

**Rekombinante Hepatitis B Virus Kapside:
Untersuchungen zur Eignung als ikosahedrale
Träger für Strukturuntersuchungen, zur *in vitro*
Assemblierung und Nukleinsäureverpackung.**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität
Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Maren Vogel
aus Konstanz

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter Hülser

Mitberichter: Prof. Dr. Peter Gräber

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2004

Biologisches Institut der Universität Stuttgart

2004

Diese Arbeit wurde von mir selbständig und
nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel
durchgeführt.

**Der Kopf ist rund,
damit das Denken die Richtung wechseln kann.**
(Francis Picabia)

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2000 bis November 2003 an der Universitätsklinik in Freiburg, Abteilung für Innere Medizin II/ Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Nassal angefertigt.

Ein besonders dickes Dankeschön geht an Prof. Dr. Michael Nassal für die Hilfe bei der Bearbeitung und der Fertigstellung dieser abwechslungsreichen und interessanten Arbeit. Für die vielen Diskussionen, die Anleitung zum selbständigen Arbeiten, die unglaubliche Fähigkeit auch in schlimmen Phasen wieder Begeisterung für meine Projekte in mir zu wecken zu können und für das Gefühl, daß ich immer noch auf dem richtigen Weg bin. Danke Michael für Deine gute Betreuung, ich habe sie sehr genossen!

Besonderen Dank möchte ich an Prof. Dr. Dieter Hülser von der Universität Stuttgart und Prof. Dr. Peter Gräber von der Universität Freiburg richten, für Ihre spontanen Zusagen als Gutachter für meine Arbeit zu fungieren, und mir so die Promotion an der Universität Stuttgart ermöglichen.

Danke natürlich auch an PD. Dr. Bettina Böttcher für die gute Zusammenarbeit und die ausdauernde Bearbeitung der „Struktur-Projekt“ Daten. Danke auch für die sehr hilfreichen Kommentare und Erklärungen, die mir bei Zusammenschreiben sehr geholfen haben.

Den guten Geistern in der Arbeitsgruppe Nassal bin ich zu sehr großem Dank verpflichtet. Ihr habt mir nicht nur während meiner Arbeit immer hilfreich mit Rat und Tat zur Seite gestanden, sondern auch das persönliche Umfeld geschaffen, in dem ich gerne gearbeitet habe und gerne weiter arbeiten will. Danke Jolanta, besonders für meine Einarbeitung, für Deine so selbstverständliche Hilfe und den vielen Spaß im Labor. Für die Gewähr eines ruhigen Asyls ein zusätzliches Dankeschön an die Außenstelle in B7, an PD. Dr. Ulla Schultz und besonders an Nina Mannes, die meine schlimmsten Fehler in der Arbeit rot angestrichen hat. Natürlich auch ein Danke an all die anderen B-Laborler, der „Laboralltag“ mit Euch ist prima.

Besonderer Dank geht an Dr. Dörte Ortmann für ihr offenes Ohr in allen Lebenslagen!

Danke Jochen, daß Du mit mir durchgehalten hast!! Danke für Deine Bereitschaft einen Vortrag dreimal anzuhören, für Deine mir so wichtige Kritik und dafür, daß Du mir gezeigt hast, daß Krisen fast immer in einem selbst entstehen und überwunden werden können.

3. Zielsetzung	49
4. Material und Methoden	52
4.1. Material	52
4.1.1. <i>E. coli</i> Stämme	52
4.1.2. Plasmide für Klonierungen	52
4.1.2.1. Plasmide für pPL-Konstrukte	52
4.1.2.2. Plasmide für pET-Konstrukte	53
4.1.3. Oligonukleotidprimer für Klonierungen	53
4.1.4. Antikörper	54
4.1.4.1. Polyklonale Antikörper	54
4.1.4.2. Monoklonale Antikörper	54
4.1.5. Chemikalien und Enzyme	55
4.1.5.1. Chemikalien	55
4.1.5.2. Enzyme	56
4.1.5.3. Geräte	57
4.2. Allgemeine Molekularbiologische Methoden	58
4.2.1. Stammhaltung und Kultivierung	58
4.2.2. Klonierungen	60
4.2.3. Plasmidisolierung und Konzentrationsbestimmung	62
4.2.4. Sequenzierung	62
4.3. Allgemeine Protein-Biochemischen Methoden	63
4.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	63
4.3.2. Tris-Tricin Gelsystem	65
4.3.3. SDS-Agarosegele	66
4.3.4. Detektion von aufgetrennten Proteinen	68
4.3.4.1. Coomassie Blau Färbung	68
4.3.4.2. Western Blot Analyse	68
4.3.4.3. Detektion von radioaktiv markierten Proteinen	70
4.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	70
4.4. Expression, Reinigung und Analyse von HBV Corefusionsproteinen	71
4.4.1. Proteinexpression und Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zelle	71
4.4.1.1. Ultraschallmethode	71
4.4.1.2. Zellaufschluss mit der French Press	72

4.4.2.	Proteinexpression und Reinigung von Coreproteinen aus BL21 Zellen	74
4.4.3.	Sucrosegradienten	75
4.4.3.1.	Analytische Sucrosegradienten	76
4.4.3.2.	Präparative Sucrosegradienten	78
4.4.4.	Native Gelelektrophorese	78
4.4.5.	Umpuffern von Proteinlösungen	80
4.4.5.1.	Dialyse	80
4.4.5.2.	Gelfiltration	80
4.4.6.	Erhöhung der Proteinkonzentration durch Ultrafiltration	81
4.4.7.	Elektronen Mikroskopie (EM)	81
4.5.	Herstellung von Mosaik Partikeln	82
4.5.1.	Reinigung von Coreproteinen über native Ni-NTA Affinitätschromatographie	82
4.5.2.	Reinigung der Proteine über semi-denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie	84
4.5.3.	<i>In vitro</i> Assemblierung	85
4.5.4.	Analyse der Mosaikpartikel	87
4.6.	Verpackung von Nukleinsäure in Core Partikel	88
4.6.1.	Reinigung der Proteine	88
4.6.2.	Radioaktive Markierung von DNA und RNA Leitern zur Verpackung	88
4.6.3.	Markierung von linearer, doppelsträngiger DNA zur Verpackung	89
4.6.4.	Verpackung und Abtrennung nicht-verpackter Nukleinsäure	90
4.6.5.	Analyse der spezifisch verpackten Nukleinsäure	91
4.7.	Phosphorylierung von Corepartikeln	92
4.7.1.	Native Reinigung von SRPK 1 über Ni-NTA Affinitätschromatographie	92
4.7.2.	„Permeabilisierung“ von HBV Kapsiden	94
4.7.3.	Analyse der SRPK 1 <i>in vitro</i> Kinaseaktivität	94
4.7.4.	Dephosphorylierung durch CIAP und Alkaline Phosphatase	95
4.7.5.	„Autophosphorylierung“ bei Koexpression von SRPK 1	95
5.	Ergebnisse	97
5.1.	Herstellung von HBV Corefusionsproteinen für hochauflösende Strukturanalysen	97
5.1.1.	Klonierung der HBV Core-GFP Konstrukte	99

5.1.2.	Herstellung von HBV Core-GFP Fusionsproteinen im pPL-System	101
5.1.3.	Herstellung von HBV Core-GFP Fusionsproteinen im pET-System	102
5.1.4.	Andere HBV Corefusionsproteine	122
5.1.4.1.	HBV Core-RFP Fusionsproteine	122
5.1.4.2.	HBV Core-CFP/ YFP Fusionsproteine	123
5.2.	Herstellung von HBc-abgeleiteten Mosaikpartikeln mittels Ni-NTA Säulenchromatographie	125
5.2.1.	Über Ni-NTA Technik hergestellte Partikel enthalten beide Proteinuntereinheiten HBc1-149-H ₆ und HBc1-149-GFP-4Gly-H ₆	128
5.2.2.	HBc149-GFPct-H ₆ allein bildet keine stabilen Partikel	132
5.2.3.	HBc1-149-H ₆ und HBc149-GFPct-H ₆ können über Ni-NTA Technik gemeinsam eluiert werden	133
5.2.4.	Die gemeinsam eluierten HBc1-149-H ₆ und HBc149-GFPct-H ₆ Proteine sedimentieren auch zusammen im Sucrosegradienten	135
5.2.5.	Mischpartikel enthalten beide Proteinuntereinheiten in unterschiedlicher Zusammensetzung	136
5.2.6.	Mosaikpartikel zeigen ein mit HBc1-149-H ₆ vergleichbares Erscheinungsbild bei Betrachtung im EM	138
5.3.	Verpackung von Nukleinsäuren in HBV Partikel	140
5.3.1.	Die Verpackung von nicht markierter Nukleinsäure in HBV Partikel ist schwer detektierbar	143
5.3.2.	Die Verpackung von radioaktiv markierter RNA	144
5.3.3.	Die minimal benötigte Menge an Micrococcus Nuklease für den Verdau von freier DNA ist sehr gering	146
5.3.4.	Kleine DNA-Fragmente werden bevorzugt in HBV Partikel verpackt	149
5.3.5.	Lineare 5,5 kb DNA Fragmente werden von der Verpackung ausgeschlossen	157
5.4.	Phosphorylierung von HBV Partikeln	161
5.4.1.	Native Reinigung der Serin-Arginin-Protein-Spezifischen-Kinase 1 (SRPK 1)	162
5.4.2.	Zur Phosphorylierung von HBV Partikeln ist keine „Permeabilisierung“ notwendig	164

5.4.3.	GFP-Cterm183-H ₆ kann durch Koexpression mit SRPK 1 reversibel phosphoryliert werden	166
5.4.4.	Die mit Coreprotein HBc183 koexprimierte Kinase SRPK 1 zeigt <i>in vitro</i> weiterhin Phosphorylierungsaktivität.	169
5.4.5.	Die koexprimierte Kinase ist mit dem HBV Coreprotein eng assoziiert	172
5.4.6.	Der Phosphorylierungsstatus von HBV Coreproteinen ist mit herkömmlichen Trennverfahren nicht darstellbar	176
5.4.7.	Der Einfluss der Coreprotein Phosphorylierung durch SRPK 1 auf die Nukleinsäurebindungsfähigkeit	178
5.4.8.	Durch SRPK 1 phosphorylierte, aber nicht unphosphorylierte rekombinante HBV Corepartikel werden zur Kernpore transportiert.	180
5.4.9.	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von DHBV Coreproteinen	181
5.4.9.1.	DHBV Partikel können <i>in vitro</i> phosphoryliert werden	182
5.4.9.2.	Die Koexpression von SRPK 1 führt zu einer nachweisbaren Veränderung der Mobilität der DHBV Partikel	183
6.	Diskussion	185
6.1.	Eignung von HBV Coreprotein CLPs als Trägerstruktur für Strukturanalysen von Fremdproteinen.	185
6.2.	Nicht-assemblierungsfähige Corefusionsproteine können durch <i>in vitro</i> Reassoziierung mit unmodifizierten Coreproteinen als Mosaikpartikel dargestellt werden.	193
6.3.	Heterologe Nukleinsäuren lassen sich in Kapsid-ähnliche Partikel aus HBV Coreproteinen verpacken.	197
6.4.	Durch Koexpression mit der Serin-Arginin-Protein-spezifische-Kinase 1 (SRPK 1) können <i>in vivo</i> phosphorylierte rekombinante HBV Coreprotein Varianten hergestellt werden	202
7.	Literaturverzeichnis	208

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines HBV Virions.	24
Abbildung 2-2: Organisation des HBV Genoms.	25
Abbildung 2-3: Schematischer Infektionszyklus der Hepadnaviren.	30
Abbildung 2-4: Primärsequenz des HBV Coreproteins.	32
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung eines Coreprotein Monomers.	34
Abbildung 2-6: Dreidimensionale Rekonstruktion des HBV Kapsids.	36
Abbildung 2-7: Die C-terminale Domäne des HBV und DHBV Coreproteins.	38
Abbildung 2-8: Multifunktionale Domänenstruktur des HBV C-Terminus.	39
Abbildung 2-9: Strukturelle Kriterien bei Insertion einer Fremd-Domäne in das c/e1 Epitop des Coreproteins.	45
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung einer Sedimentationsanalyse von HBV Coreproteinen durch Zentrifugation im Sucroседichtegradient.	77
Abbildung 5-1: Modell der GFP-Insertion in die antigene Schleife des Coreproteins.	98
Abbildung 5-2: Schematische Primärsequenz der Core-GFP-Fusionen am Beispiel der GFP Insertion in das c/e1 Epitop des verkürzten Coreproteins HBc1-149 mit einem 4 Glycin-Linker.	101
Abbildung 5-3: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit eines chimären HBC Core-GFP-Fusionsproteins durch das Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten.	102
Abbildung 5-4: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit eines chimären HBc Core-GFP-Fusionsproteins durch das Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten.	103
Abbildung 5-5: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit eines chimären HBC Core-GFP-Fusionsproteins nach Optimierung der Expressions- und Reinigungsbedingungen im Sucrosegradienten.	104
Abbildung 5-6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der verkürzten Coreprotein Variante pET28-amp2-HBc149-c/e1- Δ 79/80-GFP-4Gly/ 4Gly-H ₆ mit einer Insertion von GFP in das zentrale Antigen-Epitop.	105
Abbildung 5-7: Kryo-elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme.	106
Abbildung 5-8: Äquatoriale Dichteverteilung in Partikeln mit Triangulationszahl T = 3.	107

