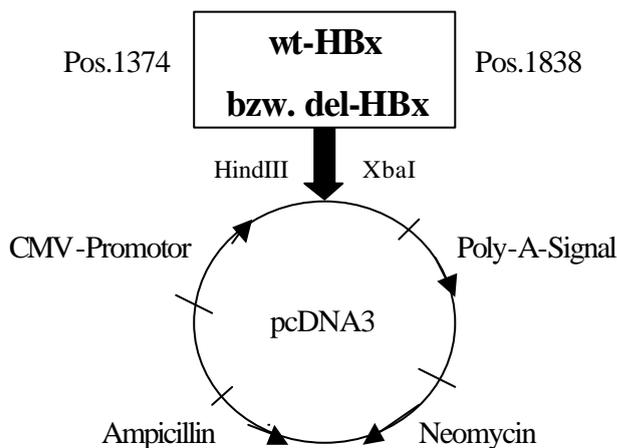


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Expressionsvektors für wt-HBx bzw. del-HBx.

4.2.2 Klonierung des EnhII/Core-Promotors in ein CAT-Reportergen

Der Nachweis der Expression des CAT-Reportergens durch den Enhancer II/Core-Promotor mit und ohne 8-bp-Deletion sollte zeigen, inwieweit dieser Bereich zu einer Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren HNF1 und HNF4 wird und dadurch die Replikation beeinflusst. Dazu mußten die Konstrukte Wildtyp pBLCAT2-wt-EnhII, bestehend aus einem entsprechenden Isolat aus Patientenserum, und die Variante pBLCAT2-del-EnhII, die sich nur in der 8-bp-Deletion von Pos. 1763-1770 von ersterem unterscheidet, erstellt werden (Abbildung 4.3). Für die Expression sollte die HBV-DNA vor das bakterielle Gen der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) gesetzt werden, um in den weiter unten beschriebenen CAT-ELISA-Versuchen die Expression dieses HBV-regulatorischen Elements zu untersuchen. Als Vektor wurde daher pBLCAT2 gewählt. Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der viralen DNA diente für das Variantenkonstrukt das unter 4.2.1 beschriebene Plasmid pcDNA3-del-HBx. Der HBV-Anteil wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI aus der multiplen Klonierungsstelle herausgeschnitten, und die überhängenden einzelsträngigen Enden wurden mit Mung-Bohnen-Nuklease verdaut. Daraufhin wurde mit XbaI geschnitten. Der Vektor pBLCAT2 wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten, ebenfalls Mung-Bohnen-Nuklease verdaut und zuletzt mit XbaI behandelt. Zur Klonierung des Wildtypkonstruktes wurde mittels der Restriktionsenzyme SacII und XbaI das Insert aus dem unter 4.2.1 beschriebenen pcDNA3-wt-HBx gewonnen. Dieses wurde in den ebenfalls mit SacII und XbaI geschnittenen Vektor pBLCAT2 eingefügt. Die weitere Klonierung verlief identisch.

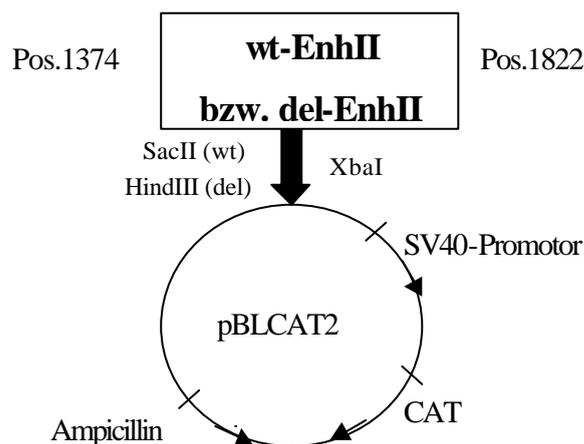


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Expressionsvektors für wt-EnhII bzw. del-EnhII. Im Bereich des EnhII sollte die Auswirkung der Bindung der Transkriptionsfaktoren HNF1 und HNF4 untersucht werden.

4.2.3 Klonierung des LHBs-Promotors als bekannte HNF1-Bindungsstelle in ein CAT-Reportergen

Da untersucht werden sollte, ob durch die 8-bp-Deletion eine neue HNF1-Bindungsstelle entsteht, wurden Versuche mit der HNF1-Sequenz durchgeführt. Um hierfür eine Positivkontrolle für die Bindungsreaktion zu haben, wurde der LHBs-Promotor, welcher eine bekannte Bindungsstelle für HNF1 besitzt, in einen CAT-Vektor kloniert (Abbildung 4.4). Bei dem neuentstandenen Konstrukt pCAT3Basic-LHBs wird der Start des LHBs zum Start des CAT-Gens.

Zunächst wurde mittels PCR der LHBs-Promotor aus dem HBV Isolat 991 amplifiziert, wozu die Primer LHBs1 und LHBs2 verwendet wurden. Später fand ein Restriktionsenzymverdau des Amplifikats mit KpnI und NcoI statt. Als Vektor diente pCAT3Basic, der in der multiplen Klonierungsstelle gleichartig geschnitten wurde. Die weitere Ligation, Kontrolle und Sequenzierung erfolgte wie üblich.

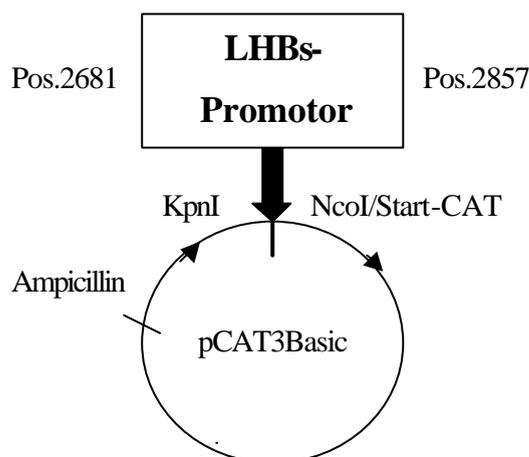


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Expressionsvektors für den LHBs-Promotor. Dieser stellt eine bekannte Bindungsstelle für HNF1 dar.

4.2.4 Klonierung des PräC-Promotors in ein Luciferase-Reportergen

Um den Effekt der 8-bp-Deletion Pos.1763-1770 auf die Transkription der PräC-RNA aufzuzeigen, wurde der Enhancer II, der für die Core- und PräC-RNA zuständig ist, zum Großteil eliminiert. Für die später durchgeführten Luciferaseversuche wurden wiederum zwei Konstrukte

kloniert, der Wildtyp pLuci-wt-PräC und die Variante pLuci-del-PräC, welche sich lediglich in der oben beschriebenen Deletion unterscheiden (Abbildung 4.5). Zur Isolierung der viralen DNA dienten die unter 4.2.1 beschriebenen Vektoren pcDNA3-wt-HBx und pcDNA3-del-HBx. Sie wurden mit den Primern HBV-X-s(2) und HBV-X-as(2a) mittels PCR amplifiziert und später mit den Restriktionsenzymen BglIII und NcoI geschnitten. Als Vektor diente pLuci3, der gleich behandelt wurde. Somit wurde der PräC-Promotor von Pos.1730-1822 so in den Vektor pLuci3 kloniert, daß das Startcodon von PräC zum Start des Luciferasegens wurde.

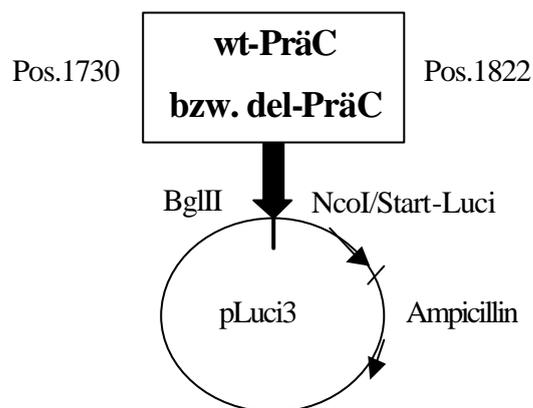


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Expressionsvektors für den wt- bzw. del-PräC-Promotor. Im Bereich des PräC-Promotors sollte die Auswirkung der Bindung von HNF1, HNF4 und COUP-TF1 untersucht werden.

4.2.5 Klonierung des Core-Promotors in ein Luciferase-Reporter-gen

Um den Core-Promotor zu klonieren, mußte aus den Plasmiden Moe86 bzw. Moe102 (komplettes HBV Genom mit und ohne 8-bp-Deletion) zuerst das komplette HBV-Genom nach der Methode von Günther et al. (1995) mit den Primern HBV-s und HBV-as amplifiziert werden. Das Amplifikat wurde mit dem Enzym SapI verdaut. Die später rezirkularisierte DNA wurde mit den Primern HBV-X-s(2) und HBV-X-as(2b) amplifiziert. Das resultierende Amplifikat (Pos. 1730-1902) wurde nach Verdau mit BglIII und NcoI in den ebenso vorbereiteten Vektor pLuci3 kloniert und daraufhin sequenziert (Abbildung 4.6). In den Konstrukten Wildtyp pLuci-wt-Core bzw. Variante pLuci-del-Core wurde somit das Startcodon von Core zum Start des Luciferasegens.

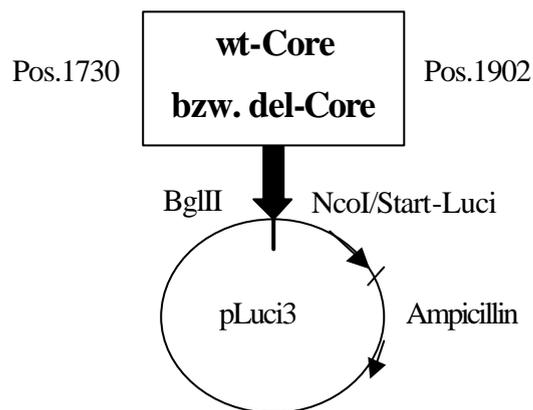


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Expressionsvektors für den wt- bzw. del-Core-Promotor. Im Bereich des Core-Promotors sollte die Auswirkung der Bindung von HNF1, HNF4 und COUP-TF1 untersucht werden.

4.3 Auswirkung der 8-bp-Deletion auf die CAT-Expression

4.3.1 Austesten der Aktivität der Vektoren pBLCAT2-wt-EnhII und pBLCAT2-del-EnhII

Um zu untersuchen, ob durch die 8-bp-Deletion eine Bindungsstelle für HNF1 entsteht, wurden Versuche mit CAT als Reportergen in HepG2-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden Wildtyp-Enhancer II (wt-EnhII) und Varianten-Enhancer II (del-EnhII) mit Expressionsvektoren für HNF1 kotransfiziert.

Es wurde zuerst ein Versuch durchgeführt um festzustellen, welche Konzentration der beiden Enhancer II-CAT-Vektoren eine geeignete CAT-Expression ergibt.

In Dreifachansätzen wurden jeweils 1,0 µg, 2,0 µg und 4,0 µg des del-EnhII und des wt-EnhII durch 20 µl Lipofectamine™ transfiziert. Als Positivkontrolle dienten 2,0 µg des Vektors pcDNA3CAT, zur Feststellung der Hintergrundaktivität wurde kein Plasmid eingesetzt. Pro Ansatz wurden 10^6 Zellen verwendet. Die weitere Transfektion, Zellyse, Proteinbestimmung und der CAT-Versuch wurden anschließend wie im Methodenteil unter 3.5 und 3.6 beschrieben durchgeführt.

Vergleicht man die Werte von del-EnhII und wt-EnhII bei jeweils gleichen eingesetzten Mengen, so stellt man bei der 8-bp-Variante im Vergleich zum Wildtyp eine stärkere Expression fest (Abbildung 4.7). Somit wurde in den weiteren Versuchen eine Menge von 4,0 µg des Wildtyp-X und 2,0 µg des Varianten-X eingesetzt. Diese Mengen bewirken eine geeignete Expression. Die Positivkontrolle wurde mit 2,0 µg pcDNA3CAT durchgeführt und ergab ein Ergebnis des CAT-ELISA über dem Sättigungsbereich. Die Negativkontrolle enthielt keinen Vektor.

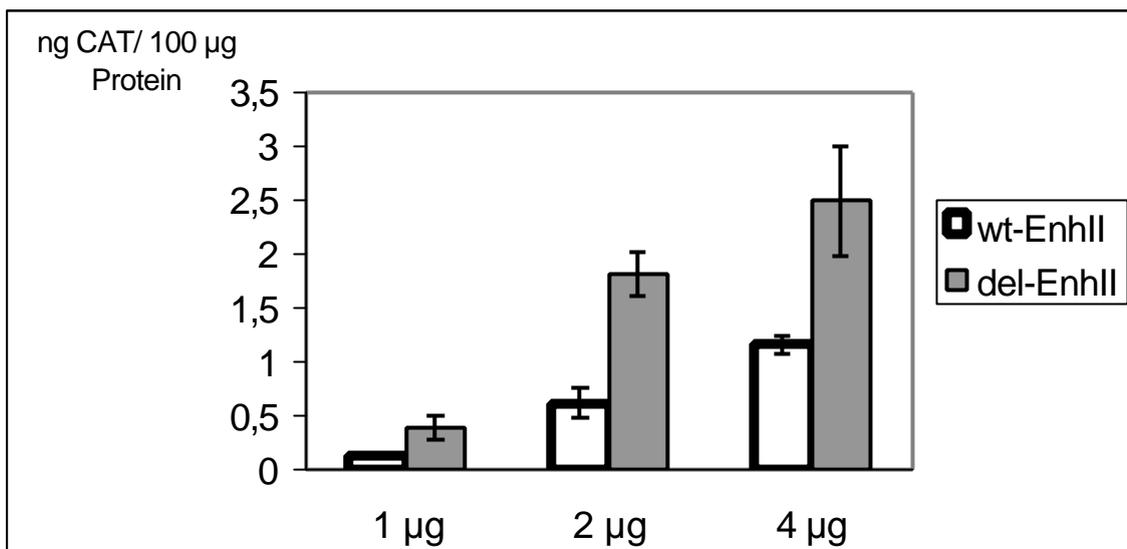


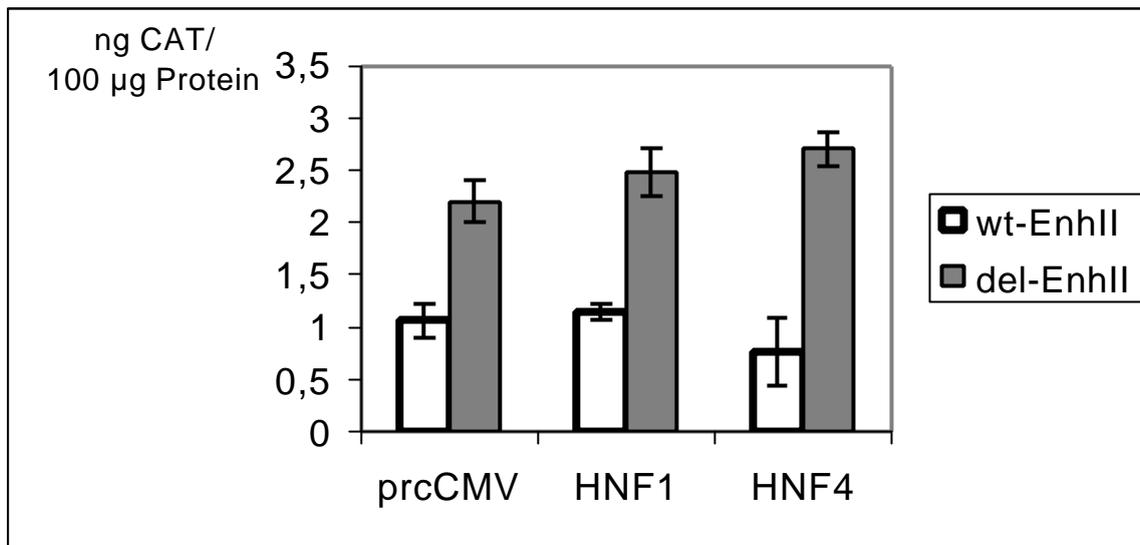
Abbildung 4.7: CAT-Versuch zur Austestung der Aktivität des del-EnhII und wt-EnhII in pBLCAT2. Die Zelllinie HepG2 wurde mit den CAT-Konstrukten wt-EnhII und del-EnhII in pBLCAT2 in unterschiedlichen Mengen transfiziert. Anschließend wurde die Menge an gebildetem CAT-Protein (CAT) der Dreifachansätze bestimmt und der Mittelwert gebildet.