Abbildung 5-9: Auftragung der relativen Elektronendichte im Abhängigkeit vom Radius der Partikel mit Triangulationszahl $T = 3$	108
Abbildung 5-10: Rekonstruktion der GFP-Verteilung auf der Oberfläche der $T = 3$ Corepartikel.....	109
Abbildung 5-11: Die elektronendichte Masse über der $T = 3$ Partikelschale lässt sich nicht eindeutig zu GFP-Molekülen „fitten“..	110
Abbildung 5-12: Rekonstruktion der Oberfläche der inneren Hülle der kleineren $T = 3$ Partikel.	111
Abbildung 5-13: Die GFP-Insertion bewirkt eine Veränderung der Organisation des Dimers auf der zweifachen Symmetrieachse im Partikel.	112
Abbildung 5-14: Äquatoriale Dichteverteilung in Partikeln mit Triangulationszahl $T = 4$	113
Abbildung 5-15: Auftragung der relativen Elektronendichte im Abhängigkeit vom Radius der Partikel mit Triangulationszahl $T = 4$	114
Abbildung 5-16: Rekonstruktion der GFP-Verteilung auf der Oberfläche der $T = 4$ Corepartikel.....	115
Abbildung 5-17: Die elektronendichte Masse über der $T = 4$ Partikelhülle lässt sich eingeschränkt zu GFP-Molekülen „fitten“.....	115
Abbildung 5-18: Rekonstruktion der Oberfläche der inneren Hülle der großen $T = 4$ Partikel.	116
Abbildung 5-19: Kryo-elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme.	117
Abbildung 5-20: Auftragung der relativen Elektronendichte im Abhängigkeit vom Radius der Partikel mit Triangulationszahl $T = 3$	118
Abbildung 5-21: Die äquatoriale Dichteverteilung der Hbc149-GFP-1Gly-His ₆ Partikel zeigt massive Veränderungen der Partikelstruktur an.....	119
Abbildung 5-22: Rekonstruktion der GFP-Verteilung auf der Oberfläche der $T = 3$ Corepartikel bei Insertion mit einem sehr kurzen Linker.	120
Abbildung 5-23: Rekonstruktion der Oberfläche der inneren Hülle der $T = 3$ Partikel.	121
Abbildung 5-24: Die elektronendichte Masse über der $T = 3$ Partikelhülle lässt sich gut zu GFP-Molekülen fitten.....	121
Abbildung 5-25: Die Core Fusionsproteine Hbc149-mCFP-H ₆ und Hbc149-mYFP-H ₆ weisen eine gute Partikelbildungsfähigkeit auf.....	124
Abbildung 5-26: Arbeitsschema der <i>in vitro</i> Assemblierung von Mosaikpartikeln...	127

Abbildung 5-27: Die Coreprotein Varianten HBc149-H ₆ und HBc149-GFP-4Gly-H ₆ eluieren gemeinsam von der Ni-NTA Säule.	128
Abbildung 5-28: Die Coreproteine HBc149-H ₆ und HBc149-GFP-4Gly-H ₆ sedimentieren gemeinsam in einem Sucroседichtegradienten.	129
Abbildung 5-29: Die aus HBc149-GFP-4Gly-H ₆ und HBc149-H ₆ <i>in vitro</i> assemblierten Partikel zeigen im Elektronenmikroskop verschiedene Partikelformen	130
Abbildung 5-30: Western Blot Analyse der Mosaikpartikel.	131
Abbildung 5-31: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit des chimären C-terminalen Core-GFP-Fusionsproteins durch das Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten.	132
Abbildung 5-32: In der elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der Coreprotein Variante HBc149-GFPct-H ₆ sind keine vollständigen Partikel nachweisbar.	133
Abbildung 5-33: Die Coreprotein Varianten HBc149-H ₆ und HBc149-GFPct-H ₆ eluieren gemeinsam von der Ni-NTA Säule.	134
Abbildung 5-34: Die Coreproteine HBc149-GFPct-H ₆ und HBc149-H ₆ sedimentieren zusammen in einem Sucroседichtegradienten.	135
Abbildung 5-35: Laufverhalten der Mosaikpartikel im nativen Agarosegel.	136
Abbildung 5-36: Die Zusammensetzung der Mosaikpartikel ist variabel.	138
Abbildung 5-37: Die aus HBc149-GFPct-H ₆ und HBc149-H ₆ <i>in vitro</i> assemblierten Mosaikpartikel zeigen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme eine gleichmäßige Struktur.....	139
Abbildung 5-38: Konstruktion der Coreprotein Varianten HBc156-H ₆ und HBc161-H ₆ zur <i>in vitro</i> Verpackung von heterologer RNA bzw. DNA.	142
Abbildung 5-39: γ - ³² P-ATP markierte RNA kann mit HBc156-H ₆ Partikeln <i>in vitro</i> assoziiert werden.	145
Abbildung 5-40: Die Standardversuchsbedingungen sind hinreichend für einen vollständigen Nukleaseverdau mit <i>Micrococcus</i> Nuklease.	148
Abbildung 5-41: Zum Nachweis von geschützt verpackter DNA ist 1/20 der eingesetzten Menge an <i>Micrococcus</i> Nuklease (MN) hinreichend für einen vollständigen Verdau freier DNA.	148

-
- Abbildung 5-42: Durch *in vitro* Assoziation und eventuelle Verpackung von γ -³²P-ATP DNA-Fragmenten lassen sich radioaktiv markierte HBc161-H₆ CLPs im CsCl Dichtegradienten anreichern..... 150
- Abbildung 5-43: Der Hauptanteil an Coreprotein HBc161-H₆ reichert sich in den Fraktionen mittlerer Dichte an. 151
- Abbildung 5-44: Verschieden lange DNA-Fragmente können in *in vitro* assemblierte HBc161-H₆ CLPs vor Nuklease geschützt verpackt werden. 152
- Abbildung 5-45: Bestimmung der Aktivität jeder Bande im Marker. 154
- Abbildung 5-46: DNA-Fragmente < 1000 bp assoziieren bevorzugt mit Coreprotein HBc161-H₆. 155
- Abbildung 5-47: Die Normalisierung der gemessene Aktivitäten isolierter DNA Fragmente aus HBc161-H₆ CLPs verdeutlicht eine Präferenz zur Verpackung von kleineren DNA-Fragmenten unter 1000 bp..... 156
- Abbildung 5-48: *In vitro* Verpackung einer Mischung aus 500 bp und 5,5 kb γ -³²P-ATP DNA-Fragmenten in HBc161-H₆ CLPs..... 158
- Abbildung 5-49: Effizienz der HBc161-H₆ Anreicherung nach *in vitro* Assemblierung in Gegenwart von markierter DNA..... 159
- Abbildung 5-50: Ein 5,5 kb DNA-Fragment kann *in vitro* nicht in HBc161-H₆ CLPs verpackt werden. 160
- Abbildung 5-51: Das HBV Coreprotein besitzt drei potenzielle Phosphorylierungsstellen im C-Terminus..... 162
- Abbildung 5-52: Native Reinigung der Serin-Arginin-Protein-spezifischen-Kinase 1 (SRPK 1) über Ni-NTA Säulenchromatographie. 163
- Abbildung 5-53: Eine „Permeabilisierung“ der Partikel hat keinen Einfluss auf die Effektivität der Phosphorylierung..... 165
- Abbildung 5-54: HBc183-H₆ Partikel werden durch das C-terminale His₆-Peptid besser durch SRPK 1 phosphoryliert. 167
- Abbildung 5-55: HBc183-H₆ Partikel werden deutlich besser phosphoryliert als HBc183 Partikel..... 168
- Abbildung 5-56: Die Phosphorylierung durch SRPK 1 verursacht eine minimale und umkehrbare Veränderung der Mobilität im nativen Agarosegel. ... 169
- Abbildung 5-57: Die mit Coreprotein HBc183 koexprimierte Kinase SRPK 1 (HBc183 x a2) zeigt *in vitro* Enzymaktivität. 170

Abbildung 5-58: HBc183 x SRPK 1(a2) Partikel ohne vorherige „Permeabilisierung“ (Spur 5) können besser phosphoryliert werden als vergleichbare Mengen der „permeabilisierten“ Form (Spur 6).	171
Abbildung 5-59: SRPK 1 kann bei Koexpression mit HBc183 als distinkte Bande spezifisch detektiert werden.	172
Abbildung 5-60: SRPK 1 zeigt bei Auftrennung im nativen Agarosegel kein distinktes Laufverhalten.	173
Abbildung 5-61: Aus der distinkten Bande einer im nativen Agarosegel aufgetrennten HBc183 x SRPK 1(a2) Probe lässt sich die Kinase direkt freisetzen und nachweisen.	175
Abbildung 5-62: Das Laufverhalten von <i>in vitro</i> phosphorylierten HBc183 x SRPK 1 Partikeln in einem nativen TAE-Agarosegel bzw. Tris-Glycin-SDS-Gel ist nur geringfügig verändert.	176
Abbildung 5-63: In einem denaturierenden 15 % Tris-Tricin-SDS-Gel nach Schägger und von Jagow kann eine <i>in vivo</i> Phosphorylierung durch die Veränderung des Laufverhaltens nachgewiesen werden.....	177
Abbildung 5-64: Eine deutliche Veränderung der Mobilität ist nur bei <i>in vivo</i> phosphorylierten, aber nicht bei <i>in vitro</i> phosphorylierten Coreprotein HBc183 in einem Tris-Tricingel nachweisbar.	178
Abbildung 5-65: Detektion core-assoziiertes bzw. verpackter bakterieller RNA in Abhängigkeit der Phosphorylierung.....	179
Abbildung 5-66: Detektion der HBc183 bzw. HBc183 x SRPK 1 Partikel durch Coomassie Blau Färbung.....	179
Abbildung 5-67: Der durch SRPK 1 verursachte Phosphorylierungsstatus ermöglicht rekombinanten HBc183 Partikeln den spezifischen Transport zur Kernpore.	181
Abbildung 5-68: Die C-terminale Domäne des HBV und DHBV Coreproteins.	181
Abbildung 5-69: DHBc Partikel ohne und mit C-terminaler Fusion des His ₆ -Peptids lassen sich durch SRPK 1 <i>in vitro</i> phosphorylieren.....	182
Abbildung 5-70: Eine <i>in vivo</i> Phosphorylierung durch Koexpression von SRPK 1 ist bei DHBc ohne His ₆ -Peptid durch eine Veränderung der Mobilität im Tris-Glycin-SDS Gel nachweisbar.	184

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Häufig verwendete Enzyme, mit spezifischen Bezeichnung und Bezugsquellen.....	56
Tabelle 2:	Auflistung der verwendeten Geräte mit Hersteller- bzw. Bezugsquellen.....	57
Tabelle 3:	Zur Selektion verwendete Antibiotika mit Angaben über die Stammlösung und die benötigten Arbeitskonzentrationen.	59
Tabelle 4:	Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Kultivierungs- und Induktionsbedingungen für TOP10/ BL21 bzw. GI698 Zellen.	60
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Puffer für Klonierungen.....	61
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für SDS-PAGE.	64
Tabelle 7:	Mengenangaben zur Herstellung von 10 - 15 %-igen Trenn- und 4 %-igen Sammelgelen für SDS-PAGE.	64
Tabelle 8:	Zusammensetzung der verwendeten Proteinmarker RPN 755 und RPN 756.....	65
Tabelle 9:	Zusammensetzung der Puffer für Tris-Tricin Gele.	65
Tabelle 10:	Mengenangaben zur Herstellung eines 15 %-igen Trenngels und 4 %-igen Sammelgels für das Tris-Tricine Gelsystem.....	66
Tabelle 11:	Zusammensetzung der Puffer für SDS-Agarosegele.	67
Tabelle 12:	Zusammensetzung der Lösungen für Coomassie Blau Färbungen.	68
Tabelle 13:	Zusammensetzung der für Western Blot Analysen benötigten Puffer und Lösungen.	70
Tabelle 14:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zellen durch die Ultraschall-Methode....	72
Tabelle 15:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zellen durch die French Press Methode.	73
Tabelle 16:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus BL21 Zellen durch die Ultraschall-Methode.	75
Tabelle 17:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für Sucroседichtegradienten.....	77