4.3.2 Einfluß von HNF1 und HNF4 auf den Enhancer II

Es sollte nun untersucht werden, ob der Wildtyp-Enhancer II (wt-EnhII) und der Varianten-Enhancer II (del-EnhII), jeweils im Vektor pBLCAT2, bei Kotransfektion von Expressionsvektoren für HNF1 und HNF4 eine signifikante Aktivierung und somit eine Zunahme der produzierten CAT-Menge aufweisen. Hierzu wurde in Dreieransätzen 4,0 µg des wt-EnhII- bzw. 2,0 µg des del-EnhII-Vektors einmal mit 5,0 µg des Leervektors prcCMV als Negativkontrolle, des weiteren mit 5,0 µg des Vektors RVP16 mit HNF1-Expression und zuletzt mit 5,0 µg prcCMV/HNF4 als HNF4 exprimierender Vektor transfiziert. Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle mit 2,0 µg pcDNA3CAT und eine Kontrolle ohne Vektor zur Bestimmung der Hintergrundaktivität mitgeführt. Pro Ansatz wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen und 20 µl Lipofectamine™ eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Kotransfektion des Expressionsvektors für HNF1 mit pBLCAT2-Vektoren, die wt-EnhII und del-EnhII enthalten, keine Transaktivierung bewirkt (Abbildung 4.8). Bei der Kotransfektion mit dem Expressionsvektor für HNF4 war bei del-EnhII eine stärkere Expression im Vergleich zum Wildtyp vorhanden.

A)



B)

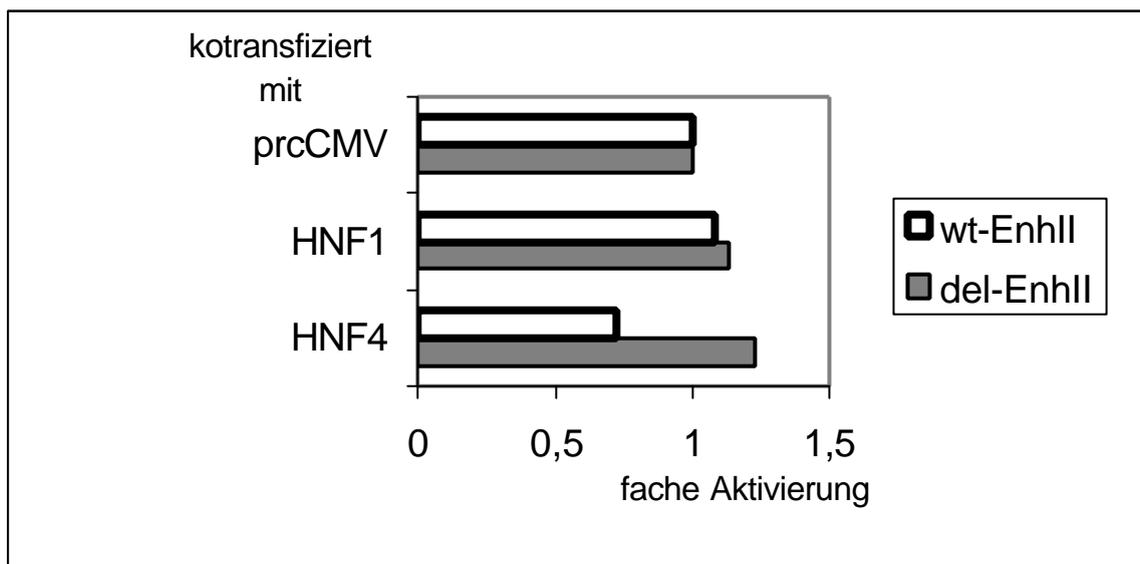


Abbildung 4.8: Transaktivierung des Varianten-/Wildtyp-Enhancer II in der Zelllinie HepG2.

A) Die Zelllinie HepG2 wurde mit den CAT-Konstrukten wt-EnhII bzw. del-EnhII in pBLCAT2 transfiziert. Zusätzlich wurde ein Expressionsvektor für HNF1 und HNF4 kotransfiziert. Als Negativkontrolle und Positivkontrolle wurden prcCMV und pcDNA3CAT eingesetzt. Anschließend wurde durch einen CAT-Versuch die Menge an gebildetem CAT-Protein bestimmt. Aus den errechneten Werten der Dreifachansätze wurde jeweils der Mittelwert gebildet. B) Darstellung der Relativbeziehungen von A).

4.4 Auswirkung der 8-bp-Deletion auf die Luciferase-Expression

4.4.1 Austesten der Aktivität der Vektoren pSyn06TLuc und pH44TLuc

Der Vektor pSyn06TLuc weist sechs Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HNF1 auf; pH44TLuc hat vier Bindungsstellen für HNF4. Diese Vektoren sollten somit als Positivkontrolle für die Transaktivierung durch diese Transkriptionsfaktoren dienen. In diesem Vorversuch sollte nun festgestellt werden, ob HNF1- und HNF4-Vektoren unter diesen Bedingungen tatsächlich transaktivieren.

Es wurde in Dreifachansätzen je 1,0 µg des Vektors pSyn06TLuc mit den Bindungsstellen für HNF1 bzw. 1,5 µg des Vektors pH44TLuc mit den Bindungsstellen für HNF4 zusammen mit 5,0 µg des Expressionsvektors RVP16 für HNF1 bzw. prcCMV/HNF4 für HNF4 und als Leervektor prcCMV in die Zellen transfiziert. Außerdem wurde als Positivkontrolle 2,0 µg des Vektors pcDNA3CAT und als Negativkontrolle kein Vektor transfiziert.

Bei pSyn06TLuc wurde wider Erwarten eine Repression durch HNF1 um den Faktor 2,33 (Tabelle 4.1) festgestellt. Dagegen aktiviert HNF4 erwartungsgemäß die Expression von pH44TLuc um den Faktor 2,98.

Tabelle 4.1: Austestung der Aktivität der Reporterplasmide pSyn06TLuc und pH44TLuc.

HepG2-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid pSyn06TLuc bzw. pH44TLuc transfiziert. Zusätzlich wurde der Expressionsvektor HNF1 bzw. HNF4 und als Leervektor prcCMV kotransfiziert. Anschließend wurden in einem Luciferase-Versuch die relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen und aus den Dreifachansätzen der Mittelwert gebildet.

Reporterplasmid	Expressionsvektor	RLU
1,0 µg pSyn06TLuc	5,0 µg prcCMV	3374
1,0 µg pSyn06TLuc	5,0 µg HNF1	1450
1,5 µg pH44TLuc	5,0 µg prcCMV	588
1,5 µg pH44TLuc	5,0 µg HNF4	1750

4.4.2 Vergleich der Transaktivierung des SV40-Enhancers durch wt-HBx bzw. del-HBx

Die 8-bp-Deletion von Pos.1763-1770 führt zu einem verkürzten X-Protein mit verändertem Carboxyterminus (Repp et al., 1992). Um zu untersuchen ob dieses veränderte HBx eine Defektmutante ist oder weiterhin Wildtyp-Aktivität besitzt, wurde die Transaktivierungskompetenz von Wildtyp-HBx (wt-HBx) und Varianten-HBx (del-HBx) untersucht. Hierzu wurde das Reporterplasmid pGL2 gewählt, welches den SV40-Enhancer enthält. In dem Versuch wurde in Dreifachansätzen je 0,02 µg des Vektors pGL2 und 0,3 µg des Vektors pcDNA3-wt-HBx bzw. pcDNA3-del-HBx in je 2×10^5 3T3-Zellen mit je 10 µl Lipofectamine™ transfiziert. Als Positivkontrolle wurden 0,3 µg pcX+, als Negativkontrolle 0,3 µg des Vektors pcX- und 0,02 µg pGL2 eingesetzt. Es konnte im Fall des Wildtyp-HBx eine Steigerung der Luciferase-Aktivität mit 3046 RLU im Vergleich zur Negativkontrolle mit 681 RLU erzielt werden. Dies entspricht einer Zunahme um den Faktor 5,2. Dagegen stellt man beim Varianten-HBx eine geringere Steigerung auf 1670 RLU fest, was einer Zunahme um das 2,74-fache entspricht (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Aktivierung der Expression durch Transaktivierung des SV40-Enhancers mittels HBx. 3T3-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid für das Luciferasegen pGL2 und den Expressionsvektoren für Varianten- und Wildtyp-HBx kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente pcX-, als Positivkontrolle pcX+. Die Menge an gebildeter Luciferase wurde bestimmt und aus den errechneten Werten der Dreifachansätze jeweils der Mittelwert bestimmt.

Reporterplasmid	Expressionsvektor	RLU	Faktoren
0,02 µg pGL2	—	681	1,00
0,02 µg pGL2	0,3 µg del-HBx	1670	2,74
0,02 µg pGL2	0,3 µg wt-HBx	3046	5,20
0,02 µg pGL2	0,3 µg pcX+	1702	2,80
0,02 µg pGL2	0,3 µg pcX-	497	0,68

4.4.3 Messung der Grundaktivität der Konstrukte des PräC-Promotors

Die Vektoren pLuci3-del-PräC und pLuci3-wt-PräC enthalten nur den PräC-Promotor (Pos.1730-1822). Das Startcodon von PräC wird in diesen Konstrukten Startcodon der Luciferase. Es wurde in den Vektor pLuci3 kloniert, mit welchem aufgrund des inklonierten Luciferasegens die unterschiedlichen Transaktivierungen in RLU gemessen werden können. Durch das Einsetzen verschiedener Mengen von 1,0 µg, 3,0 µg, 5,0 µg und 10,0 µg sollte festgestellt werden, welche Menge der Vektoren eine geeignete Expression erzielt, die dann in den weiteren Versuchen verwendet wurde. Als Positivkontrolle dienten 2,0 µg des Vektors pGL2 Luciferase Control, zum Messen der Hintergrundaktivität wurde kein Vektor eingesetzt. Pro Ansatz waren $2,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen verwendet worden. Es wurde mit je 25 µl Lipofectamine™ transfiziert, bei Einsatz von 10,0 µg Plasmid mit 40,0 µl. Die weitere Transfektion, Zellyse, Proteinbestimmung und die Luciferase-Versuche wurden anschließend wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

Der PräC-Promotor mit der 8-bp-Deletion zeigte mit Ausnahme der höchsten Konzentration eine deutlich stärkere Luciferaseexpression als das Wildtyp-Konstrukt (Tabelle 4.3). Als geeignete Werte für weitere Versuche erschienen 5,0 µg des wt-PräC-Promotors und 3,0 µg des del-PräC-Promotors.

Tabelle 4.3: Expression der Luciferase gesteuert durch den wt- bzw. del-PräC-Promotor.

HepG2-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für pLuci3-wt-PräC bzw. pLuci3-del-PräC in unterschiedlichen Mengen transfiziert. In Luciferase-Versuchen wurden die RLU gemessen und aus den Dreifachansätzen der Mittelwert gebildet.

Menge	Wildtyp (RLU)	8-bp-Deletion (RLU)	Verhältnis Wildtyp : 8-bp-Deletion
1,0 µg	16,5	81,5	1 : 4,9
3,0 µg	173,5	826,5	1 : 4,8
5,0 µg	420,5	1045,5	1 : 2,5
10,0 µg	384,0	328,5	1 : 0,9

4.4.4 Einfluß der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1

auf die Aktivität des Wildtyp und Varianten PräC-Promotors

Eine interessante Frage war nun, ob der PräC-Promotor durch die verschiedenen Transaktivatoren beeinflusst wird. Wie sich im Versuch 4.4.3 herausgestellt hat, stellt der Einsatz von 5,0 µg wt-PräC-Promotor und 3,0 µg del-PräC-Promotor eine geeignete Menge dar. Es wurden jeweils 5,0 µg der Vektoren prcCMV als Negativkontrolle, COUP-TF1 und prcCMV/HNF4 als Expressionsvektor für HNF4 sowie 1,5 µg RVP16 als Expressionsvektor für HNF1 kotransfiziert.

Tabelle 4.4: Effekt verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des PräC-Promotors. A) HepG2-Zellen wurden mit dem Luciferase-Konstrukt pLuci3-wt-PräC bzw. pLuci3-del-PräC und den Expressionsfaktoren für HNF1, HNF4 und COUP-TF1 kotransfiziert. B) Vergleich zwischen wt-PräC und del-PräC von A).

A)

Reporterplasmid	Expressionsvektor	RLU
3,0 µg pLuci3-del-PräC	5,0 µg prcCMV	584
3,0 µg pLuci3-del-PräC	1,5 µg HNF1	1875
3,0 µg pLuci3-del-PräC	5,0 µg HNF4	304
3,0 µg pLuci3-del-PräC	5,0 µg COUP-TF1	9871
5,0 µg pLuci3-wt-PräC	5,0 µg prcCMV	1722
5,0 µg pLuci3-wt-PräC	1,5 µg HNF1	3711
5,0 µg pLuci3-wt-PräC	5,0 µg HNF4	1796
5,0 µg pLuci3-wt-PräC	5,0 µg COUP-TF1	17620

B)

Expressionsvektor	del-PräC	wt-PräC	Verhältnis Wildtyp : Variante
prcCMV	1,00	1,00	1 : 1,00
HNF1	3,21	2,16	1 : 0,67
HNF4	0,52	1,04	1 : 2,00
COUP-TF1	16,90	30,17	1 : 1,79

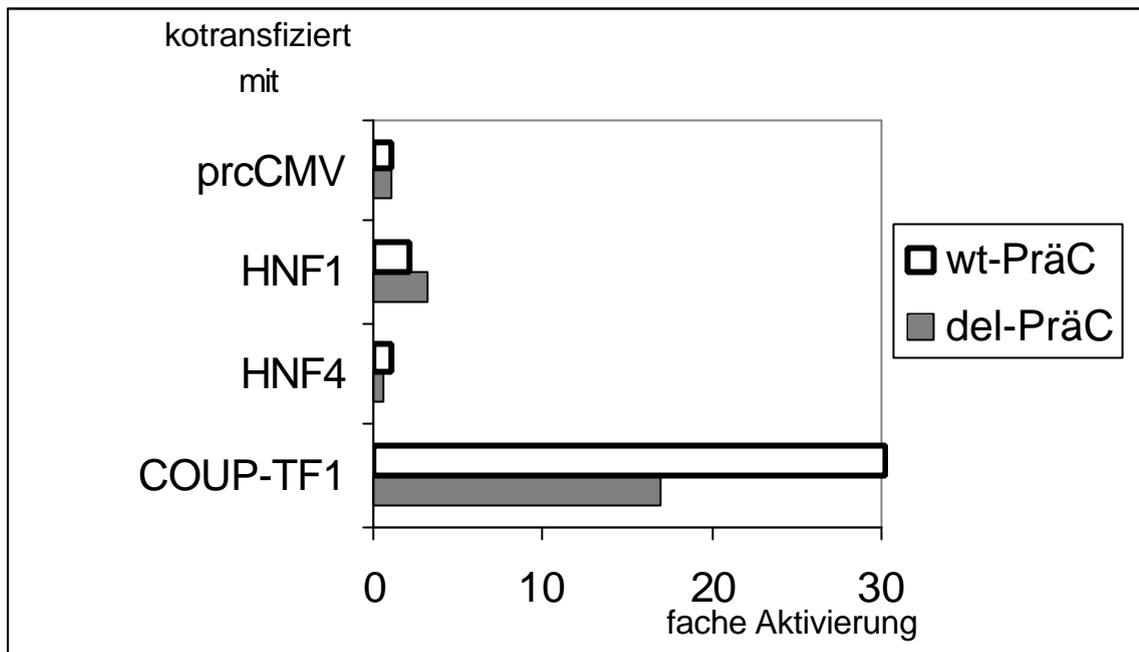


Abbildung 4.9: Transaktivierung des HBV-Varianten PräC-Promotors. Die in Tabelle 4.4 B) dargestellten Beziehungen zwischen Variante und Wildtyp sind hier graphisch dargestellt.