Tabelle 18:	Pipettierschema zur Herstellung von Sucroslösungen mit aufsteigenden Sucrosekonzentrationen.	78
Tabelle 19:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für native Agarosegele.	80
Tabelle 20:	Zusammensetzung der Lösungen zur negativ Kontrastierung.	82
Tabelle 21:	Zusammensetzung der Puffer für die Reinigung von Proteinen über native Ni-NTA Affinitätschromatographie.	84
Tabelle 22:	Zusammensetzung der Puffer für die Reinigung von Proteinen über semi-denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie.	85
Tabelle 23:	Zusammensetzung der Puffer für die <i>in vitro</i> Assemblierung von HBV Coreproteinen durch Ni-NTA Affinitätschromatographie.	87
Tabelle 24:	Benötigte Puffer zur Dephosphorylierung und radioaktiven Markierung der 5'-Enden von Nukleinsäure.	89
Tabelle 25:	Zusammensetzung der Dialysepuffer zur Verpackung von Nukleinsäure in Core Partikel.	90
Tabelle 26:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Analyse von verpackter Nukleinsäure aus HBV Core Partikeln.	92
Tabelle 27:	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von SRPK 1 über nativen Ni-NTA Affinitätschromatographie.	93
Tabelle 28:	Zusammensetzung des Kinase-Reaktionspuffers zur <i>in vitro</i> Phosphorylierung von HBV Coreprotein Varianten.	95
Tabelle 29:	Beschreibung aller durch Klonierung hergestellten HBV Core-GFP Fusionsprotein Varianten.	100
Tabelle 30:	Übersicht über die Ergebnisse der Strukturanalyse mit HBc-abgeleiteten CLPs als Trägerstruktur für Fremd-Epitope.	122
Tabelle 31:	Versuchsbedingungen zur Überprüfung des Nukleaseverdaus bei der <i>in vitro</i> Verpackung von heterologer DNA in HBc-abgeleitete CLPs.	147
Tabelle 32:	Gemessene Aktivität [cpm] und geschätzte Verluste [%] und markierte DNA Enden [pmol] bei der Verpackung von γ - ³² P-ATP DNA in HBc-CLPs.	157

Abkürzungen

Å	Ångström
aa	Aminosäure(n) bzw. Aminosäurerest
Amp ^R	Gen für Ampicillin Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5-triphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-methan
BSA	Bovine serum albumine (Serumalbumin aus Rindern)
Cam ^R	Gen für Chloramphenicol Resistenz
cccDNA	covalently closed circular DNA (kovalent geschlossene zirkuläre DNA)
	Curie: Noch gebräuchliche Einheit der Radioaktivität:
Ci	1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel (Bq) (Bq = SI-Einheit)
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
CLPs	Capsid-like particles (Kapsid-ähnliche Partikel)
C-Terminus	Carboxyterminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHBV	Duck Hepatitis B Virus (Hepatitis B Virus der Peking Ente)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosid 5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threit
ε-RNA	Epsilon-RNA (Verpackungssignal der Hepadnaviren)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie oder Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPLC	Fluid Protein Liquid Chromatographie (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Verfahren)
GSHV	Ground squirrel Hepatitis B Virus (Hepatitis B Virus des Erdhörnchens)

h	Stunde(n)
HBc	Hepatitis B Coreprotein
HBcAg	Partikuläres Core Antigen von HBV
HBs	Hepatitis B Surface Protein (Hepatitis B Oberflächen Protein)
HBV	Hepatitis B Virus des Menschen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HHBV	Heron Hepatitis B Virus (Hepatitis B Virus des Graureihers)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
KanR	Gen für Kanamycin Resistenz
L-Protein	Large Hepatitis B Surface Protein (Großes Hepatitis B Oberflächenprotein)
LB-Medium	Luria Bertani Medium
M	Molarität [mol/l]
M-Protein	Middle Hepatitis B Surface Protein (Mittleres Hepatitis B Oberflächenprotein)
min	Minute bzw. Minuten
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblautetrazolium
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
N-Terminus	Aminoterminus
NP-40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pgRNA	prägenomische RNA
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
P-Protein	HBV Polymerase
PVDF	Polyvinylendifluorid
rcDNA	relaxed circular DNA (entspannte, zirkuläre DNA)
RFP	Red fluorescent protein (Rot fluoreszierendes Protein)
RM-Medium	Spezielles Minimalmedium (Invitrogen, siehe Seite 58)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase A	Ribonuklease A

rRNA	Ribosomale RNA
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Garnelen)
sec	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SN	Staphylococcus aureus Nuklease
S-Protein	Small Hepatitis B Surface Protein (Kleines Hepatitis B Oberflächenprotein)
SRPK 1/ 2	Serin-Arginin-Protein-spezifische-Kinase 1 oder 2
STHBV	White stork Hepatitis B Virus (Hepatitis B Virus des Weißstorchs)
T	Triangulationszahl
TAE	Tris Azetat EDTA
TBS	Tris buffered Saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylen-diamin
TNE	Tris Natriumchlorid EDTA
TP	Terminal protein (Terminales Protein der Polymerase)
tRNA	Transfer RNA
U	Unit(Einheit)
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
VLPs	Virus-like particles (Virus-ähnliche Partikel)
WHV	Woodchuck Hepatitis B Virus (Hepatitis B Virus des Waldmurmeltiers)
WMHBV	Woolly monkey Hepatitis B Virus (Hepatitis B Virus des Wollaffen)
wt	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescent protein (Gelb fluoreszierendes Protein)

1. Zusammenfassung

Das aus 183 Aminosäuren bestehende Hepatitis B Virus (HBV) Coreprotein bildet ikosaedral symmetrische Kapside aus 180 bzw. 240 identischen Untereinheiten. Heterolog exprimiertes Coreprotein (HBc) kann ohne die Beteiligung anderer Proteine zu Kapsid-ähnlichen Partikeln (CLPs) assemblieren. Die C-terminale Nukleinsäurebindungsdomäne ist für diesen Vorgang entbehrlich. Die Fähigkeit zur CLP-Bildung kann auch dann erhalten bleiben, wenn Fremdprotein-Domänen, wie an Hand des Green Fluorescent Protein (GFP) als Modell gezeigt, geeignet an das Coreprotein fusioniert werden. HBc-abgeleitete CLPs können somit als ikosaedrale Trägerstruktur für Fremdproteine betrachtet werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit CLPs mit zentral in die Coreprotein Sequenz inserierten Fremd-Domänen, hier GFP, für eine hochauflösende Strukturanalyse der Fremd-Domänen durch Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung nutzbar gemacht werden können, sowie dies zuvor für das unmodifizierte HBV Coreprotein gelungen war. Frühere Versuche hatten gezeigt, dass die GFP-Domänen auf der CLP-Oberfläche präsentiert werden. Die Wahl absichtlich langer Linkersequenzen an den GFP-Termini hatte aber anscheinend zu einer so flexiblen Verbindung geführt, dass es nicht zur regelmäßigen Anordnung der GFP-Domänen kam, wie sie für die gewünschte Anwendung erforderlich ist.

Neben der Verbesserung des Expressions- und Reinigungs-Protokolls, die zu einer deutlichen Erhöhung der Ausbeute an hoch konzentrierten und reinen Partikelformen führte, war die Optimierung der Linkersequenz essentiell für eine verbesserte Auflösung der Struktur. Mit zunehmender Verkürzung des Linkers konnte die Flexibilität der Befestigung so weit reduziert werden, dass die Fremd-GFP-Domänen in eine geordnete, nahezu ikosaedrale Anordnung gezwungen wurden. Dies resultierte in einer erhöhten Auflösung, so dass die bekannte Struktur von GFP erstmals sinnvoll in die erhaltenen Elektronendichtekarten „gefittet“ werden konnte. Eine Limitierung der Anwendung lag in der unerwarteten Flexibilität der Core-Schale selbst, da es mit steigender Auflösung der GFP-Struktur zu einer zunehmenden Umordnung der Coreoberfläche kam. Die Verwendung von weiteren Fremd-Proteinen mit einer zu GFP verwandten Struktur lieferte wichtige Erkenntnisse zur generellen Übertragbarkeit der Methode auf Proteine unbekannter Struktur. Jedes inserierte Fremd-Protein übt einen spezifischen Einfluss auf das Trägerprotein selbst

aus, der eine individuelle und damit zeitraubende Anpassung des Protokolls für jedes Protein erforderlich machen würde.

HBV CLPs mit inserierten Fremd-Domänen sind auch als immunverstärkende Impfstoff-Träger von Interesse, insbesondere wenn sie ein vollständiges, nativ gefaltetes Fremdartigen präsentieren. Neben der korrekten dreidimensionalen Faltung des Fusionsproteins ist auch das geometrisch begrenzte Raumangebot auf der Oberfläche (zentrale Insertion) bzw. im Inneren (C-terminale Fusion) der CLPs ein potenzielles Problem. Grundsätzlich besteht eine Lösung darin, einen Teil der Fusionsproteine in den CLPs durch sterisch weniger anspruchsvolle Wildtyp Coreprotein-Untereinheiten zu ersetzen („Mosaik-Partikel“). Im zweiten Teil wurde daher eine Methode, wieder mit GFP als Modell, zur *in vitro* Assemblierung von separat exprimierten Coreprotein Varianten entwickelt. Sie beruht auf der selektiven Bindung der am C-Terminus der Coreproteine fusionierten sechs Histidinreste an eine Ni²⁺-Chelat Affinitätssäule unter semi-denaturierenden Bedingungen und einer Reassoziierung der Coreprotein-Untereinheiten unter nativen Bedingungen. Die Anwendbarkeit wurde zunächst am Beispiel einer assemblierungsfähigen Corefusionsprotein Variante gezeigt. Darüber hinaus ließ sich eine an sich nicht-assemblierungsfähige Corefusionsprotein Variante, deren C-terminal fusionierte GFP-Domäne das Raumangebot des CLP-Innenraums überschreiten würde, ebenfalls in partikulärer Form erhalten. Die vorgestellte Methode scheint ausbaufähig für medizinische relevante Antigene, wobei die Anwendung auch für mehr als nur einen Antigentyp pro CLP denkbar ist.

Die eigentliche Funktion des Kapsids im Lebenszyklus von HBV ist die eines schützenden Transportbehälters für das virale Genom. Im dritten Teil wurde untersucht, ob das neue *in vitro* Assemblierungsverfahren sich auch zur gezielten Verpackung heterologer Nukleinsäuren in die CLPs nutzen lässt. Dies wäre eine Voraussetzung u.a. zur Anwendung von HBV CLPs als Gentransfer-Vehikel. Durch Einbeziehung von Teilabschnitten der C-terminalen Nukleinsäurebindungsdomäne wurden reversibel dissoziierbare Coreprotein Varianten hergestellt, mit denen es gelang, Nukleinsäuren vor Nukleasen geschützt in CLPs zu verpacken. Die Verpackungskapazität der CLPs konnte dabei eng eingegrenzt werden, da DNA Fragmente, welche die HBV Genomgröße von 3.2 kb überschritten, nicht verpackt wurden und andererseits eine deutliche Präferenz für kleine DNA Fragmenten unter 1 kb festgestellt wurde. Die Effizienz der Verpackung ist momentan noch sehr

gering, sollte sich aber durch eine weitere Optimierung der Nukleinsäurebindung und der Versuchsbedingungen zur Reassoziaton wesentlich verbessern lassen.

Die Phosphorylierung der Nukleinsäurebindungsdomäne des Coreproteins spielt eine wichtige, aber mechanistisch nicht verstandene Rolle bei der Verpackung und reversen Transkription der prägenomischen HBV RNA sowie beim intrazellulären Transport des Nukleokapsids. Die Identität der verantwortlichen Kinase ist umstritten, wobei die Serin-Arginin-Protein-spezifische-Kinase 1 (SRPK 1) als aussichtsreicher Kandidat gilt. Im vierten Teil der Arbeit wurde die SRPK 1 rekombinant hergestellt und eine Methode zur *in vitro* Phosphorylierung von Coreproteinen entwickelt. Durch Koexpression von Coreproteinen und SRPK 1 in *E. coli* konnten erstmals definiert phosphorylierte CLPs in präparativen Mengen hergestellt und die strukturellen und funktionellen Auswirkungen dieser posttranslationalen Modifikation genauer untersucht werden. So konnte nachgewiesen werden, dass eine SRPK 1-Phosphorylierung vergleichbar mit der durch die Protein Kinase C verursachten Phosphorylierung für den Transport von rekombinanten HBV CLPs zur Kernpore notwendig und hinreichend ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch SRPK 1 die Verpackung von bakteriellen Nukleinsäuren deutlich verringert.

Abstract

The 183 aa hepatitis B virus (HBV) core protein forms icosahedral capsids of two different sizes, containing either 180 or 240 identical subunits, respectively. When expressed in heterologous systems, e.g. *E. coli*, HBc assembles spontaneously into capsid-like particles (CLPs) without participation of other viral proteins. The core protein consists of two domains, the large N-terminal assembly domain and the C-terminal nucleic acid binding domain, which is dispensable for capsid assembly. The ability to assemble into CLPs is still maintained when the green fluorescent protein (GFP), as a model insert, was appropriately fused into the centre of the core protein sequence. Furthermore, the GFP moieties were shown to be presented at the surface of the core particles. HBc-derived CLPs may therefore be considered as icosahedral platforms for foreign proteins. In the first part of this work it was analyzed whether CLPs with such central GFP insertions are suitable for structural analyses

with high resolution by using electron cryo-microscopy and computer-based image processing, as has previously been demonstrated for the unmodified core protein.

Previous studies had shown that the deliberately long linkers in the original fusion protein led to a rather flexible connection between carrier and GFP moieties that resulted in a non regular distribution of the GFP domains on the CLP surface and in three-dimensional maps of low resolution. Besides the improvement of expression and purification protocols, leading to enhanced yields of pure particles, optimization of the linker sequence was essential to obtain a higher resolution for the foreign protein domains. Shortening of the linker sequence led to a more rigid fixation of the GFP domains, forcing them into a well ordered, almost icosahedral symmetry. This finally led to a sufficient high resolution to fit the known structure of GFP into the electron density maps. However, a restriction was the unexpected flexibility of the core shell structure itself. While linker shortening allowed for a higher resolution of the GFP structure, it also led to a fundamental distortion of the core dimers within the shell. Central insertion of other proteins, with structural relation to GFP, showed that the foreign epitope itself has a major influence on the core carrier. The display of foreign proteins on the surface of core particles for structural purposes would therefore require a time-consuming development of individual protocols for each protein.

HBC-derived CLPs displaying foreign domains are also of high interest as potential immune-enhancing vaccine carriers, especially when presenting complete and natively folded antigens. Besides the proper three-dimensional folding of the fusion protein, the limited space on the surface (central insertions) or inside the particles (C-terminal fusions) can give rise to problems. A possible solution is the partial replacement of fusion protein subunits by unmodified wild type core protein, reducing the overall sterical hindrances. Using separately expressed wild type and fusion proteins, an *in vitro* assembly system could be developed in the second part of this work. The method is based on the selective binding of the two proteins to immobilized nickel ions, mediated by six histidine residues fused to their C-termini, under partly denaturing conditions and the simultaneous re-association under native conditions. The feasibility of this method was first verified by using a fully assembly-competent core fusion protein. Next, an assembly incompetent variant whose C-terminally fused GFP domains would exceed the space provided in the lumen of the CLPs, was successfully converted into regularly shaped mosaic particles. With the

option to use more than one type of antigen on one CLP, the *in vitro* assembly system may become very useful for vaccination applications.

In the life cycle of HBV the main function of the capsid is that of a protective transport container for the viral genome. The third part of this work analyzed whether the newly developed *in vitro* assembly system could be used to specifically package heterologous nucleic acids into HBc-derived CLPs. By including parts of the authentic C-terminal nucleic acid binding domain, core variants could be constructed which allow for reversible dissociation and packaging of DNA fragments into the assembled CLPs. The DNA packaging capacity of these CLP variants was found to be approximately 3,2 kb or roughly HBV genome size, but for nuclease protected DNA packaging a clear preference for smaller fragments emerged. The overall efficiency of DNA packaging into CLPs was rather low, but could certainly be improved by an optimized nucleic acid binding and re-association procedure.

Phosphorylation sites within the nucleic acid binding domain of the core protein appear to play an important, yet mechanistically unclear function in packaging and reverse transcription of the viral pregenomic RNA, as well as in intracellular transport of the nucleocapsids. The identity of the responsible kinase is discussed controversially, but the Serine-Arginine protein-specific Kinase 1 (SRPK 1) seems to be a good candidate. In the last part, SRPK 1 was expressed in *E. coli* and used for *in vitro* phosphorylation of recombinant HBV and DHBV core particles. By co-expression of SRPK 1 and core protein, for the first time, preparative amounts of core protein with a defined phosphorylation status could recombinantly be produced, providing a good source to analyze the structural and functional consequences of this post translational modification. So far it was shown that SRPK 1 phosphorylation substantially reduced the amount of encapsidated bacterial RNA in recombinant HBc-CLPs. Secondly, phosphorylation by SRPK 1 led to exposure of the nuclear localization signal embodied in the core protein and to transport of recombinant CLPs towards the nuclear pore. Importantly, the SRPK 1 phosphorylation triggered mechanism was not different from the previously shown effects of core phosphorylation by protein kinase C (PKC).

2. Einleitung

2.1. Das Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus ist der Prototyp der Hepadnaviren, einer Familie von kleinen hepatotropen DNA-Viren. Charakteristische Gemeinsamkeiten der Hepadnaviren sind neben der hohen Spezies- und Zelltyp-Spezifität eine weitgehend konservierte Genomorganisation und die über reverse Transkription ablaufende Replikation. Grundsätzlich werden die Hepadnaviren der Säugetiere (Genus Orthohepadnavirus) von denen der Vögel (Genus Avihepadnavirus) unterschieden. Zu den Orthohepadnaviren gehören neben dem humanpathogenen Hepatitis B Virus (HBV) (Dane *et al.*, 1970) unter anderem das der Erdhörnchen (Ground squirrel; GSHV) (Marion *et al.*, 1980), der Waldmurmeltiere (Woodchuck; WHV) (Summers *et al.*, 1978) und der Wollaffen (Woolly monkey; WMHBV) (Lanford *et al.*, 1998). Die Avihepadnaviren umfassen unter anderem das Hepatitis B Virus der Pekingente (Duck; DHBV) (Mason *et al.*, 1980), des Graureihers (Heron; HHBV) (Sprengel *et al.*, 1988), des Weißstorks (White stork; STHBV) (Pult *et al.*, 2001) und des Kranichs (Crane; CHBV) (Prassolov *et al.*, 2003).

HBV ist ein weit verbreiteter humaner Krankheitserreger. Weltweit sind zum heutigen Zeitpunkt mehr als 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert, wobei pro Jahr eine Millionen Menschen an den Folgen sterben (Angaben: World Health Organisation; WHO 2002). Die Übertragung des Virus kann z.B. durch direkten Kontakt mit infiziertem Blut oder anderen Körperflüssigkeiten stattfinden. Am häufigsten ist die perinatale Übertragung, d.h. durch eine Weitergabe des Virus während des Geburtsvorganges von einer infizierten Mutter auf das Neugeborene. Eine primäre Infektion mit HBV kann entweder eine akute oder eine chronische Verlaufsform zeigen. In nur ca. 1% der Fälle entwickelt sich eine fulminante Hepatitis, die fast immer zu einer tödlichen Lebernekrose führt. Weit häufiger ist die Persistenz des Virus, d.h. es kommt zu keiner Eliminierung des Virus aus dem Körper. Etwa 5 - 10 % der Erwachsenen können das Virus nicht eliminieren; bei Kleinkindern steigt die Wahrscheinlichkeit für einen chronischen Verlauf auf 70 - 90 %. Die schwere Form der chronischen Hepatitis führt dabei zur Leberzirrhose bzw. zum Leberzellkarzinom (Hepatocellular Carcinoma; HCC) (Blumberg, 1997).

Zum heutigen Zeitpunkt kann die chronische Hepatitis nur sehr unzureichend behandelt werden. Die Therapie zielt darauf ab, durch Senkung der Viruslast die Wahrscheinlichkeit einer weiteren Übertragung zu minimieren, die Entwicklung eines Leberzellkarzinoms zu verhindern und eine bestehende Leberentzündung abzuschwächen. Im Einsatz befinden sich Nukleosidanaloga wie Lamivudin oder Derivate, die meist nur einen vorübergehenden inhibitorischen Effekt auf die Funktion der viralen Polymerase haben. Zudem treten häufig Resistenzen gegen die Nukleosidanaloga auf. Alternativ werden Immunmodulatoren eingesetzt, um das menschliche Immunsystem dabei zu unterstützen, eine Abwehr gegen die Viren aufzubauen. Am häufigsten eingesetzt wird hochdosiertes Interferon α , entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Nukleosidanaloga. Aber auch diese Therapieform führt nur bei ca. 35 % aller behandelten Patienten zur Virus-Eliminierung.

Die unzureichenden Therapiemöglichkeiten der chronischen Hepatitis B verdeutlichen die Bedeutung einer effektiven Prophylaxe. Für einen wirksamen Impfschutz gegen Hepatitis B steht seit 1986 ein gentechnisch hergestellter Impfstoff zur Verfügung.

2.2. Das Virion

Das infektiöse HBV Virion oder auch „Dane particle“ (Dane *et al.*, 1970), dessen schematischer Aufbau in Abbildung 2-1 dargestellt ist, hat einen Durchmesser von ca. 42 nm und besteht aus einem umhüllten Nukleokapsid von ikosahedraler Struktur, welches das Genom und die damit assoziierte virale Polymerase enthält. Zusätzlich zu den viralen Proteinen konnten eine zelluläre Protein Kinase und das Chaperon Hsc 70 in den HBV Virionen gefunden werden (Gerlich *et al.*, 1982), (Löffler-Mary *et al.*, 1997). Die Hülle besteht aus einer ca. 7 nm dicken Lipiddoppelschicht zellulären Ursprungs, in die drei teilweise glykosylierte, virale Hüllproteine L(arge), M(iddle) und S(mall) inseriert sind. Das Nukleokapsid ist je nach Triangulationszahl (T) aus 180 (T = 3) bzw. 240 (T = 4) identischen Untereinheiten des so genannten Coreproteins aufgebaut (Crowther *et al.*, 1994).

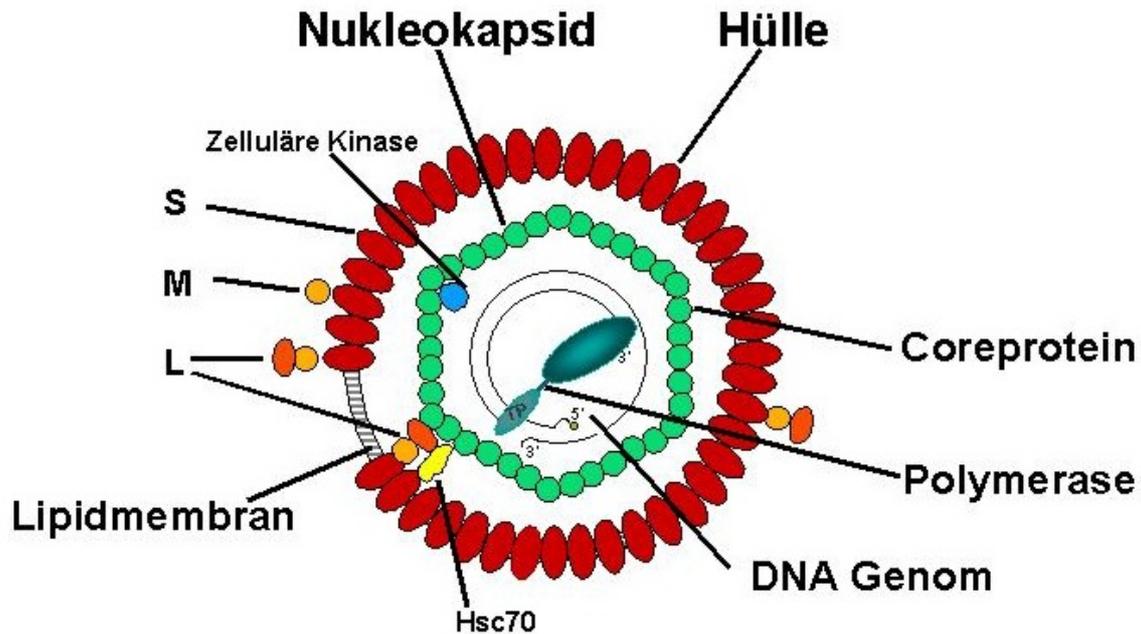


Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines HBV Virions. Das Nukleokapsid ist aus identischen Untereinheiten des Coreproteins zusammengesetzt. Es enthält eine zelluläre Kinase sowie das virale Genom, das über die TP-Domäne an die Polymerase gebunden vorliegt. Die Hülle wird von den Hüllproteinen S, M und L gebildet, die in eine zelluläre Lipiddoppelschicht eingelagert sind. Die Topologie der präS1-Domäne des L-Proteins wird durch Bindung des zellulären Chaperon Hsc 70 beeinflusst.

Das virale Genom ist eine partiell doppelsträngige zirkuläre, nicht vollständig geschlossene DNA. Der etwas längere Minus (-)-Strang der DNA besteht aus ca. 3200 Nukleotiden (nt) und ist am 5'-Ende mit der viralen Polymerase kovalent verbunden (Bartenschlager und Schaller, 1992). Die Zirkularität wird durch einen überlappenden Bereich des Minus (-)-Stranges mit dem kürzeren Plus (+)-Strang, der am 5'-Ende ein kurzes Oligoribonukleotid aufweist, vermittelt. Nahe dem 5'-Ende beider Stränge liegen 11 Nukleotide umfassende direkte Sequenzwiederholungen (Direct Repeats = DR1/ DR2), die eine essentielle Rolle in der Replikation der Komplementärstrang-Synthese spielen (Seeger *et al.*, 1986), (Rieger und Nassal, 1996). Das im Vergleich mit anderen Säugerviren sehr kleine HBV Genom enthält vier, teilweise überlappende offene Leseraster (Open Reading Frames = ORF's) präC/ C, P, präS1/ präS2/ S und X. Durch Verwendung von unterschiedlichen Translations-Initiations-Codons kodieren diese Leseraster für mindestens sieben Translationsprodukte, auf die in Abschnitt 2.4 näher eingegangen wird.

identisch. Die prägenomische RNA (pgRNA) hat mit 3400 nt Genom-Überlänge und dient sowohl zur Translation der viralen Polymerase P und der Core-Strukturproteine als auch als Matrize für die reverse Transkription durch die translatierte Polymerase selbst. Das ebenfalls überlange präC/ C-Transkript (3500 nt) wird nicht in Kapside verpackt, sondern ausschließlich in das Prä-Coreprotein translatiert. Die kürzeren subgenomischen RNAs sind zwischen 900 nt und 2400 nt lang. Von ihnen werden die drei Hüllproteine L, M und S und das X-Protein translatiert.