Nimmt man die Transfektion mit prcCMV als Referenzwert und bezieht die anderen Werte hierauf, so stellt man fest (Tabelle 4.4, Abbildung 4.9), daß sich beim Varianten PräC-Promotor bei Zugabe von HNF1 eine Aktivierung um den Faktor 3,21 ergibt. Durch HNF4 wird eine Abnahme um den Faktor 0,52 hervorgerufen. COUP-TF1 bewirkt mit der Steigerung um das 16,9-fache die stärkste Aktivierung. Der Wildtyp zeigte bei Zugabe von HNF1 ebenfalls einen Anstieg um das 2,16-fache; im Vergleich zur Varianten ist dies jedoch nur das 0,67-fache. Die Zugabe von HNF4 hatte mit dem Wert 1,04 praktisch keinen Einfluß auf die Transkription, während COUP-TF1 mit einem Anstieg um den Faktor 30,17 auch im Vergleich zur Variante (1,79-faches) den größten Effekt zeigte.

In einem weiteren unabhängigen Versuch mit unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen der Expressionsvektoren konnten diese Ergebnisse prinzipiell bestätigt werden (Abbildung 4.10).

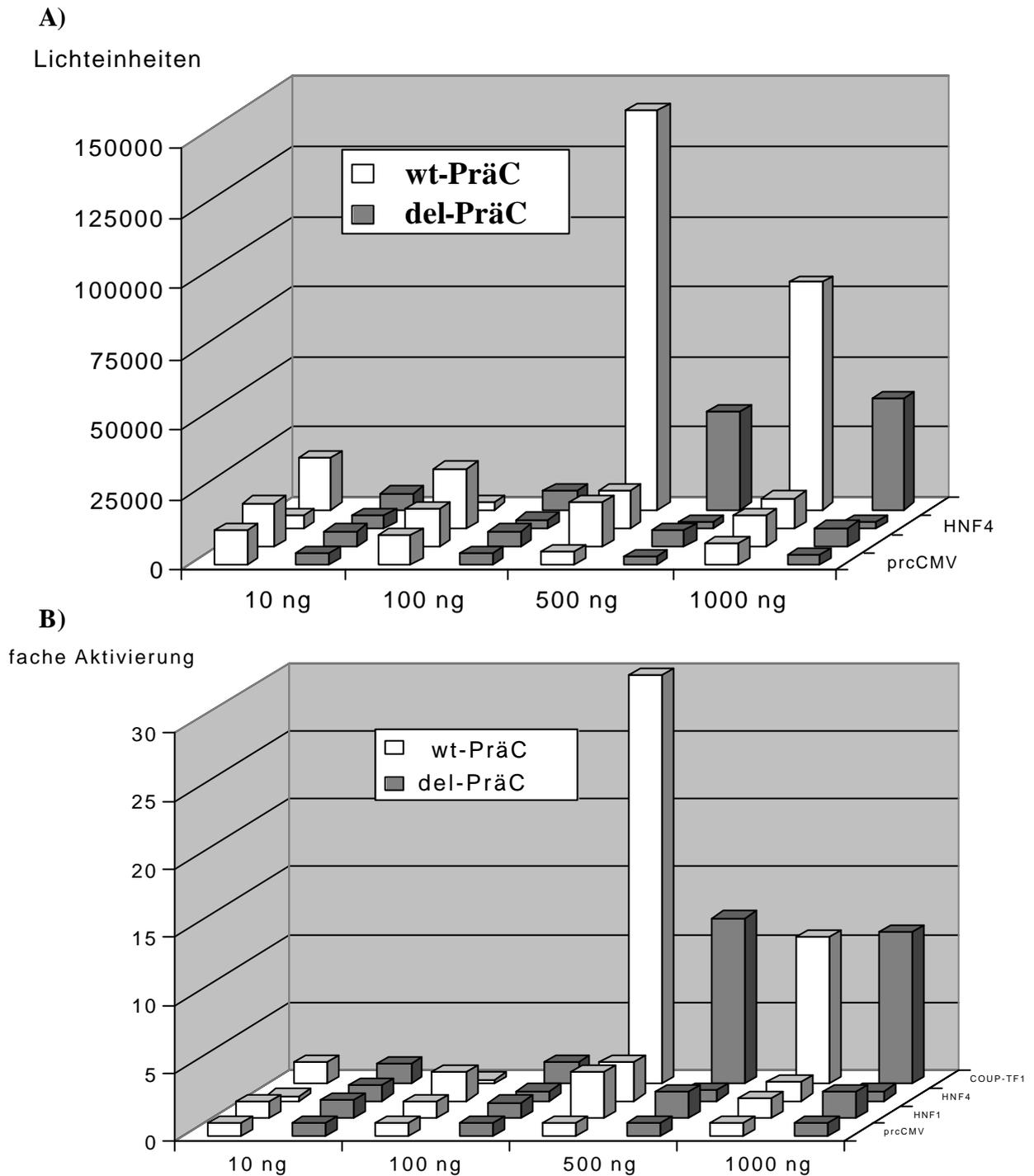


Abbildung 4.10: Effekt verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des PräC- Promotors in Abhängigkeit von der Konzentration der Expressionsvektoren. A) HepG2-Zellen wurden mit dem Luciferase-Konstrukt pLuci3-wt-PräC bzw. pLuci3-del-PräC und den Expressionsfaktoren für HNF1, HNF4 und COUP-TF1 kotransfiziert. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Expressionsvektoren eingesetzt. B) Vergleich zwischen Variante und Wildtyp von Teil A). Als Negativkontrolle dient der Vektor prcCMV, als Positivkontrolle pGL2 Luciferase Control. Aus den Dreifachansätzen wurden die Mittelwerte errechnet.

4.4.5 Messung der Grundaktivität der Konstrukte des Core-Promotors

Die Konstrukte pLuci3-wt-Core und pLuci3-del-Core enthalten den Wildtyp und Varianten Core-Promotor (Pos.1730-1902). In diesen Konstrukten wird das Startcodon von Core zum Luciferase-start. Durch das Einsetzen verschiedener Konzentrationen von 1,0 µg, 3,0 µg, 5,0 µg und 10,0 µg sollte festgestellt werden, welche Konzentration geeignet ist, um eine Aktivierung zu bewirken, die dann in den weiteren Versuchen eingesetzt werden sollte. Als Positivkontrolle dienten 2,0 µg des Vektors pGL2 Luciferase Control; zum Messen der Hintergrundaktivität wurde kein Vektor eingesetzt. Pro Ansatz wurden $2,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen verwendet. Es wurde mit je 25 µl Lipofectamine™ transfiziert, bei Einsatz von 10,0 µg Plasmid mit 40,0 µl.

Die 8-bp-Deletion zeigt durchgehend eine stärkere Aktivierung als der Wildtyp; dargestellt in Tabelle 4.5. Da die Werte insgesamt sehr hoch waren, wurde in den weiteren Versuchen eine Konzentration von jeweils 0,5 µg verwendet.

Tabelle 4.5: Expression der Luciferase gesteuert durch den wt- bzw. del-Core-Promotor.

HepG2-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für pLuci3-wt-Core bzw. pLuci3-del-Core in unterschiedlichen Mengen transfiziert. Es wurde ein Wildtyp Core-Promotor mit dem häufig vorkommenden Austausch T1762- A1764 eingesetzt. In Luciferase-Versuchen wurden die RLU gemessen und aus den Dreifachansätzen die Mittelwerte gebildet.

Menge	Wildtyp (RLU)	8-bp-Deletion (RLU)	Verhältnis Wildtyp : 8-bp-Deletion
1,0 µg	24027	46806	1 : 2,0
3,0 µg	183344	447157	1 : 2,4
5,0 µg	291052	1146152	1 : 3,9
10,0 µg	216813	633610	1 : 2,9

4.4.6 Einfluß der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1

auf die Expression von Wildtyp und Varianten Core-Promotor

In diesem Versuch sollte die Wirkung der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1 auf den Core-Promotor untersucht werden. Wie sich in Versuch 4.4.5 ergeben hat, ist der Einsatz von jeweils 0,5 µg wt- bzw. del-Core-Promotor geeignet. Als Leervektor wurden 5,0 µg prcCMV, als Expressionsvektor 5 µg prcCMV/HNF4 bzw. COUP-TF1 und 1,5 µg RVP16 für HNF1 kotransfiziert.

Tabelle 4.6: Effekt verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des Core-Promotors. A) HepG2-Zellen werden mit dem Luciferase-Konstrukt pLuci3-wt-Core bzw. pLuci3-del-Core und den Expressionsfaktoren für HNF1, HNF4 und COUP-TF1 kotransfiziert. B) Vergleich zwischen wt-Core-Promotor und del-Core-Promotor von Tabelle A).

A)

Reporterplasmid	Expressionsvektor	RLU
0,5 µg pLuci3-del-Core	0,5 µg prcCMV	28923
0,5 µg pLuci3-del-Core	1,0 µg HNF1	61722
0,5 µg pLuci3-del-Core	0,5 µg HNF4	17205
0,5 µg pLuci3-del-Core	0,5 µg COUP-TF1	890992
0,5 µg pLuci3-wt-Core	0,5 µg prcCMV	5660
0,5 µg pLuci3-wt-Core	1,0 µg HNF1	13470
0,5 µg pLuci3-wt-Core	0,5 µg HNF4	4644
0,5 µg pLuci3-wt-Core	0,5 µg COUP-TF1	41883

B)

Expressionsvektor	Varianten-EnhII	Wildtyp-EnhII	Verhältnis Wildtyp : Variante
prcCMV	1,00	1,00	1 : 1,00
HNF1	2,13	2,38	1 : 0,89
HNF4	0,59	0,82	1 : 0,72
COUP-TF1	30,81	7,40	1 : 4,16

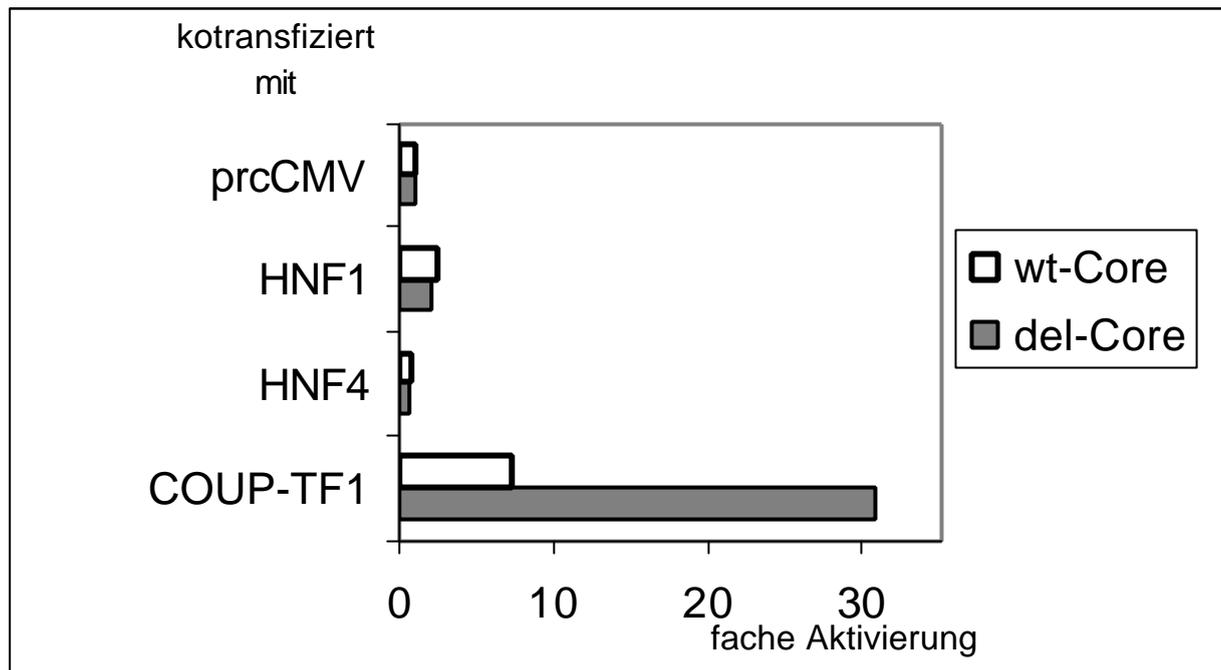
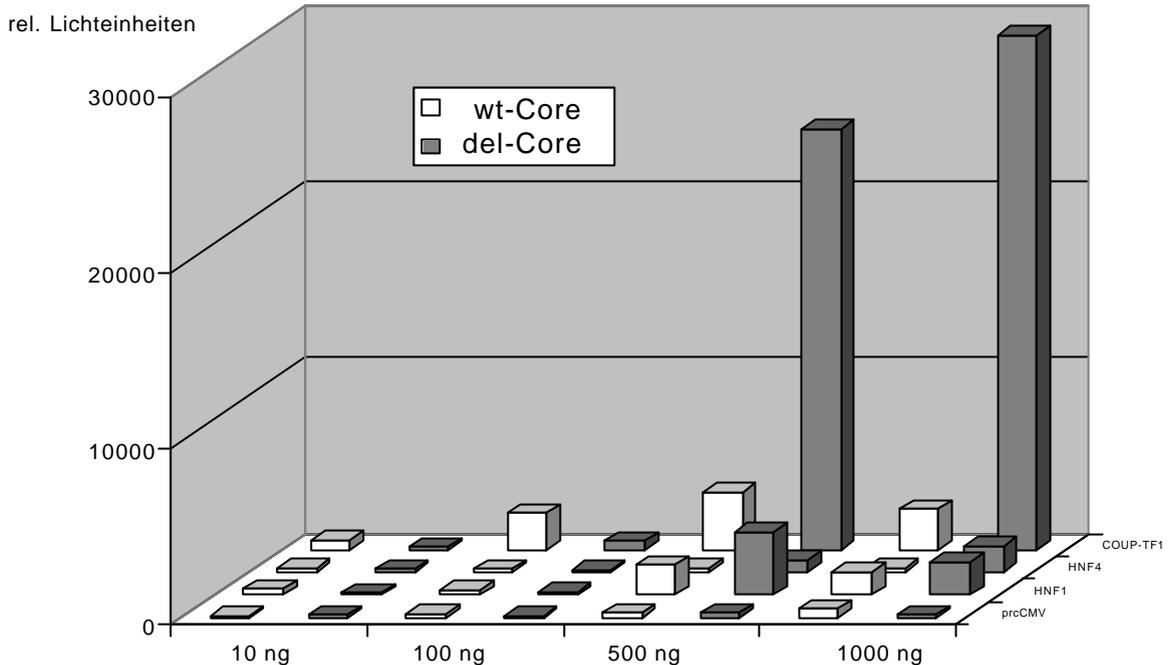


Abbildung 4.11: Transaktivierung des HBV-Varianten Core-Promotors. Die in Tabelle 4.6 B) dargestellten Beziehungen zwischen Variante und Wildtyp sind hier graphisch dargestellt.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse (Tabelle 4.6, Abbildung 4.11): Beim Varianten Core-Promotor transaktivierte HNF1 um das 2,13-fache, HNF4 reprimierte um den Faktor 0,59. COUP-TF1 war der stärkste Transaktivator mit dem Faktor 30,81. Beim Wildtyp des Core-Promotors war eine etwas stärkere Aktivierung um das 2,38-fache bei HNF1, bei HNF4 eine Abnahme nur um das 0,82-fache und bei COUP-TF1 nur eine Zunahme um das 7,4-fache festzustellen.