2.4. Die viralen Proteine

Das HBV Genom kodiert für 7 Proteine. Das Coreprotein (C) und die virale Polymerase (P) sind essentiell für die DNA Replikation, die Hüllproteine S, M und L werden für die Umhüllung und damit für die Sekretion des Virus aus den infizierten Hepatozyten benötigt. Die genaue Funktion des X-Proteins und des so genannten HBeAg konnte bisher nicht vollständig bestimmt werden.

Das Coreprotein wird wegen seiner Bedeutung für diese Arbeit in Abschnitt 2.6 im Detail behandelt.

2.4.1. Die Hüllproteine

Der präS1/ präS2/ S- ORF kodiert für alle drei Hüllproteine des HBV Virions. Durch Verwendung von drei verschiedenen Translations-Startcodons, aber eines gemeinsamen Stoppcodons, weisen die drei Hüllproteine L, M, und S einen identischen C-Terminus auf. Alle drei Proteine können durch eine potenzielle N-Glykosylierungsstelle im S-Protein (Asn146) auch in glykosylierten Form vorkommen. Das S-Protein (226 aa), serologisch auch als HBsAg bekannt, ist der Hauptbestandteil der Virushülle und Teil der beiden größeren Hüllproteine. Das M-Protein und das L-Protein enthalten neben der S-Domäne die präS2-Domäne (55 aa), das L-Protein weist neben S und präS2 zusätzlich noch die myristylierte präS1-Domäne (108 aa) auf. Der N-terminale Myristylrest ist essentiell für eine erfolgreiche Infektion (Gripon *et al.*, 1995), (Bruss *et al.*, 1996b). Die präS1-Domäne des L-Proteins kann sowohl nach innen als auch nach außen gerichtet vorliegen (Prange und Streeck, 1995), wobei die Topologie durch eine Interaktion mit dem Chaperon Hsc 70 beeinflusst wird (Lambert und Prange, 2003). Die nach innen gerichtete Orientierung vermittelt während der Virusumhüllungen einen essentiellen Kontakt mit dem innen liegenden Nukleokapsid (Bruss *et al.*, 1994). Die nach außen

gerichtete Orientierung dient der Bindung an ein bisher noch unbekanntes Rezeptormolekül, der Startpunkt in der HBV Infektion. In Tiermodellen konnte zudem gezeigt werden, dass die präS1-Domäne eine essentielle Rolle in der Wirtsspezifität des Virus spielt (Ishikawa und Ganem, 1995), (Chouteau *et al.*, 2001). Neben Virionen werden während einer HBV Infektion auch leere Lipidhüllen sekretiert. (Gerin *et al.*, 1975), (Ganem, 1991). Diese subviralen sphärischen oder filamentösen Partikel werden in mindestens 10^4 - 10^6 -fachem Überschuss zu den Virionen produziert und sind bei den Orthohepadnaviren aus den Hüllproteinen S, M und L in unterschiedlicher Zusammensetzung aufgebaut (Heermann *et al.*, 1987).

2.4.2. Die virale Polymerase

Der P-ORF kodiert für die multifunktionale virale Polymerase, eine sowohl RNA- als auch DNA-abhängige DNA Polymerase mit zusätzlicher Ribonuklease H (RNase H) Aktivität. Die prinzipielle Funktion des P-Proteins liegt in der reversen Transkription der prägenomischen RNA zur Herstellung der (-)-Strang DNA, dem enzymatischen Abbau der RNA-Matrize und der Synthese des DNA (+)-Stranges. Die Translation erfolgt von einem internen Initiationscodon der pgRNA. Möglicherweise wird die Translation des P-Proteins in einem zum Coreprotein abgestimmten Verhältnis durch das Überlesen des ersten Startcodons auf der bicistronischen pgRNA bewerkstelligt (Lin und Lo, 1992), (Fouillot *et al.*, 1993). Das ca. 90 kDa Protein kann in drei funktionelle Domänen unterteilt werden (Radziwill *et al.*, 1990). Die mittlere Reverse Transkriptase Domäne ist, getrennt durch eine Region unbekannter Funktion, auch Spacer-Region genannt, N-terminal mit der TP-Domäne verbunden. Das terminale Protein (TP) dient als Protein-Primer der Initiation der Replikation, und ist essentiell für die Polymerase-vermittelte Verpackung der pgRNA (Bartenschlager *et al.*, 1990). Die C-terminale RNase H-Domäne ist nach der reversen Transkription des (-)-DNA-Stranges für den enzymatischen Abbau der RNA-Matrize zuständig. Die reverse Transkription und die Domänenstruktur der HBV Polymerase, wie auch funktionelle Untersuchungen verschiedener Polymerase-Mutanten weisen auf einen gemeinsamen Ursprung mit retroviralen Reversen Transkriptasen hin (Miller und Robinson, 1986), (Beck *et al.*, 2002).

Funktionelle Untersuchungen, vor allem am Modellsystem der DHBV Polymerase haben gezeigt, dass zelluläre Chaperone einen wichtigen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des P-Proteins haben. Die genaue Zusammensetzung der in

einem Proteinkomplex wirkenden Chaperone wird kontrovers diskutiert (Hu und Seeger, 1996), (Beck und Nassal, 2001), (Beck und Nassal, 2003). Die Funktion der Polymerase bei der Verpackung der prägenomischen RNA in die Kapside und der Replikation des HBV Genoms wird in 2.5 beschrieben.

2.4.3. Das X-Protein

Die biologische Bedeutung des 17 kDa großen HBV X-Proteins, das keine Sequenzhomologien zu anderen viralen oder zellulären Proteinen aufweist, ist bis heute nicht vollständig verstanden. Bisher konnte nur für das Woodchuck Virus (WHV) *in vivo* eine essentielle Rolle in der Etablierung einer Virusinfektion gezeigt werden (Zoulim *et al.*, 1994). *In vitro* konnten weitere vielseitige Funktionen des X-Proteins gefunden werden. Diese umfassen z.B. die Aktivierung der Transkription von viralen und zellulären Genen, eine Steigerung der viralen DNA Synthese, einen Einfluss auf den Protein Abbau und eine Rolle bei der HBx-induzierten Karzinogenese. Ein genereller Mechanismus, der all diese Funktionen vereinigt, könnte die durch HBx regulierte Freisetzung von Kalzium aus zellulären Speichern, wie dem Endoplasmatischem Retikulum (ER) und/oder Mitochondrien in das Zytoplasma, darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass zytoplasmatisches Ca^{2+} die Prolin-reiche Tyrosinkinase-2 (Pyk2) aktiviert, die dann ihrerseits durch Phosphorylierung der Src-Kinase zu einer Verstärkung der HBV Replikation führt. Da aber Ca^{2+} ein universeller und vielseitiger zellulärer Botenstoff ist, wurde angeregt, dass die Freisetzung von Kalzium durch HBx einen wichtigen Überschneidungspunkt vieler verschiedener Signalwege darstellen könnte (Bouchard *et al.*, 2001), (Bouchard *et al.*, 2003). Ein allgemeiner Überblick über die Struktur und die Funktionen des HBV X-Proteins ist z.B. in (Murakami, 1999) und (Arbuthnot *et al.*, 2000), (Nassal, 2002) gegeben.

Erst kürzlich wurde auch im Enten HBV Genom (DHBV) ein „versteckter“ ORF-X gefunden. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten für das von diesem Leserahmen kodierte Protein keine der oben genannten Funktionen gefunden werden. Obwohl eine gemeinsame Abstammung der orthoviralen X-Proteine und des DHBV X-Proteins vermutet wird, bleibt es bisher fraglich, ob Letzteres eine Funktion im viralen Lebenszyklus von DHBV spielt (Chang *et al.*, 2001).

2.5. Infektion und Replikation

Insbesondere die ersten Schritte der HBV Infektion, der Kontakt und der Eintritt in die Leberzelle, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Ein vermutlich spezifischer Rezeptor, der die Aufnahme des Virus in die Leberzelle vermitteln würde, konnte nur für das Entenvirus (DHBV) identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um das Glykoprotein gp180 (Kuroki *et al.*, 1994), (Breiner *et al.*, 1998), (Urban *et al.*, 1998), das zur Familie der Carboxypeptidasen gehört (Kuroki *et al.*, 1995). Da aber gp180 allein die Infizierbarkeit einer Zelle nicht vermitteln kann, müssen Korezeptoren bzw. zusätzliche Rezeptoren noch gefunden werden. Obwohl im Menschen Homologe der Carboxypeptidase identifiziert wurden, konnten für diese keine spezifischen Funktionen in einer HBV Infektion gefunden werden (Seeger und Mason, 2000). Unter den vielen anderen vorgeschlagenen HBV Rezeptorkandidaten konnte keiner bisher bestätigt werden. Die Aufklärung der Internalisierung gestaltet sich gerade durch den Mangel an mit HBV infizierbaren Zelllinien sehr schwierig. Fortschritte könnten in Zukunft aber durch eine kürzlich beschriebene humane Zelllinie, die für eine HBV Infektion empfänglich zu sein scheint, gemacht werden (Gripon *et al.*, 2002).

Der Infektionszyklus von HBV ist schematisiert in Abbildung 2-3 dargestellt. Im Verlauf der Infektion lagern sich die Virionen, vermittelt durch die präS1-Region des großen Hüllproteins (L), an den oder die Rezeptoren auf der Leberzelle an, streifen ihre Hülle ab und dringen als Nukleokapside in die Zelle ein. Die Nukleokapside können dann als vollständige Partikel in die Zellkernpore transportiert werden (Pante und Kann, 2002). Dies erfolgt über einen Importin α / Importin β -abhängigen (Kann *et al.*, 1999), aber wahrscheinlich RanGTP-unabhängigen Mechanismus (Rabe *et al.*, 2003). Wahrscheinlich kommt es in der Kernpore zum Zerfall (Uncoating) der Kapside und zur Freisetzung des viralen Genoms, welches in den Kern transportiert wird. Die cccDNA dient dann als Matrize für die Transkription der genomischen und subgenomischen RNAs. Diese werden im Zytosol in die viralen Proteine translatiert. Die prägenomische RNA (pgRNA) dient, wie beschrieben, sowohl zur Herstellung der Coreproteine (C) als auch der viralen Polymerase (P). Die pgRNA interagiert wahrscheinlich gleichzeitig mit ihren beiden Genprodukten. Nach Herstellung der Polymerase wird die pgRNA von dieser selbst revers-transkribiert und, eventuell

simultan, in sich aus Coreprotein Dimeren assemblierende Kapside verpackt (Nassal und Schaller, 1993), (Nassal und Schaller, 1996).

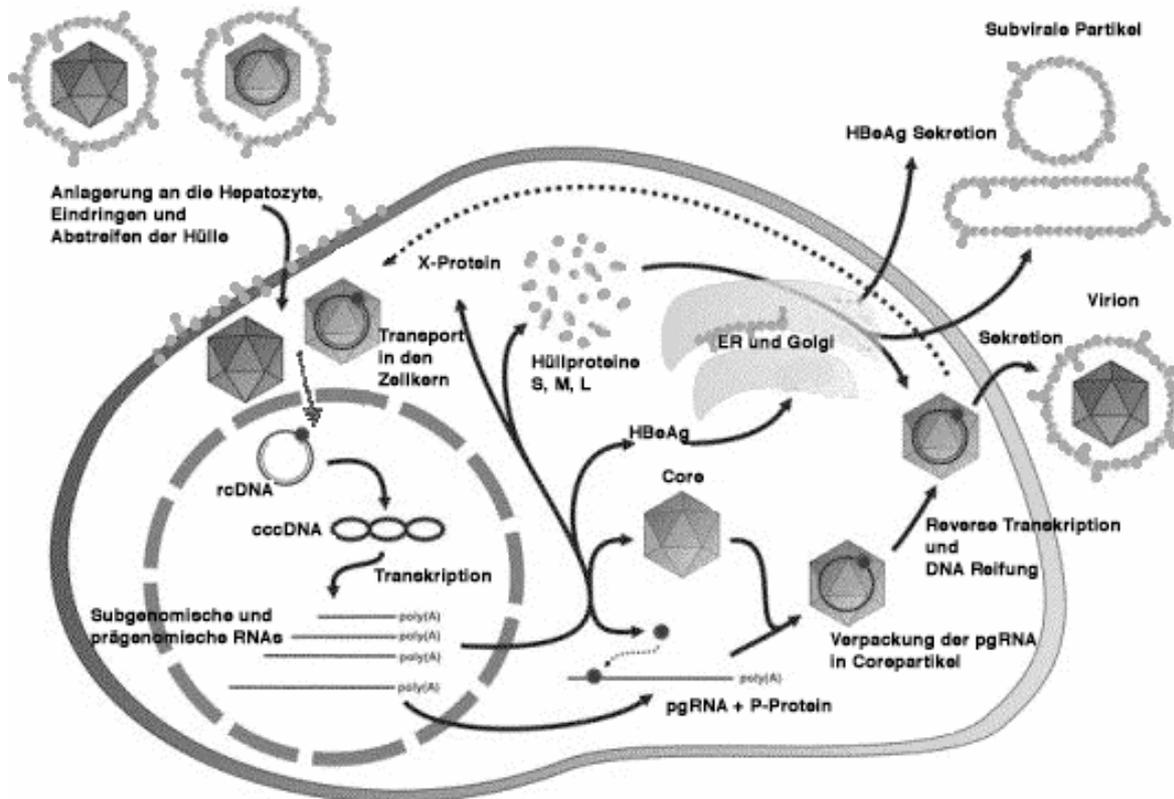


Abbildung 2-3: Schematischer Infektionszyklus der Hepadnaviren: Vermittelt über ein oder mehrere Rezeptoren dringt das Virion nach Abstreifen der Hülle als Nukleokapsid in die Leberzelle ein. Dieses wird zur Kernpore transportiert und setzt dort sein Genom frei. Die Transkripte der cccDNA werden im Zytoplasma in die viralen Proteine translatiert, und die prägenomische RNA wird zusammen mit der Polymerase in neu synthetisierte Core Partikel verpackt. Nach reverser Transkription werden Nukleokapside, die das reife DNA Genom enthalten entweder zum Zellkern zurücktransportiert (gestrichelte Linie) oder sie verlassen nach Umhüllung die Zelle auf sekretorischem Weg. Für eine detailliertere Beschreibung siehe Text.

Die reverse Transkription der HBV Polymerase ist charakterisiert durch die hochspezifische Bindung der Polymerase an eine RNA-Sekundärstruktur, die Epsilon (ϵ)-Haarnadelschleife (ϵ -stem-loop) am 5'-Ende der pgRNA (Junker-Niepmann *et al.*, 1990), (Rieger und Nassal, 1996). An dieser ϵ -RNA wird ein komplementärer, vier Basen langer DNA-Primer hergestellt, der kovalent mit einem Tyrosinrest der TP-Domäne verbunden ist (Weber *et al.*, 1994), (Zoulim und Seeger, 1994). Die Synthese beider DNA-Stränge umfasst mehrere Matrizen Sprünge und den enzymatischen Abbau des RNA-Stranges durch die RNase H Aktivität der

Polymerase (Seeger *et al.*, 1986), (Liu *et al.*, 2003). Nach Beendigung der Replikation stehen nur denjenigen Nukleokapsiden, die das „reife“, also wieder teilweise doppelsträngige HBV Genom enthalten, zwei unterschiedliche Wege offen (Gerelsaikhon *et al.*, 1996). In der frühen Phase der HBV Infektion führt der Weg der „reifen“ Nukleokapside zurück in den Zellkern. Zu diesem Zeitpunkt stehen nur sehr wenige Hüllproteine zur Verfügung. Der Rücktransport der Nukleokapside dient zur Amplifizierung der cccDNA, um die Verfügbarkeit der Matrizen zur Transkription in RNA zu erhöhen (Kann *et al.*, 1999). Der Einfluss einer Phosphorylierung auf den Kerntransport wird in 2.6.5 näher beschrieben. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion liegen höhere Konzentrationen an Hüllproteinen in der Zelle vor, wodurch auch der zweite Bestimmungsweg der Kapside eingeschlagen werden kann. Es kommt zur Interaktion der Nukleokapside mit der präS1-Domäne des großen Hüllproteins (L) (Bruss *et al.*, 1996a), (Ponsel und Bruss, 2003). Beim Durchqueren des Membransystems des Endoplasmatischen Retikulums werden die „nackten“ Kapside mit einer aus dem ER-stammenden Doppellipidschicht umgeben, in welchen die Hüllproteine eingelagert vorliegen (Huovila *et al.*, 1992). Das umhüllte Kapsid wird beim Durchwandern im Golgi-Komplex weiter prozessiert und auf sekretorischem Weg aus der Leberzelle ausgeschleust, ohne dass diese dabei geschädigt wird.

2.6. Das Coreprotein im Detail

2.6.1. Prä-Coreprotein

Der präC/ C-ORF kodiert für zwei Genprodukte. Durch Translation des C-ORF kommt es zur Synthese des 21 kDa großen Strukturproteins, aus dem das Nukleokapsid aufgebaut wird. Durch Kotranslation des vorgeschalteten präC-ORF entsteht das 25 kDa Prä-Coreprotein. Es handelt sich um ein Corefusionsprotein, in dem die ersten 19 der 29 zusätzlichen Aminosäurereste der präC-Region als Signalpeptid fungieren. Das Signalpeptid markiert das Protein für eine Einschleusung in den Sekretionsweg der Zelle. Hier erfolgt eine proteolytische Verkürzung des N-Terminus zu einem 22 kDa Vorläuferprotein und eine abschließende C-terminale Prozessierung zum so genannten HBeAg mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa. Trotz der hohen Homologie zum eigentlichen Strukturprotein ist das HBeAg nicht fähig, sich zu Kapsiden zu assemblieren (Uy *et al.*, 1986), (Bruss und Gerlich, 1988). Der N-Terminus enthält den Cysteinrest (Cys-

7), der das HBeAg dazu befähigt, eine intramolekulare Disulfidbrücke mit einem weiteren Cysteinrest (Cys61) auszubilden. Im Coreprotein ist durch die Verwendung des zweiten Startcodon der Aminosäurerest Cys-7 nicht enthalten, wodurch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cys61- Resten zweier benachbarter Coreprotein Monomere ermöglicht werden (Nassal und Rieger, 1993). Die genaue Funktion des HBeAg ist nicht bekannt. Durch die Sezernierung ins Serum dient es aber als wichtiger klinischer Marker für eine aktive Virusvermehrung.

2.6.2. Die zwei Domänen des Coreproteins

Das Hepatitis B Coreprotein besteht je nach Subtyp aus 183 aa (Subtyp *ayw*) bzw. 185 aa (Subtyp *adw*) mit einer molekularen Masse von ca. 21 kDa. Das Coreprotein lässt sich, wie in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt, in zwei unterschiedliche Domänen unterteilen.

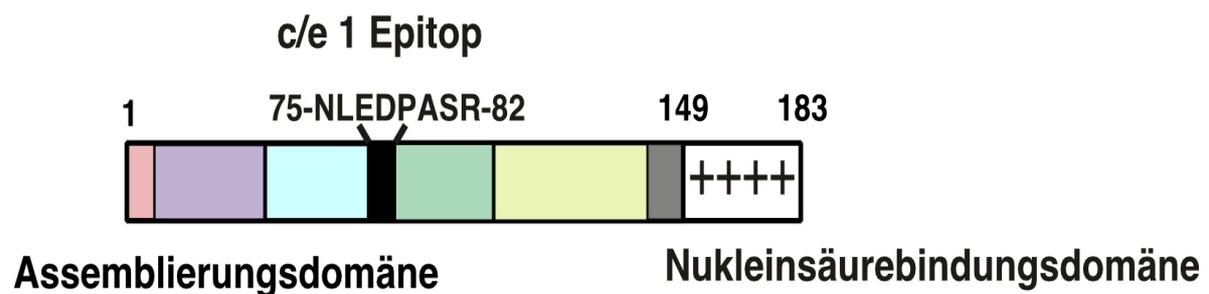


Abbildung 2-4: Primärsequenz des HBV Coreproteins. Die Assemblierungsdomäne umfasst mindestens die Aminosäurereste aa 1 - 140. Die hauptimmunogene Region (c/e1 Epitop) wird von Resten aa 75 - 82 gebildet. Die sich anschließende Nukleinsäurebindungsdomäne beginnt mit aa 150 und ist durch einen hohen Gehalt an basischen Aminosäuren (++++) gekennzeichnet.

Der N-terminale Bereich umfasst die ersten 149 Aminosäurereste. Diese bilden die so genannte Assemblierungsdomäne (Assembly domain), die das hauptimmunogene c/e1 Epitop zwischen den aa 75 - 82 beinhaltet. Der C-terminale Bereich von aa 150 - 183 des HBV Coreproteins besitzt insgesamt 16 Argininreste, wovon 14 zu vier Arginin Wiederholungsblöcken (I - IV) zusammengefasst werden (Hatton *et al.*, 1992). Die Argininreste vermitteln zunächst die spezifische Bindung von pgRNA zur Verpackung in Nukleokapside, später die Assoziation mit dem DNA Genom (Nassal, 1992a), (Petit und Pillot, 1985). Durch ihren hohen Gehalt an basischen Aminosäuren wird diese Region auch als „Protamin-ähnliche“ Domäne bezeichnet. Versuche mit C-terminalen Deletionsmutanten zeigten, dass die Aminosäurereste der „Protamin-ähnlichen“ Domäne für den Assemblierungsprozess

nicht benötigt werden, wobei die minimale Assemblierungsdomäne mindestens die ersten 140 aa umfassen muss (Birnbaum und Nassal, 1990), (Gallina *et al.*, 1989). Weitere Verkürzungen führen zum Verlust der Assemblierungsfähigkeit. Dies könnte durch die Einbuße des Aminosäurerest Prolin 138 vermittelt werden, da dieser vermutlich einen wichtigen Bestandteil eines zentralen Kontaktpunktes zwischen fünf bzw. sechs Coreprotein-Untereinheiten im Kapsid darstellt (Metzger und Bringas, 1998). Der Bereich zwischen dem letzten Aminosäurerest der Assemblierungsdomäne (aa 140) und dem ersten Aminosäurerest der Nukleinsäurebindungsdomäne (aa 150) wird durch ein kurzes Peptid mit der Aminosäuresequenz STLPETTVV abgedeckt, dem eine Art Gelenk- oder Abstandhalterfunktion im Assemblierungsprozess zugeschrieben wird (Watts *et al.*, 2002).

2.6.3. Struktur des Coreproteins

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Faltung des Coreproteins und der dreidimensionalen Struktur der Corepartikel wurde eine in *E. coli* exprimierte, C-terminal verkürzte Variante des HBV Coreproteins verwendet, welche die in 2.6.2 erwähnte Assemblierungsdomäne, aber nicht die Nukleinsäurebindungsdomäne enthielt. Die dreidimensionale Faltung des Coreproteins konnte durch die Gewinnung kryo-elektronenmikroskopischer Daten vieler einzelner Corepartikel mit einer Auflösung von 7,4 Å bestimmt werden (Böttcher *et al.*, 1997). Die Faltung der Polypeptidkette enthält, wie schon aus früheren Untersuchungen vermutet, einen sehr hohen Anteil an α -helikalen Bereichen (Wingfield *et al.*, 1995), (Bringas, 1997). Diese konnten durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 3,3 Å im Detail bestätigt werden (Wynne *et al.*, 1999a), (Wynne *et al.*, 1999b). Die kristallographischen Untersuchungen ergaben im C-terminal verkürzten aa 1 - 149 Coreprotein fünf α -Helices, die durch kurze Schleifen miteinander verbunden sind. Abbildung 2-5 zeigt die schematische Darstellung zweier Coreprotein Monomere aus kristallographischen (A) bzw. kryo-elektronenmikroskopischen Daten (B). Die Helix α_3 erstreckt sich über die Aminosäurereste 50 - 73 und geht, durch einen kurzen, nicht-helikalen Bereich getrennt, in die geknickte Helix α_4 über. Zusammen bilden sie die dominierende Struktur des Coreproteins, eine so genannte „Hairpin“ (Haarnadel)-Struktur. Die erste, sehr kurze α -Helix (α_1) wird von den

Aminosäureresten aa 13 - 17 gebildet und schließt unmittelbar an den N-Terminus, eine aus den ersten 12 Aminosäureresten gebildete, unstrukturierte Region, an.