A)



B)

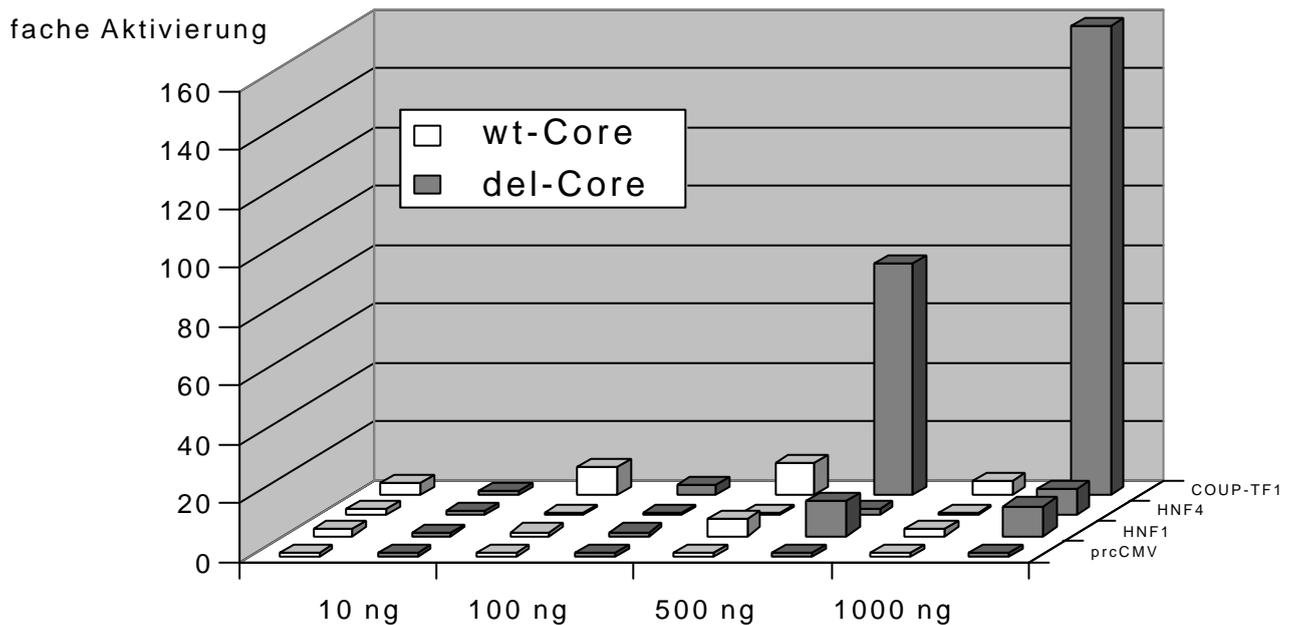


Abbildung 4.12: Effekt verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des Core-Promotors in Abhängigkeit von der Konzentration der Expressionsvektoren A) HepG2-Zellen wurden mit dem Luciferase-Konstrukt pLuci3-wt-Core bzw. pLuci3-del-Core und den Expressionsfaktoren für HNF1, HNF4 und COUP-TF1 kotransfiziert. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Expressionsvektoren eingesetzt. B) Vergleich zwischen Variante und Wildtyp von A). Als Negativkontrolle diente der Vektor prcCMV, als Positivkontrolle pGL2 Luciferase Control. Aus den Dreifachansätzen wurden die Mittelwerte errechnet.

Um zu untersuchen, ob der Einfluß der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1 auf die Expression der Vektoren pLuci3-wt-Core und pLuci3-del-Core dosisabhängig ist, wurde mit unterschiedlichen Mengen von Expressionsplasmiden kotransfiziert (Abbildung 4.12).

Als Konzentrationen wurden 10 ng, 100 ng, 500 ng und 1000 ng eingesetzt. Pro Ansatz waren $2,5 \times 10^6$ HepG2-Zellen und eine angepaßte Menge an Lipofectamine™ nötig: 10 ng DNA mit 2,5 µl Lipofectamine™, 100 ng mit 3,0 µl, 500 ng mit 5,0 µl und 1000 ng mit 7,5 µl. Bei der Positivkontrolle wurde 0,5 µl pGL2 Luciferase Control verwendet, welches dann mit 2,5 µl Lipofectamine™ transfiziert wurde.

Beim Varianten Core-Promotor transaktiviert HNF1 mäßig stark mit zunehmender Konzentration, HNF4 hat eine schwächere Transaktivierung als HNF1, COUP-TF1 ist ein sehr starker Transaktivator, vor allem bei zunehmender Menge. Der Wildtyp Core-Promotor wird sowohl von HNF1 schwächer aktiviert als auch von HNF4 stärker reprimiert.

COUP-TF1 aktiviert sowohl den PräC- als auch den Core-Promotor sehr stark. Die 8-bp-Deletion schwächt den Effekt auf den PräC-Promotor ab, verstärkt jedoch noch den Effekt auf den Core-Promotor.

4.5 Bindung von HNF1 an die Oligonukleotide mit und ohne 8-bp-Deletion

Eines der Ziele dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob durch die 8-bp-Deletion eine neue HNF1-Bindungsstelle entsteht. Der EMSA stellt ein geeignetes Verfahren dar, um diese Annahme direkt zu untersuchen.

Das Kernextrakt wurde aus HepG2-Zellen gewonnen, von welchen bekannt ist, daß sie den Transkriptionsfaktor HNF1 produzieren. Außerdem wurden noch zusätzlich HepG2-Zellen verwendet, in welche HNF1 hineintransfiziert wurde. Dadurch ist eine größere Menge an HNF1 vorhanden, und die Bande des DNA-Protein-Komplexes sollte noch deutlicher hervortreten. Bei den jeweils etwas abgeänderten Versuchsbedingungen sollte die Sequenz mit der 8-bp-Deletion, der Wildtyp und zusätzlich als Kontrolle eine HNF1-Konsensussequenz miteinander verglichen werden. Hierfür wurden die Oligonukleotide „Variante“ und „Wildtyp“ verwendet, welche die entsprechenden Sequenzen beinhalten. Als Positivkontrolle diente eine HNF1-Konsensussequenz, die der Sequenz der HNF1-Bindungsstelle im humanen Albumin-Promotor entspricht.

Als spezifischer Antikörper gegen HNF1 diene RAD1, der an den Transkriptionsfaktor HNF1 bindet. Durch seine Zugabe sollte ein Supershift erreicht werden. Als Negativkontrolle wurde der unspezifische Antikörper α -AKD verwendet.

4.5.1 EMSA1 mit den Oligonukleotiden Wildtyp Pos.1756-1778 und der 8-bp-Deletion Pos.1763-1770

Um zu untersuchen, ob im Bereich der 8-bp-Deletion möglicherweise transkriptionsaktive Faktoren binden, wurde ein EMSA (Abbildung 4.13) durchgeführt. Hierzu wurden die mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP radioaktiv markierten Oligonukleotide mit 10000 Counts pro Min. eingesetzt.

In Spur 1 bis 3 sieht man die drei verschiedenen Oligonukleotide im Vergleich zueinander ohne den Zusatz von Kernextrakt: Die Variante mit 17 Basenpaaren wandert schneller im Polyacrylamidgel als der Wildtyp mit 24 Basenpaaren, dagegen langsamer als die HNF1-Konsensussequenz mit 13 Basenpaaren. Außer den einzelnen Banden der Oligonukleotide sind keine weiteren Banden zu sehen. In Spur 4 bis 6 wurde nun Kernextrakt aus unbehandelten HepG2-Zellen hinzugegeben. Spur 4 mit der Variante zeigt keine veränderte Wanderungsgeschwindigkeit verglichen mit Spur 1. Demgegenüber sieht man in Spur 5, verglichen mit Spur 2, eine zusätzliche schwache Bande (Zusatzbande). Die HNF1-Konsensussequenz in Spur 6 zeigt eine starke Einzelbande (Gelretardation), hervorgerufen durch die Bindung von HNF1 an die HNF1-Konsensussequenz (HNF1-Bandshift). In den Spuren 7 bis 9 wurde nun Kernextrakt von mit HNF1 transfizierten Zellen verwendet. Sie wurden zusätzlich mit dem Antikörper RAD1 inkubiert, welcher ein HNF1-spezifischer Antikörper ist. Die HBV-spezifischen Oligonukleotide in den Spuren 7 und 8 zeigen kein verändertes Bandenmuster durch den HNF1-spezifischen monoklonalen Antikörper. In Spur 9 mit der HNF1-Konsensussequenz stellt man nun neben der HNF1-DNA-Bande als Shift noch eine weitere, jedoch schwächere Bande fest, die noch langsamer im Polyacrylamidgel wandert. Sie stellt die Bindung des spezifischen HNF1-Antikörpers RAD1 an den HNF1-DNA-Komplex dar und wird als Supershift bezeichnet. Zum letzten Dreieransatz in Spur 10 bis 12 wurde der unspezifische Antikörper α -AKD hinzugegeben. Hierbei zeigt sich keine Änderung des EMSA-Musters. Der Antikörper α -AKD bindet also keine Proteine, die eines der radioaktiv markierten Oligonukleotide binden.

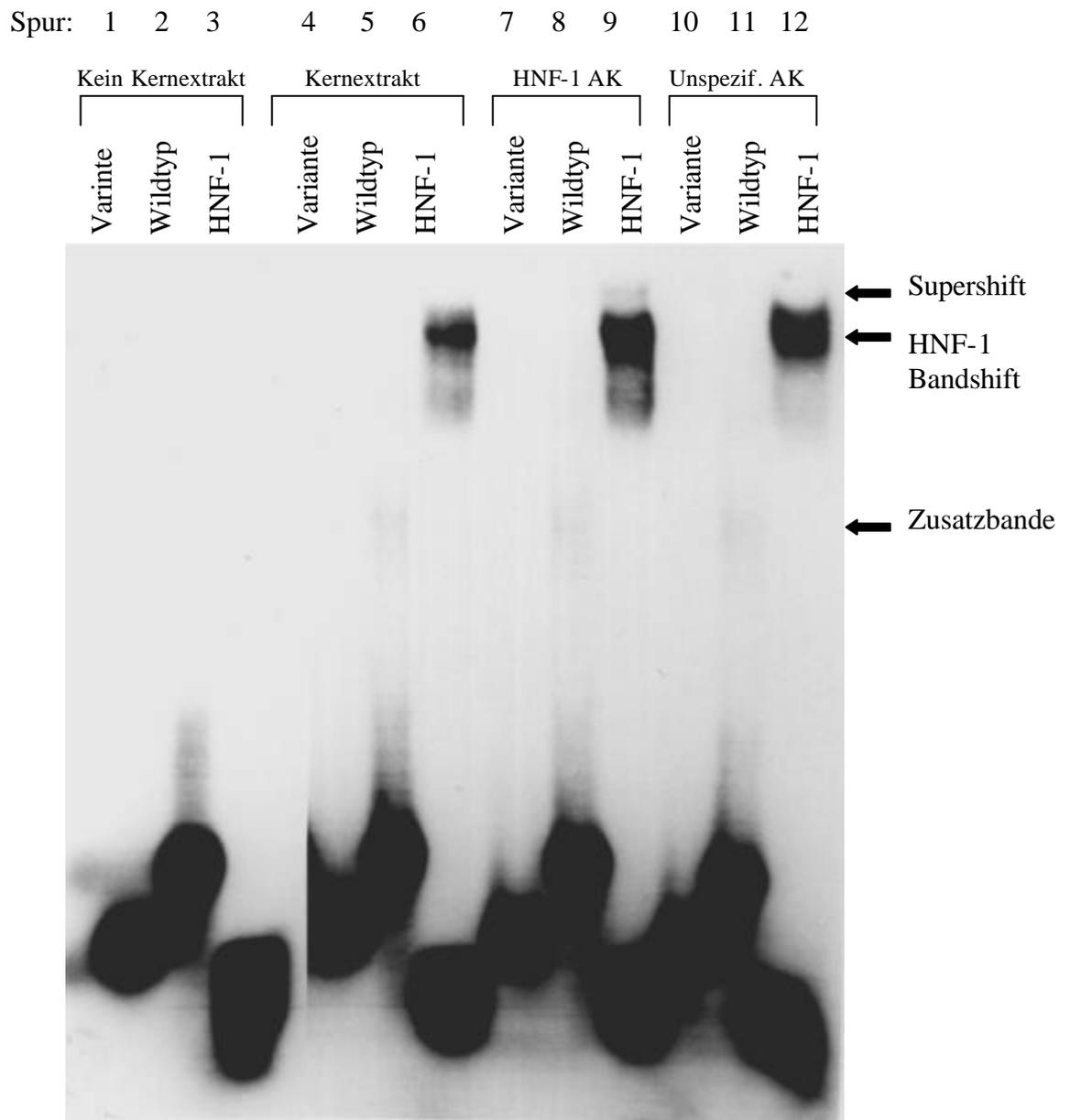


Abbildung 4.13: EMSA1 des Varianten-Oligos, Wildtyp-Oligos und des HNF1-consensus-Oligos mit dem Kernextrakt von HepG2-Zellen. Die Oligonukleotide wurden jeweils mit keinem Kernextrakt, mit HepG2-Kernextrakt und zusätzlich mit HNF-1-spezifischem und -unspezifischem Antikörper inkubiert.

4.5.2 EMSA2 als Wettbewerbsversuch an radioaktiv markiertem HNF1-Oligo

durch nicht markiertes Varianten-, Wildtyp- und HNF1-consensus-Oligo

Da in dem EMSA aus 4.5.1 kein Hinweis auf eine erkennbare Bindung von HNF1 an Wildtyp-HBV Pos.1756-1779 oder die 8-bp-Deletionsvariante sichtbar war, wurde nun untersucht, ob diese Oligonukleotide eventuell die Bindung von HNF1 an das HNF1-consensus-Oligonukleotid verhindern können. Hierbei werden verschiedene Mengen nicht radioaktiv markierter Oligonukleotide und eine konstante Menge radioaktiver HNF1-Konsensussequenz (50000 Counts pro Min.) vor der Zugabe des DNA-bindenden-Proteins miteinander gemischt. Greift das nicht markierte Oligonukleotid in den Bindungsprozeß zwischen radioaktiv markierter Oligonukleotid-DNA und DNA-bindendem-Protein ein, so wird der Protein-DNA-Komplex in seiner Ausbildung gehindert. Ist es dagegen an der Reaktion unbeteiligt, so bleibt die Menge des gebildeten Protein-DNA-Komplexes unverändert. Durch die verschiedenen Konzentrationen nicht markierter DNA kann anhand der Veränderung der Menge des Protein-DNA-Komplexes die relative Affinität des Proteins zu jeder Wettbewerbs-DNA ermittelt werden (Abbildung 4.14).

In den Versuchen wurden zu den unterschiedlichen Verhältnissen der Oligonukleotide jeweils 15,0 µg Protein des HepG2-Kernextraktes, 1,0 µl dIdC, 0,7 µl Glycerin und 1,0 µl BSA hinzugefügt und dies mit Verdünnungspuffer C auf die Endmenge von 23,0 µl gebracht.

In den Spuren 1 bis 4 wurde jeweils radioaktiv markiertes HNF1-consensus-Oligonukleotid mit nicht markiertem Wildtyp-Oligonukleotid im Verhältnis 1:100, 1:50, 1:10 und 1:5 eingesetzt. Hierbei zeigen sich im Verlauf der unterschiedlich eingesetzten Wildtypmengen keinerlei Veränderungen in der Bandenstärke.

Die Spuren 5 bis 8 zeigen nun den Effekt des radioaktiven HNF1-Oligonukleotids bei der Zugabe von nicht markiertem Varianten-Oligonukleotid im Verhältnis 1:100, 1:50, 1:10, 1:5. Hierbei sieht man eine Konkurrenz ebenfalls erst ab einem Verhältnis von 1:50, etwas stärker noch bei 1:100. Der Effekt ist jedoch insgesamt schwächer als bei der Zugabe von HNF1-consensus-Oligonukleotid, was bedeutet, daß die Bindung des Varianten-Oligos an die HNF1-Konsensussequenz zwar vorhanden, aber relativ schwach ist.

In den Spuren 9 bis 12 wird die Zugabe von jeweils radioaktivem zu kaltem HNF1-consensus-Oligonukleotid im Verhältnis 1:100, 1:50, 1:10 und 1:5 untersucht. Erst ab einem 50-fachen Überschuß des nicht markierten HNF1-Oligonukleotides ist eine deutliche Konkurrenz zu sehen, die bei einem Überschuß von 100 fast komplett ist. Die Konkurrenz von kaltem zu heißem HNF1-Oligonukleotid ist zu erwarten gewesen.

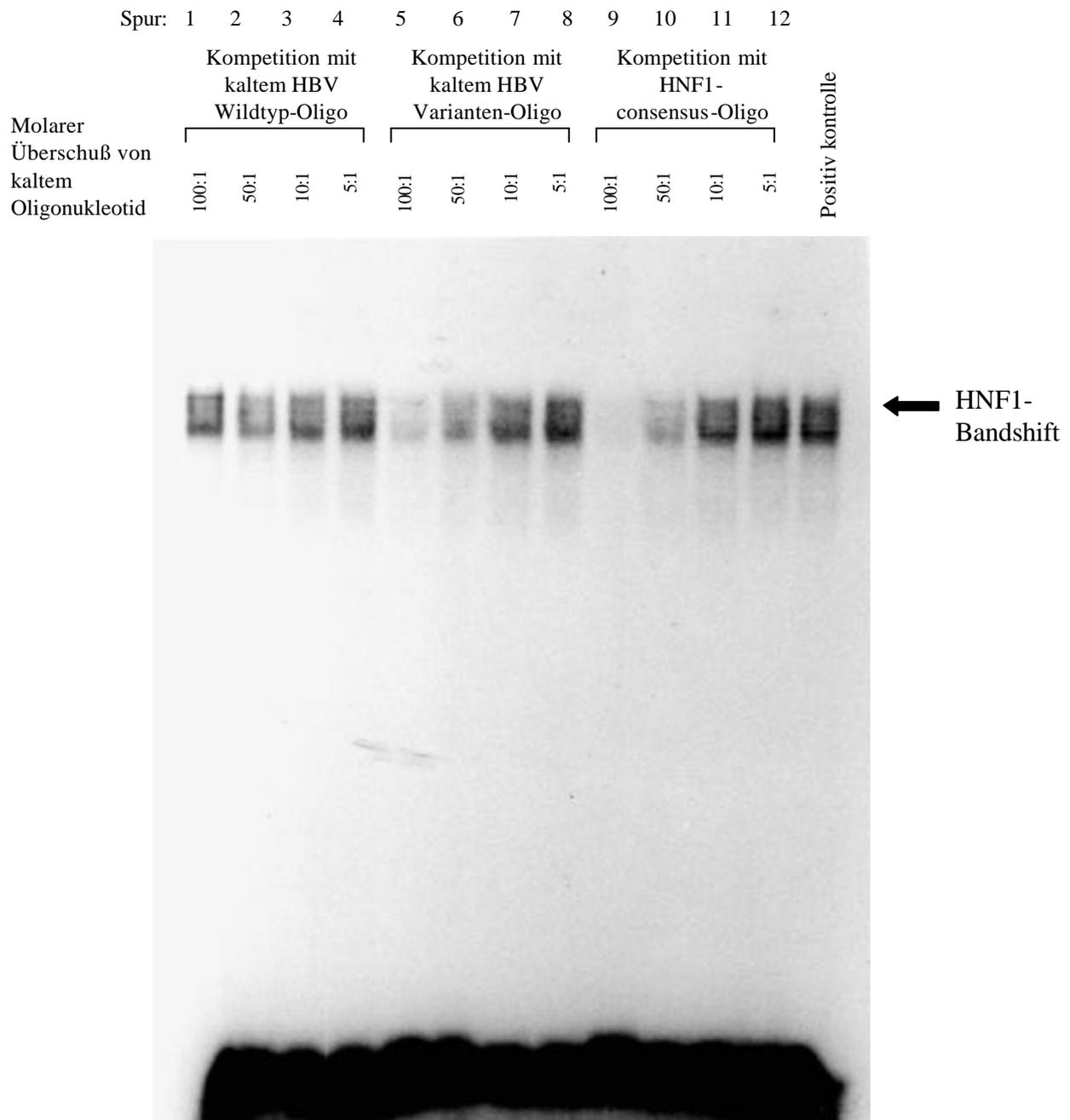


Abbildung 4.14: EMSA2 als Konkurrenz der Bindung von HNF1 an das radioaktiv markierte HNF1-consensus-Oligo durch nicht radioaktiv markiertes Varianten-Oligo, Wildtyp-Oligo und HNF1-consensus-Oligo. Es wurden aufsteigende Konzentrationen der nicht markierten Oligos verwendet.

5 Diskussion

5.1 Funktion des HBx-offenen-Leserahmens

Die Deletion der Basen Pos. 1763-1770 in einer häufig vorkommenden Variante des HBV-Genoms, war Gegenstand dieser Arbeit. Sie betrifft den Core-Promotor/Enhancer II und den Carboxyterminus des HBx-Proteins. Durch die Deletion entsteht eine Leserasterverschiebung, die zum Wegfall der Aminosäuren (AS) 134-154 führt (Repp et al., 1992). Zusätzlich werden 5 AS durch diese Leserasterverschiebung hinzugefügt. Die Luciferase-Versuche in Abschnitt 4.4.2 zeigen, daß dieses Varianten-HBx, im Gegensatz zum Wildtyp-HBx, zwar eine geringere aber immer noch deutliche Fähigkeit hat zu transaktivieren. Diese Funktionsabnahme entspricht den Erwartungen von Kumar et al. (1996) nur teilweise, nämlich daß eine carboxyterminale Deletion von nur 15 AS (Übersicht in Yen et al., 1996) normalerweise die Transaktivierungsaktivität von HBx beseitigt. Bei einem hohen Überschuß an Varianten-HBx zu Reporterplasmid, wie in vorliegenden Versuchen um das 15-fache, wurde allerdings dennoch eine Transaktivierung beobachtet (Kumar et al., 1996). Die Ergebnisse sprechen dafür, daß je nach Transkriptionselement unterschiedliche Teile von HBx wirksam werden.

In vitro wurden unter anderem noch zwei weitere Funktionen von HBx beschrieben: HBx wirkt alleine, unter Kontrolle seines natürlichen Promotors, transformierend (Seifer et al., 1991, [a]). Zuvor wurde schon von Shirakata et al. (1989) ein transformierender Effekt in der Zellkultur gezeigt. Dies stellte man auch in transgenen Mäusen (Lee et al., 1990; Terradillos et al., 1997) fest. Desweiteren induziert HBx Apoptose in vitro (Chirillo et al., 1997; Su et al., 1997; Schuster et al., 2000). R. Schuster (Dissertation, 1999) konnte zeigen, daß das Varianten-HBx mit der Deletion Pos. 1763-1770 nicht nur die Fähigkeit zur Transaktivierung, sondern auch die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion komplett verloren hat. Ob diese HBx-Variante onkogen ist, konnte noch nicht untersucht werden.

Festzuhalten ist, daß HBx in vitro für die Virusproduktion nicht nötig ist, für das Hervorrufen einer Infektion in vivo am Beispiel des Waldmurmeltieres ist es jedoch unentbehrlich. Nach vorläufigen Ergebnissen (Weiß und Hofschneider, pers. Mitteilung) wird HBx in vitro auch für die Infektion primärer humaner Hepatocyten durch HBV benötigt. Somit ist anzunehmen, daß HBV-Genome mit dieser und ähnlichen Deletionen nicht mehr alleine infektiös sind. Man kann jedoch nicht ausschließen, daß diese Varianten bei gemeinsamem Vorkommen mit dem Wildtypvirus trotzdem eine Infektion hervorrufen können. Für diese Annahme spricht, daß die

untersuchte Deletion im HBx (Pos.1763-1770) nie einen größeren Anteil als 50 % an der gesamten Virusmenge eines Individuums ausmacht (Günther et al., 1996; Nishizono et al., 1997; Schläger et al., in Revision).

5.2 Basisaktivität von transkriptionellen Elementen des Wildtypgenoms und der Deletionsvariante

Die Frage, auf welches der überlappenden DNA-Sequenz-Elemente die Deletion am stärksten wirkt bzw. ob sich die Effekte unterscheiden lassen, zeigt Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1: Expressionsaktivität von Wildtyp- und Varianten-Elementen in Reportergenkonstrukten mit Luciferase

	Wildtyp	Wildtyp (T/A 1762/64)	8-bp-Deletion
EnhII	1,0	n.d.	2,47
PräC-Promotor	1,0	n.d.	3,28
Core-Promotor	n.d.	1,0	2,80

In Versuchen mit den Reportergenen CAT und Luciferase zeigte sich, daß die 8-bp-Deletion im Enhancer II um den Faktor 2,47 aktiver war. Des weiteren wurde in Luciferase-Versuchen deutlich, daß sowohl der Varianten PräC-Promotor (Faktor 3,28) als auch der Varianten Core-Promotor (Faktor 2,80) jeweils eine höhere Expression aufwiesen.

Nach Günther et al. (1996) produzieren Mutationen im Core-Promotor/Enhancer II höhere Titer an intrazellulären Replikationszwischenprodukten. Weiterhin ist auch die Zahl HBV-DNA-haltiger Partikel im Kulturmedium um 50-400 % erhöht. Auch Baumert et al. (1996) konnten eine erhöhte Virusreplikation infolge von Mutationen im Core-Promotor nachweisen. Diese Ergebnisse können mit den hier dargestellten Beobachtungen in Zusammenhang gebracht werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß durch die 8-bp-Deletion aufgrund neu geschaffener Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren eine erhöhte Aktivität entsteht.

5.3 Effekte der Transkriptionsfaktoren HNF1 und HNF4 auf die Aktivität des Wildtyp- und Varianten-Enhancer II

Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF4 (Sladek et al., 1990) gehört zu der übergeordneten Kernrezeptorfamilie und beinhaltet eine Zinkfinger-Domäne und eine mögliche ligandenbindende-Domäne. HNF1 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des hepatocytischen Phänotyps; es wird angenommen, daß er eine übergeordnete Rolle in der Regulation der Expression anderer Transkriptionsfaktoren spielt (Mendel et al., 1991).

Man nimmt an, daß das Auftreten von Varianten mit neuer HNF1-Bindungsstelle im Core-Promotor bei einer schwachen Immunantwort begünstigt wird. Sie wurden aus Patienten isoliert, die unter Immunsuppression standen (Laskus et al., 1994, [a]; Günther et al., 1996; Pult et al., 1997) und, wie die in der vorliegenden Arbeit, aus Kindern mit hämatologischen Erkrankungen (Repp et al., 1992). HNF1-Varianten scheinen einen Selektionsvorteil zu haben, wenn das Immunsystem unterdrückt wird, und umgekehrt einen Nachteil bei Stimulation des Immunsystems. Unter Immunsuppression können die Zellen, die mit Virus infiziert sind, nicht in adäquater Weise eliminiert werden, dabei haben die Varianten gegenüber dem Wildtyp durch ihre gesteigerte Virus-DNA-Synthese einen Vorteil, was dann zu einem erhöhten Variantenanteil führt. Bei Patienten unter Immunsuppression scheint die Akkumulation der HNF1-Variante, die einen Anteil von 90 % der Viruspopulation ausmacht, mit einer schnelleren Leberdestruktion verbunden zu sein (Günther et al., 1996; Pult et al., 1997). Es ist denkbar, daß die HNF1-Varianten bei Anwendung von immunsuppressiven Medikamenten (Lau et al., 1992; McMillan et al., 1995) eine erhöhte Replikation und Genexpression aufweisen, die zu einer Akkumulation von Virusprotein in Zellen führen. Dies mag zu direkter Cytopathogenität führen (Roingeard et al., 1990) oder für Cytokine sensibilisieren (Gilles et al., 1992; Nakamoto et al., 1997).

Günther et al. (1996) konnten nun zeigen, daß Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen im Core-Promotor neue Bindungsstellen für den heptonukleären Faktor HNF1 im HBV-Genom erzeugen. Dadurch ergab sich eine gesteigerte Sekretion von HBV-DNA in den Überstand von transfizierten Zelllinien. Die Deletion Pos.1763-1770 (Günther et al., 1996) hatte folgenden Effekt: Eine Zunahme der HBV-DNA-Expression und eine Abnahme des HBe/HBcAg-Verhältnisses. Die meisten weiteren Deletionen fanden sich im Core-Promotor in der Nähe der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Zellkernrezeptorfamilie wie zum Beispiel HNF4 und COUP-TF1 (Yu und Mertz, 1996; Yu und Mertz, 1997). Modifikationen dieser Bindungsstellen können die Regulation des PräC-Promotors beeinflussen (Yu und Mertz, 1996;

Günther et al., 1996). Eine Bindung von HNF4 in diesem Bereich und somit eine Regulation des PräC-Promotors konnte gezeigt werden (Raney et al., 1997).

Es sollte der Mechanismus der Regulation der Replikation von HBV im Zusammenhang mit der 8-bp-Deletion Pos.1763-1770 (Repp et al., 1992) im Hinblick auf die Transkription von Enhancer II, PräC- und Core-Promotor untersucht werden. Zuerst wurde der Effekt von HNF1 und HNF4 auf den Varianten-Enhancer II bzw. Wildtyp-Enhancer II untersucht. Bei der 8-bp-Deletion zeigten sowohl HNF1 als auch HNF4 keine signifikante Zunahme der Aktivität. Beim Wildtyp stellte man bei HNF4 sogar eine geringe Repression fest. Somit wird deutlich, daß der Enhancer II für die Bindung der Transkriptionsfaktoren HNF1 und HNF4 nur eine untergeordnete Rolle spielt. Anders verhält es sich mit dem PräC- bzw. Core-Promotor. Der PräC-Promotor, kotransfiziert mit HNF1, zeigt beim Wildtyp eine Zunahme der Aktivität um den Faktor 2,16, bei der Variante um den Faktor 3,21. Der Wildtyp ändert dagegen durch HNF4 seine Aktivität nicht, während die Variante durch HNF4 um 50 % reprimiert wird. Auch der Einsatz unterschiedlicher Mengen an Transkriptionsfaktoren führt zu prinzipiell gleichen Ergebnissen. Bei den Versuchen mit dem Core-Promotor verhält es sich prinzipiell ähnlich. Abschließend stellt man fest, daß sowohl HNF1 als auch HNF4 keinen wesentlichen Einfluß auf die Expression von Enhancer II/Core-Promotor sowohl beim Wildtyp als auch bei der Variante aufweisen.