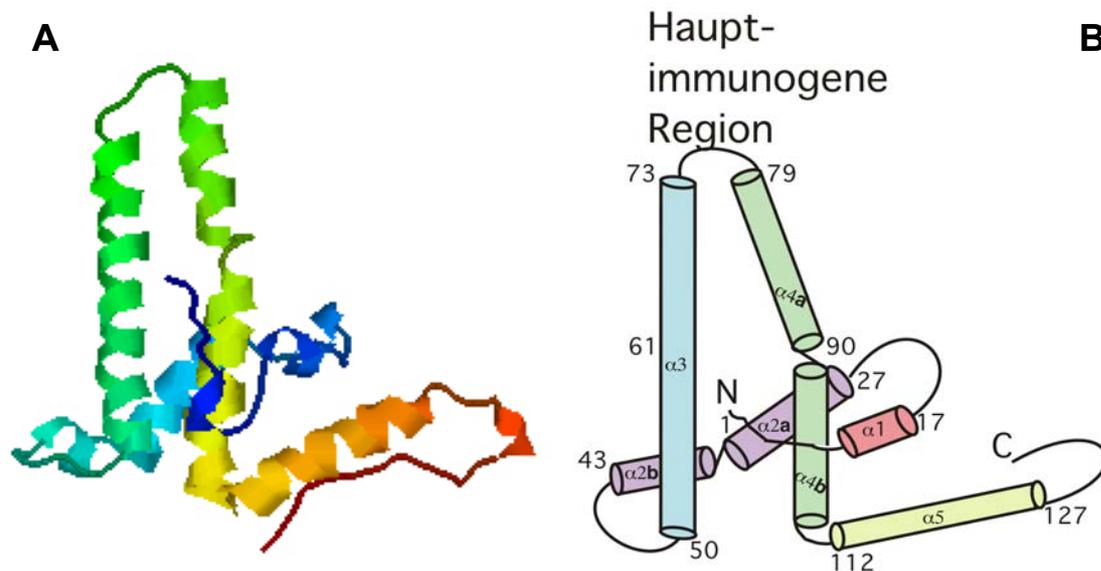


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung eines Coreprotein Monomers. (A) Tertiärstruktur des Core Monomers nach röntgenkristallographischen Daten (Wynne *et al.*, 1999a); (B) Das C-terminal verkürzte Coreprotein bildet fünf α -Helices aus, die durch kurze Schleifen miteinander verbunden sind. Die senkrecht stehenden Helices $\alpha 3$, $\alpha 4a$ und $\alpha 4b$ bilden in einem Coreprotein Dimer das Vier-Helix-Bündel (In Anlehnung an (Böttcher *et al.*, 1997)). Zur besseren Veranschaulichung wurden in B die einzelnen Helices in Anlehnung an die in Abbildung 2-4 dargestellte Primärsequenz identisch eingefärbt.

Die Helix $\alpha 1$ ist von der zweiten Helix $\alpha 2$ (aa 27 - 43) durch eine längere Schleife getrennt und umschließt die „Hairpin“-Struktur fast vollständig. Die C-terminale Region wird durch die fünfte Helix $\alpha 5$ (aa 112 - 127), einer Prolin-reichen Schleife (aa 128 - 136) und einem kurzen gestreckten Bereich (aa 137 - 142/ 143) gebildet. Die Faltung der letzten Aminosäurereste aa 144 - 149 konnte nicht aufgelöst werden. Die Stabilität des Monomers wird durch ein hydrophobes Kernstück vermittelt, welches aus stark konservierten Aminosäureresten innerhalb $\alpha 1$, der Schleife zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$, einem Teil von $\alpha 4$ und der Helix $\alpha 5$ gebildet wird. In der Schleife zwischen der dritten und vierten Helix ($\alpha 3$ und $\alpha 4$) bilden die Reste aa 78 - 83 die so genannte hauptimmunogene Region (Conway *et al.*, 1998a), (Wynne *et al.*, 1999a). Durch die Möglichkeit, in diese ohne Verlust der Assemblierungsfähigkeit kurze Peptidsequenzen, aber auch vollständige Proteine inserieren zu können, spielt die antigene Schleife eine wichtige Rolle in dieser Arbeit (siehe auch 2.6.6).

Ein Coreprotein Dimer hat die Form eines umgedrehten T. Bei seiner Bildung lagern sich je zwei Monomere zu einem so genannten rechtshändigen Vier-Helix-Bündel durch eine sehr starke Interaktion von zwei α 3-Helices und einer schwächeren Interaktion zweier α 4-Helices zusammen. Diese Vier-Helix-Bündel bilden die herausstehenden „Spikes“ auf der Coreoberfläche (Böttcher *et al.*, 1997), (Conway *et al.*, 1997). Die hydrophoben Kernstücke der Monomere lagern sich zusammen und bilden eine Art Fuß, der später zur Oberfläche der Corepartikel, auch „shell“ genannt, zusammengesetzt wird. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten Cys61 innerhalb der α 3-Helix jedes Monomers, werden diese miteinander vernetzt. Der N-Terminus jeder Untereinheit kommt dabei in engen Kontakt mit der zweiten Untereinheit, vermutlich innerhalb des Sequenzbereiches um den Cysteinrest Cys61 (Conway *et al.*, 1998b).

2.6.4. Struktur des Kapsids

In *E. coli* exprimierte HBV Coreproteine können sphärische Partikel mit ikosahedraler Symmetrie in zwei verschiedenen Größen ausbilden (Crowther *et al.*, 1994). Sie besitzen einen Durchmesser von 32 nm bzw. 36 nm und bestehen aus 180 bzw. 240 Monomeren des Coreproteins. Durch vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen von nicht-umhüllten HBV Nukleokapsiden aus Leberzellisolaten und HBc-abgeleiteten rekombinanten Partikeln, konnten, bei begrenzter Auflösung, keine auffälligen Unterschiede in der Partikel Morphologie gefunden werden (Kenney *et al.*, 1995). Durch das von Caspar und Klug eingeführte Prinzip der Quasi-Äquivalenz lassen sich diese Partikel durch ihre Triangulationszahl beschreiben (Caspar und Klug, 1962). Dabei werden 90 Dimere in Partikeln mit einer Triangulationszahl von 3 ($T = 3$) und 120 Dimere mit ($T = 4$) angeordnet. Bei einer Triangulationszahl von $T = 4$ werden aus vier quasi-identischen Coreprotein-Untereinheiten (UE), als UE A - D bezeichnet, die Dimere AB oder CD gebildet. Unter Anwendung einer ikosahedralen Symmetrie werden diese zu einem Kapsid arrangiert. Dabei kommt es zur Anordnung der Einheiten an einer fünffachen, dreifachen und einer zweifachen (= quasi-sechsfachen) Symmetrieachse. Bei einer Triangulationszahl von $T = 3$ hingegen werden drei quasi-identische Coreprotein-Untereinheiten (UE A - C) als AB oder CC Dimere angeordnet. Die biologische Bedeutung der beiden Vorkommensformen ist nicht bekannt. Da das Verhältnis von ($T = 4$) zu ($T = 3$) Kapsiden in Leberzellisolaten mit ca. 13 : 1 deutlich höher ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den größeren $T = 4$ Partikel um die

biologisch relevantere Form handelt (Kenney *et al.*, 1995). Durch die Expression von C-terminal verkürzten Coreprotein Varianten in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der basische C-Terminus das Verhältnis von (T = 4) zu (T = 3) Partikel beeinflusst. Mit zunehmender carboxyterminaler Verkürzung kann das Verhältnis deutlich hin zu den (T = 3)-Partikeln verschoben werden (Zlotnick *et al.*, 1996).

In Abbildung 2-6 sind zwei Kapside mit einer Triangulationszahl von T = 4 als dreidimensionale Rekonstruktionen aus kryo-elektronenmikroskopischen (A) bzw. röntgenkristallographischen Daten (B) schematisch dargestellt.

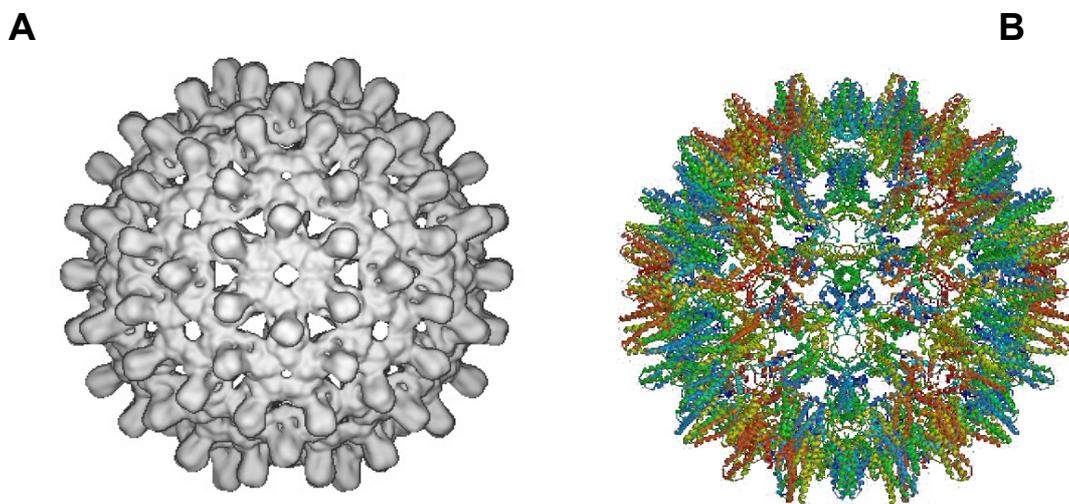


Abbildung 2-6: Dreidimensionale Rekonstruktion des HBV Kapsids. (A) Nach kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Böttcher *et al.*, 1997); (B) Nach röntgenkristallographischen Daten (Wynne *et al.*, 1999a). Die dargestellten Partikel mit einer Triangulationszahl von T = 4 bestehen aus 120 Coreprotein Dimeren, die mit ikosahedraler Symmetrie angeordnet werden.

Die Packung der Dimere zu Kapsiden ist bei beiden Partikelformen sehr ähnlich, sie bilden eine ikosahedral angeordnete, innere Proteinschale, die durch Poren entlang der zweifachen, dreifachen und quasi-dreifachen Symmetrieachse unterbrochen wird. Die Poren entlang der zweifachen Symmetrieachse haben z.B. einen Durchmesser von ca. 1,2 - 1,5 nm und sichern wahrscheinlich den freien Fluss von kleineren Molekülen wie Nukleotiden, die für die virale Replikation benötigt werden (Crowther *et al.*, 1994). Zudem bieten sie die Möglichkeit einer, zumindest teilweisen, Exposition des C-Terminus (Wynne *et al.*, 1999a). Senkrecht in der Schale der Kapside stehen die aus den Vier-Helix-Bündeln gebildeten „Spikes“, die insgesamt eine Länge von ca. 4,5 nm haben, aber nur ca. 2,5 nm aus die Oberfläche

herausragen. An der Basis der Spikes liegen ringförmig verteilt verschiedene Aminosäurereste, denen zusammen mit auf der Spitze des Spikes liegenden Resten eine bedeutende Rolle in der Interaktion mit den Hüllproteinen bei der Morphogenese der Virionen zugeschrieben wird (Dyson und Murray, 1995), (Böttcher *et al.*, 1998), (Ponsel und Bruss, 2003).

In heterologen Expressionssystemen wie z.B. in *E. coli* kann die Assemblierung von HBV Partikel aus Coreproteinen auch ohne die Beteiligung weiterer Virus Proteine spontan erfolgen. Wie schon beschrieben ist der Arginin-reiche C-Terminus für eine effektive Assemblierung von HBc-Partikeln entbehrlich. Für die Partikelbildung (Assembly) wurde ein dreistufiges Modell vorgeschlagen, bei dem es zunächst zur Homo-Dimerisierung von Coreproteinen kommt (Zhou und Standring, 1992), (Chang *et al.*, 1994), (Wingfield *et al.*, 1995). *In vitro* wird bei C-terminal verkürzten Coreprotein Dimeren nach Überschreiten einer kritischen Konzentration von ca. 0,8 μM , über die Bildung eines Trimers aus Dimeren, die spontane Assemblierung zu Kapsiden ausgelöst (Seifer und Standring, 1995), (Zlotnick *et al.*, 1996). Nur Coreprotein Dimere können als Zwischenstufen bei der Assemblierung nachgewiesen werden. Die Partikelbildung ist dabei nicht nur von der Proteinkonzentration, sondern auch von der Ionenstärke des umgebenden Puffers abhängig. So können Dimere, ausgehend von einer niedriger Ionenstärke und einem hohen pH-Wert durch Überführung in einen Puffer mit hoher Ionenstärke bei neutralem pH-Wert zur Assemblierung gebracht werden. Im Gegensatz dazu können Partikel durch sehr starke Verdünnung, durch Anhebung des pH-Wertes oder durch Absenkung der Salzkonzentration zur Dissoziation getrieben werden. Bei der Verwendung von verkürzten Coreproteinen liegen die Vorzüge des bakteriellen Systems in den guten Expressionsraten, der relativ unkomplizierten Isolierung aus den Bakterienzellen, sowie der einfachen Anreicherung der partikulären Formen über ihr Sedimentationsverhalten in einem Sucroседichtegradienten. Wildtyp HBc1-183 Partikel konnten dagegen bisher nur mit relativ geringer Ausbeute in heterologen Expressionssystemen hergestellt werden.