5.4 Untersuchung einer HNF1-Bindungsstelle im EMSA

Frau Dr. T. Tolle (Virologie, Universität Essen) und Herr Dr. H. Stumpf (Institut für Zellbiologie, Universität Essen) entdeckten in bislang unveröffentlichten Versuchen zwei HNF1-Bindungsstellen im Enhancer II des WHV. An homologen Stellen im HBV-Enhancer II fanden sie die 5'-Hälfte der HNF1-Bindungsstelle. Durch die 8-bp-Deletion von Pos.1763-1770 entsteht eine Sequenz, die eine Homologie zu einer HNF1-Bindungsstelle in 10 von 14 Basenpaaren aufweist. HNF1 bindet an die Sequenz des Palindroms GTTAATNATTAAC (Courtois et al., 1988) als Homodimer (Frain et al., 1989).

In den durchgeführten EMSAs konnte die HNF1-Bindungsstelle nicht nachgewiesen werden. Im EMSA1 wird dies deutlich (siehe Abbildung 4.13). Die relativ schwache Zusatzbande, die beim Wildtyp-Oligonukleotid bei Inkubation mit Kernextrakt entsteht, wandert signifikant schneller als die durch das HNF1-consensus-Oligonukleotid bei Inkubation mit Kernextrakt erzeugte Bande,

die als Komplex zwischen HNF1-consensus-Oligonukleotid und dem im Kernextrakt enthaltenen Transkriptionsfaktor HNF1 zu sehen ist. Somit müssen die Proteine, welche an den Wildtyp binden, ein geringeres Molekulargewicht als der Transkriptionsfaktor HNF1 haben. Da bei der Variante diese Bindung nicht zu sehen ist, kann man annehmen, daß durch den Wegfall dieser 8 Basenpaare im Bereich des Core-Promotors eine Bindungsstelle für diese Proteine entfällt, und somit auch keine Bande als Komplex zwischen DNA und Protein sichtbar ist. Im EMSA2 (siehe Abbildung 4.14), angelegt als Kompetitionsversuch zwischen radioaktiv markiertem HNF1-consensus-Oligonukleotid und nicht markierten Oligonukleotiden, konnte gezeigt werden, daß das Varianten-Oligonukleotid mit der Bindung von HNF1 an das radioaktiv markierte HNF1-consensus-Oligonukleotid kompetitiert. Dies jedoch erst ab einem Überschuß von 1:50, was für eine eher schwache Bindung spricht. Dagegen zeigt sich beim Wildtyp keinerlei Competition, was nahelegt, daß die Wildtyp-Sequenz keine Bindung an die HNF1-Konsensussequenz aufweist.

5.5 Einfluß des Transkriptionsfaktors COUP-TF1

COUP-TF1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zur übergeordneten Familie der Steroid-/Thyroidhormonrezeptoren gezählt wird (Wang et al., 1989). Mehrere COUP-Transkriptionsfaktoren bilden eine Familie aus funktionell in Beziehung stehenden Transkriptionsfaktoren (Wang et al., 1991). Sie stehen auch mit weiteren Mitgliedern der übergeordneten Familie wie z.B. HNF4 in Verbindung, mit welchen sie unter Umständen um die Bindungsstelle kompetieren (Qiu et al., 1996). Eine Übersicht über die Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren ist in der Einleitung in Abbildung 1.3 dargestellt. Innerhalb der Kernrezeptorfamilie gehen verschiedene Partner gelegentlich eine Heterodimerisierung ein, wobei die Funktion von COUP-TF nicht beeinflusst wird, wohl aber die Aktivierung der Partner verringert werden kann (Leng et al., 1996). COUP-TF spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der embryonalen Organentwicklung, der neuronalen Entwicklung und der zellulären Differenzierung (Leng et al., 1996).

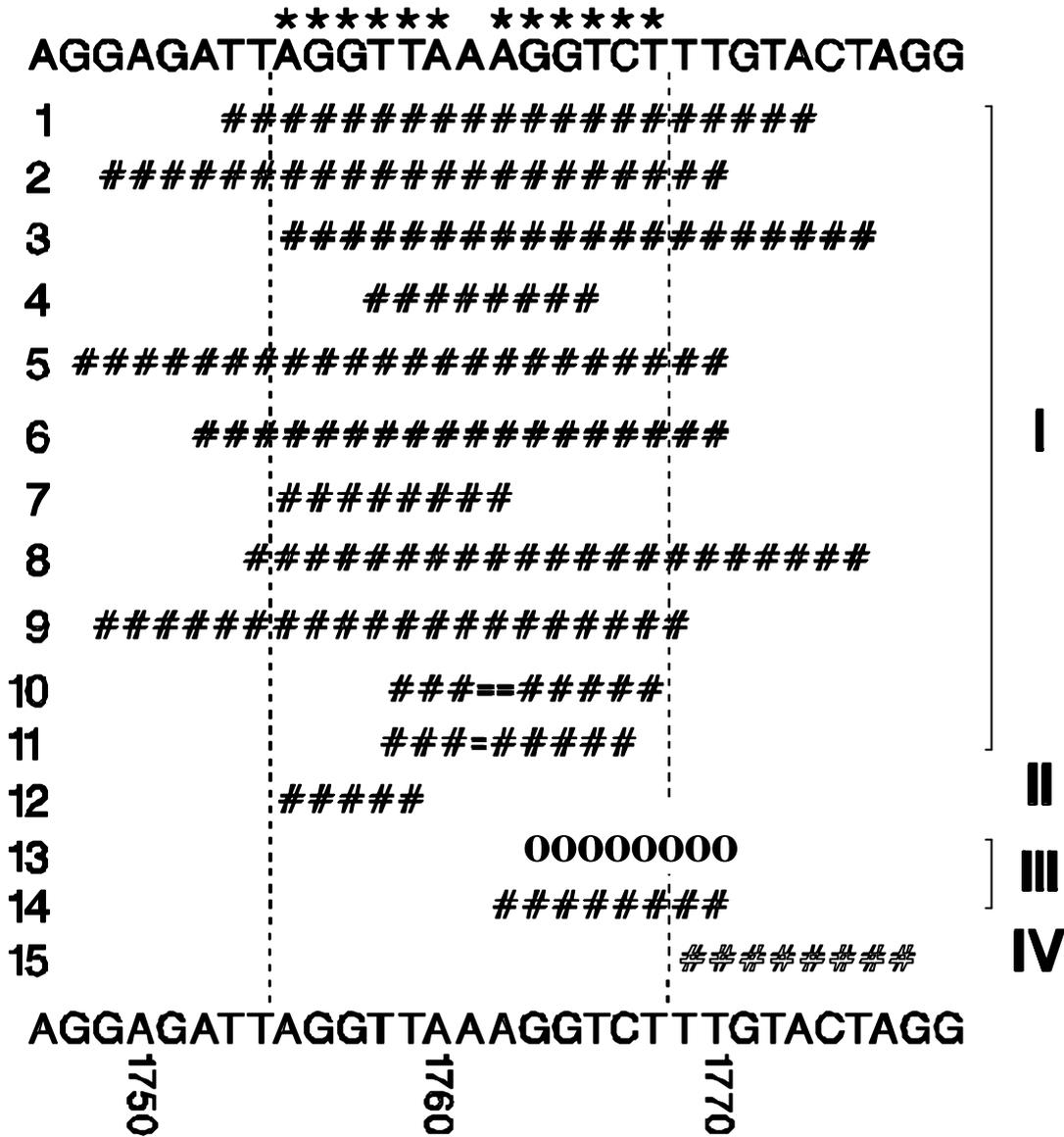


Abbildung 5.1: Deletionen im Core-Promotor von Patienten (Nr. 1-15) mit chronischer Hepatitis B. Bindungsstelle der Transkriptionsfaktoren HNF1 und COUP-TF1 zwischen den gestrichelten Linien, modifiziert nach Kidd-Ljunggren et al. (1997). Dabei entspricht die Deletion Nr. 13 (dargestellt als Kreise) der in dieser Arbeit untersuchten 8-bp-Deletion.

Die Deletion der Pos.1763-1770, die Repp et al. 1992 erstmalig beschrieben hatten, und die später unter anderem von Schläger et al. (in Revision) und Günther et al. (1996) in vielen Patientenseren nachgewiesen wurde, hatte den Effekt einer Zunahme der HBV-DNA-Expression

und Abnahme des HBe/HBcAg-Verhältnisses (Günther et al., 1996). Interessanterweise befindet sich die Deletion im Core-Promotor im Bereich der Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptor-Familie (Yu und Mertz, 1996; Yu und Mertz, 1997) wie zum Beispiel HNF4 und COUP-TF1, deren Bindung dies erklären könnte.

Die Deletionen in diesem Bereich können in vier Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 5.1): Gruppe 1 zerstört die Bindungsstelle vollständig, Gruppe 2 bewirkt eine Deletion der 5'-Hälfte der COUP-TF1-Bindungsstelle, Gruppe 3 zerstört die stromabwärts gelegene Hälfte der Bindungsstelle und Gruppe 4 liegt außerhalb der COUP-TF1-Bindungsstelle.

In EMSAs (Buckwold et al., 1997; Raney et al., 1997) konnte gezeigt werden, daß COUP-TF1 an die Nukleotide Pos.1755-1768 bindet. COUP-TF1 reprimiert normalerweise die Transkriptionswirkung zellulärer Promotoren, obwohl auch eine schwache Transaktivierung beobachtet wurde (Leng et al., 1996). Die Repression durch COUP-TF1 wird dabei durch transkriptionelle Korepressoren, Kernrezeptor-Korepressoren und Mediatoren des Retinsäure- und Thyroidhormon-Rezeptors vermittelt (Shibata et al., 1997).

Dagegen konnte in den vorliegenden Untersuchungen nach Kotransfektion mit COUP-TF1 sowohl beim Wildtyp als auch bei der Varianten eine starke Aktivierung des Core- und PräC-Promotors festgestellt werden. Der Enhancer II dagegen wurde bei Kotransfektion des Wildtyps mit COUP-TF1 herunterreguliert. Dies ist in Tabelle 5.2 dargestellt. Yu und Mertz (1997) fanden, daß der Core- und PräC-Promotor im Zusammenwirken mit dem Wildtyp-Enhancer II in transienten Luciferase-Versuchen durch COUP-TF1 reprimiert wurden.

Tabelle 5.2: Vergleich des Effekts von COUP-TF1 auf die Expression von PräC-Promotor, Core-Promotor und Enhancer II

	Wildtyp	8-bp-Deletion	Verhältnis Wildtyp : Variante
PräC-Promotor	30,17	16,90	1 : 0,54
Core-Promotor	7,40	30,81	1 : 4,16
Enhancer II	0,12	n.a.	n.a.

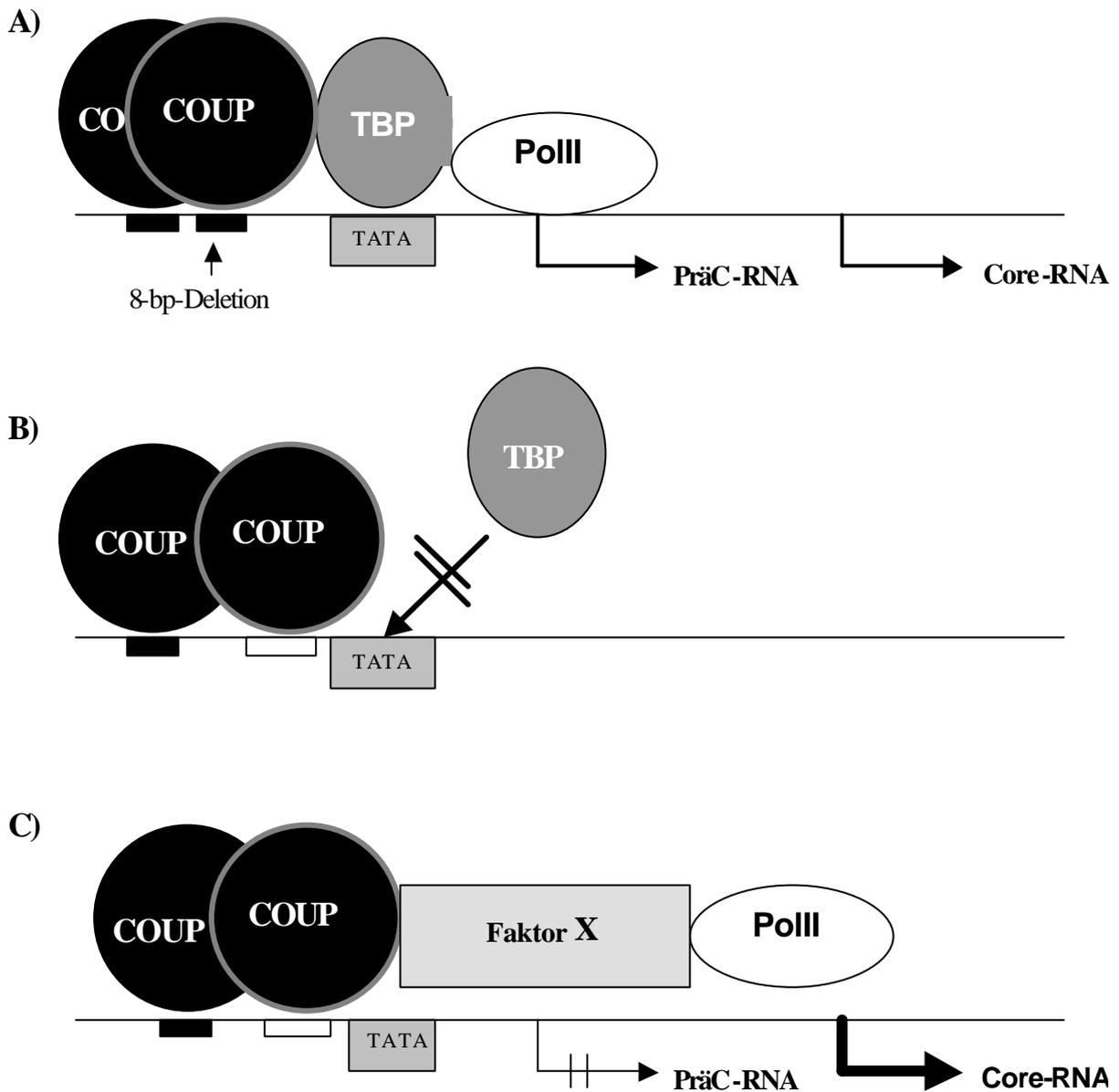


Abbildung 5.2: Auswirkung einer veränderten halben Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor COUP-TF1 auf die Bildung von PräC- und Core-RNA. A) Darstellung beim Wildtyp: COUP-TF1 bindet an zwei halbe Bindungsstellen. Die Bindung von TATA-Box-bindendem-Protein (TBP) an die TATA-Box ist möglich und die Polymerase II wirkt auf den Bereich des PräC-Starts. B) Durch die 8-bp-Deletion entsteht eine veränderte Bindungsstelle für COUP-TF1 (weißer Kasten), wodurch TBP aus sterischen Gründen nicht mehr an die TATA-Box binden kann. C) Ein unbekannter Faktor X bindet nun an diesen Bereich und verschiebt die Polymerase II zum Core-Gen.

Obwohl sich durch die 8-bp-Deletion das stromabwärts liegende Hemipalindrom, das für die Bindung von COUP-TF1 gebraucht wird, ändert, wird die Variante des Core-Promotors durch COUP-TF1 stärker als der Wildtyp aktiviert. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Replikation durch COUP-TF1 ist, daß der Transkriptionsfaktor an zwei halbe Bindungsstellen bindet, die 10 bis 20 bp voneinander entfernt liegen. Durch die Deletion wird die 3'-Hälfte des Palindroms, das für die COUP-TF1-Bindung notwendig ist, entfernt (Abbildung 5.2).

COUP-TF1 bindet als Dimer bevorzugt an das Palindrom mit der Sequenz GGTC A, getrennt durch ein Nukleotid (Cooney et al., 1992; Tsai and Tsai, 1997). Die Bindung kommt auch zustande, wenn die Hemipalindrome bis zu 13 bp getrennt sind (Tsai and Tsai, 1997). Cooney et al. (1992) konnten zeigen, daß COUP-TF1-Dimere auch an eine der Sequenz GGTC A ähnliche Sequenz binden können. Bei Zustandekommen dieser Bindung würde COUP-TF1 die Bindung des TATA-Box-bindenden-Proteins (TBP) aus sterischen Gründen blockieren. Wenn TBP nicht binden könnte wäre es möglich, daß ein bis jetzt unbekannter Faktor X an diesen DNA-Bereich und COUP-TF1 bindet und durch seine räumliche Ausdehnung die Polymerase II somit zum Core-Gen schiebt. Da dies bei der Variante mit der 8-bp-Deletion der Fall sein könnte, wäre durch die fehlende Bindung von TBP und die verminderte Aktivität der TATA-Box der Transkriptionsbeginn von PräC-RNA herunterreguliert, was somit auch die verminderte Bildung von PräC-RNA im Vergleich zum Wildtyp erklären würde. Die dazu im Vergleich vermehrt exprimierte Core-RNA wird möglicherweise durch einen anderen unbekanntem Faktor vermittelt.

Im EMSA war keine Bindung eines nukleären Faktors an das Varianten-Oligonukleotid, welches relativ kurz ist, zu sehen. Es beinhaltet aber nur die 5'-gelegene Hälfte, nicht jedoch die etwa 20 bp stromabwärts gelegene hypothetische 3'-Hälfte. Die Kernextrakte wurden aus HepG2-Zellen gewonnen, die COUP-TF1 enthalten (M.Tsai, persönliche Mitteilung).

5.6 Effekt der 8-bp-Deletion auf die Transkription und Replikation

Mutationen und Deletionen im Enhancer II/Core-Promotor verändern immer auch die Sequenz des HBx-ORF. R. Schuster (Dissertation, 1999) konnte zeigen, daß ein HBx-ORF mit einer Deletion der Basen 1763-1770 seine pro-apoptotische Aktivität komplett verloren hatte. Die vorliegenden Ergebnisse unter Verwendung des gleichen HBx-Varianten-Vektors zeigten, daß die Deletion der Basen 1763-1770 auch den transkriptionsstimulierenden Effekt deutlich reduzierte.

Interessanterweise wird die Deletion der Basen 1763-1770 gehäuft bei immunsupprimierten Personen beobachtet (Repp et al., 1993, [b]; Günther et al., 1996). Dies könnte als Hinweis verstanden werden, daß HBx zur Etablierung einer chronischen Infektion im immunkompetenten Wirt benötigt wird, dessen hypothetische immunevasive Aktivitäten in immunsupprimierten Virusträgern aber entbehrlich sind.

Möglich erscheint aber auch, daß die 8-bp-Deletion zwar die Funktion des HBx beeinträchtigt, der primäre Vorteil für das Virus wäre jedoch eine verstärkte Transkription der Core-RNA die mittelbar zu einer verstärkten Virämie (Günther et al., 1996) führen könnte. Weiterhin zeigt sich durch die 8-bp-Deletion auch eine verminderte Expression des HBeAg. Auch dies könnte zu einer verstärkten Virämie in betroffenen immunsupprimierten Patienten führen, da in vitro HBV-Mutanten, die kein HBe exprimierten, etwa 10fach stärker replizierten als die Wildtyp-Kontrollen (Lamberts et al., 1993). Eine verminderte oder fehlende Expression von HBeAg könnte jedoch nur bei immunsupprimierten Patienten toleriert werden, da HBe zur Etablierung der chronischen Infektion benötigt wird (Milich et al., 1997).

6 Zusammenfassung

Der Core-Promotor/Enhancer II des Hepatitis B Virus ist gehäuft von Mutationen betroffen. Aus Untersuchungen anderer Gruppen ist bekannt, daß dadurch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren entstehen oder wegfallen können. Hierdurch wird die Expression und Replikation des viralen Genoms beeinflusst. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Variante mit der 8-Basenpaar-Deletion der Nukleotide 1763-1770 wird häufig bei immundefizienten bzw. immuntoleranten Virusträgern gefunden.

Durch diese Mutation entsteht eine Sequenz, die eine neuartige Bindungsstelle für den hepatischen nukleären Faktor 1 (HNF1) darstellen könnte. Um dies näher zu untersuchen, wurde in einem Elektrophoretic-Mobility-Shift-Assay die Bindung von HNF1 an die Variante und den Wildtyp untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß in der Variante tatsächlich eine neue, wenn auch schwache HNF1-Bindungsstelle entsteht.

Um die transaktivierende Wirkung des ebenfalls betroffenen verkürzten X-Gens der Variante mit der des Wildtyp-X zu vergleichen, wurden Konstrukte mit und ohne 8-bp-Deletion konstruiert. Daraufhin wurde die transaktivierende Wirkung des X-Genprodukts auf den SV40-Promotor in Versuchen mit Luciferase als Reportergen auf die Expression gemessen. Dabei ergab sich eine schwächere Aktivität der Variante.

Desweiteren wurde der Einfluß der Transkriptionsfaktoren HNF1, HNF4 und COUP-TF1 auf die Promotoren mit der 8-bp-Deletion untersucht. Hierzu wurden jeweils für den Wildtyp und die Variante der Core- und PräC-Promotor in Luciferasevektoren kloniert. In Luciferase-Versuchen ergab sich, daß sowohl HNF1 als auch HNF4 die Expression des Core-Promotor/Enhancer II nur unwesentlich beeinflussen.

Interessanterweise transaktivierte COUP-TF1 sowohl den PräC- als auch den Core-Promotor des Wildtyps und der Variante sehr stark, solange der Enhancer II in den Konstrukten nicht vorlag. Untersuchungen aus unserer Gruppe zeigten dagegen, daß die reinen Enhancer II-Konstrukte ohne Promotor durch COUP-TF1 reprimiert wurden. Andere Gruppen haben die Wirkung von COUP-TF1 nur auf solche Konstrukte untersucht, die sowohl den Enhancer II als auch die PräC- und Core-Promotoren enthielten. Hierbei wurde nur Repression gefunden. In diesem System wirkt also der Enhancer II als Silencer. In der natürlichen HBV-Infektion ist jedoch der Core-Promotor sehr aktiv, so daß die hier vorliegenden Befunde relevanter erscheinen.

7 Literatur

Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. und Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**, 615-618.

Almeida, J. D., Rubenstein, D. und Stott, E. J. (1971). New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* **II**, 1225-1227.

Arii, M., Takada, S. und Koike, K. (1992). Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene* **7**, 397-403.

Asahina, Y., Enomoto, N., Ogura, Y., Sakuma, I., Kurosaki, M., Izumi, N., Marumo, F. und Sato, C. (1996). Complete nucleotide sequences of hepatitis B virus genomes associated with epidemic fulminant hepatitis. *J. Med. Virol.* **48**, 171-178.

Bahn, A., Gerner, P., Martine, U., Bortolotti, F. und Wirth, S. (1997). Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HBsAg to anti-HBs indicating viral persistence. *J. Hepatol.* **27**, 973-978.

Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1988). The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked-protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J.* **7**, 4185-4192.

Baumert, T. F., Rogers, S. A., Hasegawa, K. und Liang, T. J. (1996). Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J. Clin. Invest.* **98**, 2268-2276.

Beasley, R. P., Lin, C. C., Hwang, L. Y. und Chien, C. S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22.707 men in Taiwan. *Lancet* **II**, 1129-1133.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Blum, H. E., Zhang, Z. S., Galun, E., von Weizsäcker, F., Garner, B., Liang, T. J. und Wands, J. R. (1992). Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J. Virol.* 66, 1223-1227.

Buckwold, V. E., Xu, Z., Chen, M., Yen, T. S. und Ou, J. H. (1996). Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J. Virol.* 70, 5845-5851.

Buckwold, V. E., Xu, Z., Yen, T. S. und Ou, J. H. (1997). Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 78, 2055-2065.

Charnay, P., Pourcel, C., Louise, A., Fritsch, A. und Tiollais, P. (1979). Cloning in *E. coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2222-2226.

Chen, H. S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R. W., Hornbuckle, W. E., Tennant, B. C., Cote, P. J., Gerin, J. L., Purcell, R. H. und Miller, R. H. (1993). The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J. Virol.* 67, 1218-1226.

Chirillo, P., Pagano, S., Natoli, G., Puri, P. L., Burgio, V. L., Balsano, C. und Levrero, M. (1997). The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8162-8167.

Chisari, F. V. und Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 29-60.

Colgrove, R., Simon, G. und Ganem, D. (1989). Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. *J. Virol.* 63, 4019-4026.

- Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. und Tsai, M. J. (1992). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) binds to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol. Cell Biol.* **12**(9), 4153-4163.
- Courtois, G., Baumhueter, S. und Crabtree, G. R. (1988). Purified hepatocyte nuclear factor1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7937-7941.
- Dane, D. S., Cameron, C. H. und Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet I* 695-698.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 725-737.
- Dejean, A., Sonigo, P., Wain Hobson, S. und Tiollais, P. (1984). Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5350-5354.
- Denecke, B., Bartkowski, S., Senkel, S., Klein-Hitpass, L. und Ryffel, G. U. (1993). Chimeric liver transcription factors LFB1 (HNF1) containing the acidic activation domain of VP16 act as positive dominant interfering mutants. *J. Biol. Chem.* **268**, 18076-18082.
- Fattovich, G., Brollo, L., Alberti, A., Pontisso, P., Giustina, G. und Realdi, G. (1988). Long-term follow-up of anti-HBe-positive chronic active hepatitis B. *Hepatology* **8**, 1651-1654.
- Feitelson, M. A., Lega, L., Guo, J., Resti, M., Rossi, M. E., Azzari, C., Blumberg, B. S. und Vierucci, A. (1994). Pathogenesis of posttransfusion viral hepatitis in children with beta-thalassemia. *Hepatology* **19**, 558-568.
- Ferrari, C., Penna, A., Bertoletti, A., Valli, A., Antoni, A. D., Giuberti, T., Cavalli, A., Petit, M. A. und Fiaccadori, F. (1990). Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Immunol.* **145**, 3442-3449.

Ferrari, C. (1991). Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J. Exp. Med.* **174**, 1565-1570.

Fink, L. J. (1997). Einfluß des Hepatitis B Virus X-Proteins auf Regulation und Funktion des Tumorsuppressorproteins p53. Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Fischer, M., Runkel, L. und Schaller, H. (1995). HBx protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit. *Virus Genes* **10**, 99-102.

Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stämpfli, S., Frank, R. und Cortese, R. (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* **59**, 145-157.

Gerlich, W. H. und Robinson, W. S. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* **21**, 801-809.

Gerlich, W. H. (1993). Structure and molecular virology. In: *Viral Hepatitis Scientific Basis and Clinical Management*, Zuckerman, A. J. und Thomas, H. C. (Hrsg.); Churchill & Livingstone; London; 83-113.

Gerner, P. H., Friedt, M., Oettinger, R., Lausch, E. und Wirth, S. (1998). The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children. *Virology* **245**, 163-172.

Gilles, P. N., Guerrette, D. L., Ulevitch, R. J., Schreiber, R. D. und Chisari, F. V. (1992). HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-gamma. *Hepatology* **16**, 655-663.

Gorman, C. M., Moffat, L. F. und Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **2**, 1044-1051.

Günther, S., Meisel, H., Reip, A., Miska, S., Krüger, D. H. und Will, H. (1992). Frequent and rapid emergence of mutated pre-C sequences in HBV from e-antigen positive carriers who seroconvert to anti-HBe during interferon treatment. *Virology* **187**, 271-279.

Günther, S., Li, B. C., Miska, S., Krüger, D. H., Meisel, H. und Will, H. (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletions mutants in immunosuppressed patients. *J. Virol.* **69**, 5437-5444.

Günther, S., Piwon, N., Iwanska, A., Schilling, R., Meisel, H. und Will, H. (1996). Type, prevalence and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J. Virol.* **70**, 8318-8331.

Gust, I. D., Burrell, C. J., Couplis, A. G., Robinson, W. S. und Zuckermann, A. J. (1986). Taxonomic classification of the human hepatitis B virus. *Intervirology* **25**, 14-29.

Hardie, D. R., Kannemeyer, J. und Stannard, L. M. (1996). DNA single strand conformation polymorphism identifies five defined strains of hepatitis B virus (HBV) during an outbreak of HBV infection in an oncology unit. *J. Med. Virol.* **49**, 49-54.

Haviv, I., Vaizel, D. und Shaul, Y. (1996). pX, the HBV-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a TAF-independent manner. *EMBO J.* **15**, 3413-3420.

Huang, J. K., Kwong, J., Sun, E. C. Y. und Liang, T. J. (1996). Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* **70**, 5582-5591.

Johnson, P. J., Wansbrough-Jones, M. H. und Portmann, B. (1978). Familial HBsAg positive hepatoma: treatment with orthotopic liver transplantation and specific immunoglobuline. *Br. Med. J.* **1**, 216

Kann, M., Thomssen, R., Köchel, H. G. und Gerlich, W. H. (1993). Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus. *Arch. Virol.* **8**, 53-62.

Kann, M. und Gerlich, W. H. (1998). Hepatitis B. In: Virology, Mahy, B. W. J. und Collier, L, eds. (London, Sydney, Auckland: Arnold), 745-773.

Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H. und Robinson, W. S. (1973). DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.* **12**, 995-1005.

Kekulé, A. S., Lauer, U., Weiss, L., Lubber, B. und Hofschneider, P. H. (1993). Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* **361**, 742-745.

Kidd-Ljunggren, K., Öberg, M. und Kidd, A. H. (1997). Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J. Gen. Virol.* **78**, 1469-1478.

Kingston, R. E. (1987). Harvest and Assay for Cloramphenicol Acetyltransferase. In: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. und Struhl, K. (Hrsg.). *Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988*. 9.6.1-9.6.6 Wiley and Sons, New York.

Koike, K., Shirakata, Y., Yaginuma, K., Arii, M., Takada, S., Nakamura, I., Hayashi, Y., Kawada, M. und Kobayashi, M. (1989). Oncogenic potential of hepatitis B virus. *Mol. Biol. Med.* **6**, 151-160.

Kremsdorf, D., Garreau, F., Capel, F., Petit, M. A. und Bréchet, C. (1996). In vivo selection of a hepatitis B virus mutant with abnormal viral protein expression. *J. Gen. Virol.* **77**, 929-939.

Kristie, T. M. und Roizman, B. (1986). $\alpha 4$, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is stably and specifically associated with promoter-regulatory domains of genes and/ or selected viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3218-3222.

Kumar, V., Jayasuryan, N. und Kumar, R. (1996). A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5647-5652.

- Lamberts, C., Nassal, M., Velhagen, I., Zentgraf, H. und Schroder, C. H. (1993). Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J. Virol.* 67, 3756-3762.
- Laskus, T., Rakela, J., Steers, J. L., Wiesner, R. H. und Persing, D. H. (1994, [a]). Precore and contiguous regions of hepatitis B virus in liver transplantation for end-stage hepatitis B. *Gastroenterology* 107, 1774-1780.
- Laskus, T., Rakela, J., Tong, M. J., Nowicki, M. J., Mosley, J. W., Persing, D. H. (1994, [b]). Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *J. Hepatol.* 20, 837-841.
- Lau, J. Y., Bain, V. G., Smith, H. M., Alexander, G. J. und Williams, R. (1992). Modulation of hepatitis B viral antigen expression by immunosuppressive drugs in primary hepatocyte culture. *Transplantation* 53, 894-898.
- Lee, T. H., Finegold, M. J., Shen, R. F., DeMayo, J. L., Woo, S. L. und Butel, J. S. (1990). Hepatitis B virus transactivator X protein is not tumorigenic in transgenic mice. *J. Virol.* 64, 5939-5947.
- Lee, T. H., Elledge, S. J. und Butel, J. S. (1995). Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein. *J. Virol.* 69, 1107-1114.
- Leng, X., Cooney, A. J., Tsai, S. Y. und Tsai, M. J. (1996). Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. *Mol. Cell Biol.* 16, 2332-2340.
- Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K. und Murakami, S. (1997). Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J. Biol. Chem.* 272, 7132-7139.
- Lopez-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K. Q. und Siddiqui, A. (1990). Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5069-5073.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Luckow, B. und Schütz, G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **15**, 5490.

Maguire, H. F., Hoeffler, J. P. und Siddiqui, A. (1991). HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* **252**, 842-844.

Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H., Robinson, W. S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2941-2945.

Mason, W. S., Seal, G. und Summers, J. (1980). Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* **36**, 829-836.

McMillan, J. S., Shaw, T., Angus, P. W. und Locarnini, S. A. (1995). Effect of immunosuppressive and antiviral agents on hepatitis B virus replication in vitro. *Hepatology* **22**, 36-43.

Mendel, D. B. und Crabtree, G. R. (1991). Minireview: HNF-1, a Member of a Novel Class of Dimerizing Homeodomain Proteins. *J. Biol.Chemistry.* **266**, 677-680.

Mendel, D. B., Hansen, L. P., Graves, M. K., Conley, P. B. und Crabtree, G. R. (1991). HNF-1a and HNF-1b (vHNF1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev.* **5**, 1042-1056.

Meyers, M. L., Trépo, L. V., Nath, N. und Sninsky, J. J. (1986). Hepatitis B polypeptide X: expression in *Escherichia coli* and identification of specific antibodies in sera from hepatitis B virus-infected humans. *J. Virol.* **57**, 101-109.

Milich, D. R., Jones, J. E., Hughes, J. L., Price, J., Raney, A. K. und McLachlan, A. (1990). Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6599-6603.

Milich, D. R., Schödel, F., Hughes, J. L., Jones, J. E. und Peterson, D. L (1997). The hepatitis B virus core and e antigen elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. J. Virol. 71, 2192-2201.

Moriyama, K. (1997). Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter. J. Gen. Virol. 78, 1479-1486.

Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 155, 335-350.

Murphy, B. L., Peterson, J. M. und Ebert, J. W. (1975). Immunofluorescent localisation of hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. Science 227, 429-432.

Nakamoto, Y., Guidotti, L. G., Paschetto, V., Schreiber, R. D. und Chisari, F. V. (1997). Differential target cell sensitivity to CTL-activated death pathways in hepatitis B virus transgenic mice. J. Immunol. 158, 5692-5697.

Nishizono, A., Kohno, K., Takita-Sonoda, Y., Hiraga, M., Terao, H., Fujioka, T., Nasu, M. und Mifune, K. (1997). Sequential analyses of the mutations in the core upstream and precore regions of hepatitis B virus genome in anti-HBe positive-carriers developing acute exacerbation. J. Med. Virol. 53, 266-272.

Nowaslawski, A., Krawczynski, K. und Brzosko, W. J. (1972). Tissue localisation of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. Ann. J. Pathol. 68, 31-48.

Penna, A., Chisari, F. V., Bertolotti, A., Missale, G., Fowler, P., Giuberti, T., Fiaccadori, F. und Popper, H. (1988). Viral versus chemical hepatocarcinogenesis. J. Hepatol. 6, 229-238.

Perbal, B. (1988). A practical guide to molecular cloning. 2nd edition, John Wiley & Sons (New York).

Peters, J. H., Baumgarten, H. und Schulze M. (1985). Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung. Springer (Heidelberg).

Pult, I., Chouard, T., Wieland, S., Klemenz, R., Yaniv, M. und Blum, H. E. (1997). A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology* **25**, 1507-1515.

Qiu, Y., Krishnan, V., Pereira, F. A., Tsai, S. Y. und Tsai, M. J. (1996). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors and their regulation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **56**, 81-85.

Raney, A. K., Johnson, J. L., Palmer, C. N. und McLachlan, A. (1997). Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J. Virol.* **71**, 1058-1071.

Rehermann, B., Pasquinelli, C., Mosier, S. M. und Chisari, F. V. (1995). Hepatitis B virus (HBV) sequences variations of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. *J. Clin. Invest.* **96**, 1527-1534.

Repp, R., Mance, A., Bertram, U., Niemann, H., Gerlich, W. H. und Lampert, F. (1991). Persistent hepatitis B virus replication in mononuclear blood cells as a source of reinfection of liver transplants [letter]. *Transplantation* **25**, 935.

Repp, R., Keller, C., Borkhardt, A., Csecke, A., Schaefer, S., Gerlich, W. H. und Lampert, F. (1992). Detection of a hepatitis B virus variant with a truncated X gene and enhancer II. *Arch. Virol.* **125**, 299-304.

Repp, R., Rhiel, S., Heermann, K. H., Schaefer, S., Keller, C., Ndumbe, P., Lampert, F. und Gerlich, W. H. (1993, [a]). Genotyping by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1095-1102.

- Repp, R., von Hörsten, B., Csecke, A., Kreuder, J., Borkhardt, A., Willems, W. R., Lampert, F. und Gerlich, W. H. (1993, [b]). Clinical and immunological aspects of hepatitis B virus infection in children receiving multidrug cancer chemotherapy. *Arch. Virol. Suppl.* **8**, 103-111.
- Roberts, J. D., Bebenek, K. und Kunkel, T. A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**, 1171-1173.
- Robinson, W. S. und Greenman, R. L. (1974). DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.* **13**, 1231-1236.
- Robinson, W. S. (1980). Genetic variation among hepatitis B and related viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 371-378.
- Robinson, W. S., Marion, P. L., Feitelson, M. und Siddiqui, A. (1982). The hepadna virus group: hepatitis B and related viruses. In: Szmuness, W., Alter, H. J. und Maynard, J. E. (Hrsg.). *Viral Hepatitis 1981 International Symposium*, **57-68**. Franklin Institute Press, Philadelphia.
- Roingeard, P., Romet-Lemonne, J. L., Leturcq, D., Goudeau, A. und Essex, M. (1990). Hepatitis B virus core antigen (HBcAg) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. *Virology* **179**, 113-120.
- Rossner, M. T. (1992). Review: hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator. *J. Med. Virol.* **36**, 107-117.
- Runkel, L., Fischer, M. und Schaller, H. (1993). Two-codon insertion mutations of the HBx define two separate regions necessary for its trans-activation function. *Virology* **197**, 529-536.
- Sattler, F. und Robinson, W. S. (1979). Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J. Virol.* **61**, 2280-2285.

Scaglioni, P. P., Melegari, M. und Wands, J. R. (1997). Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* **233**, 374-381.

Schaller, H. (1987). Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.* **63**, 904-911.

Schläger, F., Schaefer, S., Fischer, S., Lampert, F., Metzler, M., Gerlich, W. H. und Repp, R. (eingereicht). Quantitative DNA fragment analysis for detecting low amounts of hepatitis B virus deletion mutants in highly viremic carriers.

Schödel, F., Sprengel, R., Weimer, T., Fernholz, D., Schneider, R. und Will, H. (1989). Animal Hepatitis B Viruses. *Advances in Viral Oncology* **8**, 73-102.

Schuster, R., Gerlich, W. H. und Schaefer, S. (2000). Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* **19**, 1173-1180.

Schuster, R. (1999). Das Hepatitis-B-Virus X-Gen hemmt die Transformation primärer Rattenembryofibroblasten durch kooperierende Onkogene. Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Seifer, M., Höhne, M., Schaefer, S. und Gerlich, W. H. (1991, [a]). In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J. Hepatol.* **13** (Suppl. 4), 61-65.

Seifer, M., Höhne, M., Schaefer, S. und Gerlich, W. H. (1991, [b]). Malignant transformation of immortalized cells by hepatitis B virus DNA. In: Hollinger, F.B., Lemon, S.M. und Margolis, H.S. (Hrsg). *Viral Hepatitis-1990*. Williams and Wilkins New York.

Seifer, M., Zhou, S. und Standring, D. (1992). A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of hepatitis B virus capsids in *Xenopus* Oocytes. *J. Virol.* **67**, 249-257

Shibata, H., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. und Tsai, M. J. (1997). Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT). *Mol. Endocrinol.* **11**, 714-724.

Shirakata, Y., Kawada, M., Fujiki, Y., Sano, H., Oda, M., Yaginuma, K., Kobayashi, M. und Koike, K. (1989). The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells. *Jap. J. Canc. Res.* **80**, 617-621.

Siddiqui, A., Sattler, F. R. und Robinson, W. S. (1979). Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4664-4668.

Sladek, F. M., Zhong, W., Lai, E., Darnell, J. E. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* **4**, 2353-2364.

Sprengel, R., Kaleta, E. F., Will, H. (1988). Isolation and characterisation of hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* **62**, 3832-3839.

Su, T. S., Lai, C. J., Huang, J. L., Lin, L. H., Yauk, Y. K., Chang, C. M., Lo, S. J. und Han, S. H. (1989). Hepatitis B virus transcript produced by splicing. *J. Virol.* **63**, 4011-4018.

Su, F. und Schneider, R. J. (1997). Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8744-8749.

Summers, J., O'Connell, A. und Millman, J. L. (1975). Genome of hepatitis B virus: Restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4597-4601.

Summers, J., Smolec, J. M. und Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4533-4537.

Summers, J. (1984). Replication of hepatitis B viruses. In: Vyas, G. N., Dienstag, J. L. und Hoofnagle J. H. (Hrsg.). *Viral hepatitis and liver disease*: 87-96. Grune & Stratton, Orlando.

Suzuki, T., Masui, N., Kajino, K., Saito, I. und Miyamura, T. (1989). Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8422-8426.

Szmuness, W., Harley, E. J., Ikram, H. und Stevens, C. E. (1978). Socialdemographic aspects of the epidemiology of hepatitis B. In: Vyas, G. N. und Schmid, R. (Hrsg.). *Viral Hepatitis* (1. Aufl.), 297-320, Frankline Institute Philadelphia.

Takada, S., Kido, H., Fukutomi, A., Mori, T. und Koike, K. (1994). Interaction of hepatitis B virus X protein with a serine protease, tryptase TL2 as an inhibitor. *Oncogene* **9**, 341-348.

Terradillos, O., Billet, O., Renard, C. A., Levy, R., Molina, T., Briand, P. und Buendia, M. A. (1997). The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* **14**, 395-404.

Tiollais, P., Chanay, P. und Vyas, G. N. (1981). Biology of hepatitis B virus. *Science* **213**, 406-411.

Tran, A., Kremsdorf, D., Capel, F., Housset, C., Dauguet, C., Petit, M. A. und Bréchet, C. (1991). Emergence of and takeover by hepatitis B virus (HBV) with rearrangements in the pre-S/S and pre-C/C genes during chronic HBV infection. *J. Virol.* **65**, 3566-3574.

Tsai, S. Y. und Tsai, M. J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocrinol. Rev.* **18**, 229-240.

Twu, J. R. S. und Schloemer, R. S. (1987). Trans-activating function of hepatitis B virus. *J. Virol.* **61**, 3448-3453.

Wang, H. P. und Rogler, C. E. (1991). Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro. *J. Virol.* **65**, 2381-2392.

Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1989). COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* 340, 163-166.

Wang, L. H., Ing, N. H., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. and Tsai, M. J. (1991). The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Expr.* 1, 207-216.

Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R., Zahm, P., Hofschneider, P. H. und Koshy, R. (1988). The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 3, 169-177.

Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. und Koike, K. (1987). Hepatitis B Virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2678-2682.

Yang, W. und Summers, J. (1995). Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination. *J. Virol.* 69, 4029-4036.

Yang, W. G., Mason, W. S. und Summers, J. (1996). Covalently closed circular viral DNA formed from two types of linear DNA in woodchuck hepatitis virus-infected liver. *J. Virol.* 70, 4567-4575.

Yen, T. S. B. (1996). Hepadnaviral X Protein: Review of Recent Progress. *J. Biom. Sci.* 3, 20-30.

Yu, X. und Mertz, J. E. (1996). Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *J. Virol.* 70, 8719-8726.

Yu, X. und Mertz, J. E. (1997). Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J. Virol.* 71, 9366-9374.

Yuh, C., H., Chang, Y., L. und Ting, L. P. (1992). Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of Hepatitis B virus. *J. Virol.* **66**, 4073-4084.

Yuh, C. H. und Ting, L. P. (1993). Differentiated liver cell specificity of the second enhancer of hepatitis B virus. *J. Virol.* **67**, 142-149.

Yusof, J. H., Flower, A. J. und Teo, C. G. (1994). Transmission of hepatitis B virus analysed by conformation-dependent polymorphisms of single-stranded viral DNA. *J. Infect. Dis.* **169**, 62-67.

Zapp, D., Bartkowski, S., Holewa, B., Zoidl, C., Klein-Hitpass, L. und Ryffel, G. U. (1993). Elements and factors involved in tissue-specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6416-6426.

Zhang, P. und McLachlan, A. (1994). Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines. *Virology* **202**, 430-440.

Zoulim, F., Saputelli, J. und Seeger, C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J. Virol.* **68**, 2026-2030.

Lebenslauf von Silke Fischer

14. Dezember 1972 Geboren in Stuttgart

Schulbesuch

1979 bis 1983 Breitwiesenschule Gerlingen

1983 bis 1992 Gymnasium Gerlingen

Hochschulbildung

1992 bis 1998 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-
Universität Gießen

1998 bis 1999 Praktisches Jahr an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,
Lehrkrankenhaus Städtisches Klinikum Karlsruhe,
Medical University of Southern Africa, Pretoria

11. Mai 1999 Ärztlich Prüfung mit dem Gesamtergebnis: gut

Berufstätigkeit

ab 1. Juli 1999 Ärztin im Praktikum in der Abteilung Virologie
des Universitätsklinikums Ulm

Danksagung

Herrn Professor Dr. W. H. Gerlich danke ich für die Unterstützung bei dieser Arbeit und die konstruktive Kritik bei der Abfassung der Dissertationsschrift.

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. Schaefer für die Überlassung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit und die stete Diskussionsbereitschaft danken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie für ihre Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Steffen Schöllhammer für die kritische Korrektur der schriftlichen Arbeit und das stets gewährte Verständnis während der Zeit der praktischen Versuche.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern Erika und Herbert Fischer sowie meiner Großtante Hedwig Geisert für die Unterstützung während meines Studiums herzlich bedanken.