2.6.5. Phosphorylierung des Coreproteins

1980 wurde von Albin *et al.* die Aktivität einer Protein Kinase innerhalb isolierter HBV Partikel nachgewiesen (Albin und Robinson, 1980). Da das HBV Genom keinen offenen Leserahmen für eine Protein Kinase enthält, muss es sich um eine zelluläre

Kinase handeln. Gerlich *et al.* zeigten, dass nur eine kleine Fraktion der Coreproteine innerhalb eines Partikels phosphoryliert wird, und dass diese Phosphorylierung gegen eine Dephosphorylierung durch eine Alkalische Phosphatase resistent war. Beide Resultate sprachen dafür, dass der Kinase-Akzeptor, also der C-Terminus des Coreproteins, zusammen mit der Kinase im Lumen der Kapside vorliegen muss (Gerlich *et al.*, 1982). Trotz zahlreicher *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen konnte die Identität der Kinase bisher nicht eindeutig geklärt werden. Die Verpackung und Detektion der Protein Kinase C (PKC) in reifen HBV Partikeln wurde beschrieben, wobei aber die PKC-vermittelte Phosphorylierung der Coreproteine für die Verpackung von pgRNA nicht zwingend benötigt wird (Kann *et al.*, 1993), (Kann und Gerlich, 1994).

Erst kürzlich wurden die Serin-Arginin-Protein-spezifischen-Kinasen 1 und 2 (SRPK 1/2) als mögliche HBV Coreprotein-spezifische Kinasen vorgeschlagen (Daub *et al.*, 2002). Aufgrund ihrer Bedeutung in Teilen dieser Arbeit wird auf diese Kinasen in 2.6.5.2 gesondert eingegangen. Im HBV Coreprotein konnten drei Serinreste (S155, S162 und S170) als wahrscheinliche Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die in drei SPRRR-Motiven hintereinander angeordnet vorliegen (Liao und Ou, 1995). Im Entenhomolog des Coreproteins (DHBc) findet eine Phosphorylierung hauptsächlich an den Aminosäureresten T239, S245, S257 und S259 des C-Terminus statt (Yu und Summers, 1994b), (Yu und Summers, 1994a), (Gazina *et al.*, 2000).

Die Phosphorylierungsstellen innerhalb der C-terminalen Domänen des HBV und HBV Coreproteins sind in Abbildung 2-7 dargestellt.

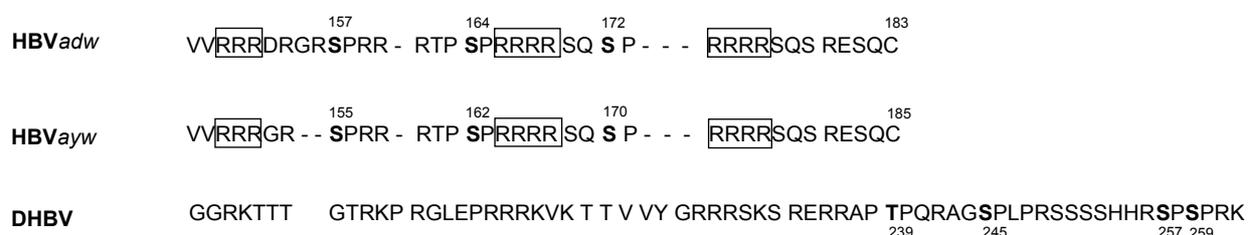


Abbildung 2-7: Die C-terminale Domäne des HBV und DHBV Coreproteins. Die Phosphorylierungsstellen im HBV Coreproteins des Subtyps *adw* bzw. Subtyps *ayw* und die des DHBV Coreproteins sind mit Fettdruck gekennzeichnet.

Im DHBV Coreprotein (DHBc) scheint die Phosphorylierung des Serinrestes S245 einen Einfluss auf die Stabilität der Quartärstruktur des Kapsids auszuüben, die erst zur Freisetzung des Genoms im Kern gelockert werden sollte (Köck *et al.*, 2003).

Überlappend mit den Argininblöcken II – IV liegt ein Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localisation Signal = NLS) (Eckhardt *et al.*, 1991). Das NLS wird von zwei PRRRRSQS-Sequenzwiederholungen gebildet, und zeigt eine sehr hohe Konservierung innerhalb der Orthohepadnavirenfamilie (Yeh *et al.*, 1990). Da das Kernlokalisierungssignal teilweise mit den Phosphorylierungsstellen überlappt, wird dem Phosphorylierungsstatus eine wichtige Rolle in der Regulation des Kerntransport zugeschrieben (Liao und Ou, 1995), (Gazina *et al.*, 2000). So wird vermutet, dass die Kernlokalisierung durch Phosphorylierung der Serinreste negativ reguliert werden kann, da z.B. zytoplasmatisches einen höheren Phosphorylierungsgrad als nukleäres Coreprotein aufweist (Yeh *et al.*, 1995), (Liao und Ou, 1995). Im Entenhomolog des Coreprotein (DHBc) wurde bisher kein Einfluss der Phosphorylierung auf die Kernlokalisierung nachgewiesen, vermutlich weil die Kernlokalisationssequenz nicht mit einer der putativen Phosphorylierungsstellen überlappt. Dies setzt einen anderen Mechanismus voraus, der das Virusgenom zum Zellkern dirigieren kann (Mabit *et al.*, 2001). Scheinbar widersprüchlich zur Lokalisation des phosphorylierten Coreproteins im Zytoplasma scheinen jüngste Daten zu sein, die aufzeigen, dass erst die Phosphorylierung der Coreproteine zu einer Exposition des Kernlokalisierungssignals an der Partikeloberfläche führt. Durch ein zugängliches Kernlokalisierungssignal können die vollständig assemblierten Partikel zur Kernpore dirigiert und in einem Importin α / Importin β -abhängigen Transportsystem in diese hinein befördert werden. Dort zerfallen die Nukleokapside, um das virale Genom in den Zellkern freizusetzen (Kann *et al.*, 1999), (Pante und Kann, 2002).

2.6.5.2. Funktionen der Serin-Arginin-Protein-Spezifischen-Kinasen 1/ 2 (SRPK 1/ 2)

Erst kürzlich konnten Daub *et al.* nachweisen, dass im Gesamtzelllysat der humanen Hepatomazelllinie HuH7 die Serin-Arginin-Protein-Spezifischen-Kinasen 1 und 2 (SRPK 1 und SRPK 2) mit dem Arginin-reichen C-Terminus des HBV Coreproteins eine starke, spezifische Interaktion eingehen können. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die drei Phosphorylierungsstellen des C-Terminus sowohl *in vivo* als

auch *in vitro* als Substrat der Kinasereaktion dienen konnten. Eine Kinaseaktivität der schon in 2.6.5 erwähnten Protein Kinase PKC hingegen war unwahrscheinlich.

Die Kinase SRPK 1 besteht aus 655 Aminosäuren, woraus sich eine entsprechende molekulare Masse von ca. 74,3 kDa berechnen lässt. Sowohl aus Zellextrakten isolierte, wie auch *in vitro* translatierte SRPK 1 weist aber bei Auftrennung im denaturierenden SDS-PAGE ein abweichendes Laufverhalten auf, da die Kinase bei ca. 92 kDa detektiert werden kann (Gui *et al.*, 1994a). Die Kinase SRPK 2 (686 aa) hat sogar eine apparente molekulare Masse von ca. 155 kDa (Wang *et al.*, 1998), (Daub *et al.*, 2002). Die beiden Kinasen haben einen hohen Verwandtschaftsgrad mit ca. 78 % Identität innerhalb der Kinase-Domänen und zeigen sowohl eine zytoplasmatische als auch nukleäre Verteilung. Die bekannten Funktionen der beiden Kinasen umfassen die spezifische Phosphorylierung von Serin (S)- und Arginin (R)-reichen Proteinen. Diese sind durch das Vorhandensein einer SR-Domäne und einer RNA-Bindedomäne gekennzeichnet, und spielen häufig eine wichtige Rolle im Spleißen (Splicing) von prä-mRNA. Eine Phosphorylierung durch die Kinasen ist Zellzyklus-abhängig und kann dabei sowohl die Lokalisation als auch die Interaktion der „Splicing“ Faktoren direkt regulieren (Gui *et al.*, 1994a), (Wang *et al.*, 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Phosphorylierung von Serin (S)- und Arginin (R)-reichen Domänen, eine unspezifische Bindung von RNA verhindert werden kann (Tacke *et al.*, 1997).

Theoretisch ließe sich diese Funktion sehr einfach auch auf die spezifische Bindung der pgRNA an das phosphorylierte HBV Coreprotein übertragen. Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, dass SRPK 1 wie auch SRPK 2 im Replikationszyklus von HBV für die Phosphorylierung des Coreproteins zuständig sind. Welche Rolle aber die *in vitro* bzw. *in vivo* Phosphorylierung durch SRPK 1/2 bei der spezifischen Bindung der pgRNA und später des DNA Genoms spielen kann, wurde bisher nicht untersucht. Auch ein möglicher Einfluss einer SRPK-spezifischen Phosphorylierung auf den Kerntransport der Nukleokapside ist noch nicht geklärt. Interessanterweise konnten von Daub *et al.* zwei zusätzliche Serinreste (S176 and S178 im Subtyp ayw) am Ende des C-Terminus identifiziert werden, die innerhalb einer SRPK-Konsensussequenz liegen und somit als putative Phosphorylierungsstellen eine noch ungeklärte Rolle im Replikationszyklus von HBV spielen könnten (Daub *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung weiterer Serinreste scheint wahrscheinlich, da auch nach

Mutation der drei bisher bekannten Phosphorylierungsstellen des Coreproteins ein schwacher Grad an Phosphorylierung nachweisbar ist (Liao und Ou, 1995).

Insgesamt verdeutlichen die zahlreichen, teilweise widersprüchlichen Daten, dass die Rolle der Coreprotein Phosphorylierung nicht gut verstanden ist. Die Aufklärung einer so zentralen Modifikation innerhalb des Lebenszyklus von HBV ist aber von großer Bedeutung.

2.6.6. Kapsid-ähnliche Partikel

Generell nennt man rekombinante Kapside, die aus viralen Proteinuntereinheiten bestehen und kein replikationsfähiges Genom enthalten, Kapsid-ähnliche Partikel (Capsid-like particles = CLPs) bzw. im Fall von nicht-umhüllten Viren auch Virus-ähnliche Partikel (Virus-like particles = VLPs).

Die Fähigkeit, sich ohne die Beteiligung anderer viraler Proteine in heterologen Expressionssystemen zu nicht-genomhaltigen, und daher nicht-infektiösen Partikeln zu assemblieren, machen HBV Coreproteine zu erfolgsversprechenden Vertretern bei der Herstellung von CLPs. Im ansonsten stark konservierten Core Gen wurden zahlreiche natürliche Mutationen gefunden, die nicht zu einer negativen Beeinflussung der Assemblierungsfähigkeit führen. Dies zeigt, dass in eingegrenzten Bereichen der Coresequenz Deletionen oder Insertionen von Fremdsequenzen geduldet werden können. Zahlreiche empirische Untersuchungen mit relativ kurzen Peptidsequenzen zeigten, dass der N-Terminus, der C-Terminus und das hauptimmunogene Epitop der Spikes für Fusionen bzw. Insertion prinzipiell geeignet sind (Borisova *et al.*, 1996), (Lachmann *et al.*, 1999). 1999 konnte erstmals ein vollständiges Protein, das 238 aa grün fluoreszierende Protein (Green Fluorescent Protein = GFP), so in die Sequenz des Coreproteins inseriert werden, dass die Fähigkeit zur Partikelbildung davon nicht beeinflusst wurde (Kratz *et al.*, 1999).

Somit können prinzipiell mindestens drei sehr unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten der HBc-CLPs unterschieden werden, die auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fanden.

1. CLPs als hochgeordnete Trägeroberfläche für Strukturanalysen
2. CLPs zur Impfstoff-Herstellung
3. CLPs als Transportbehälter für heterologe Nukleinsäuren (Gentransfer)

Für die Herstellung von HBc-abgeleiteten CLPs kommen nicht nur reine Deletions- und/oder Insertions-Varianten des Coreproteins in Frage. Im Gegensatz zu den chimären Partikeln, bei denen nur identische HBV Corefusionsproteine exprimiert und assembliert werden, werden bei Mosaikpartikeln, verschiedene Proteinuntereinheiten in einem Partikel zusammengesetzt. Dies kann z.B. durch Koexpression zweier unterschiedlicher Gene, einem unmodifiziertem Coreprotein und einem Corefusionsprotein in ein und derselben Zelle geschehen. Dieses System bietet aber nur sehr begrenzte Möglichkeiten, die unterschiedlichen Proteinuntereinheiten in einem definierten Verhältnis zueinander zu exprimieren. Die definierte Zusammensetzung der Mosaikpartikel *in vitro* wäre daher von großem Vorteil.

2.6.6.1. HBc-CLPs als Trägeroberfläche für hochauflösende Strukturuntersuchungen

Die repetitive Anordnung der gleichförmigen Proteinuntereinheiten im Wildtyp HBV Partikel ermöglichte die Analyse der Struktur mit hoher Auflösung (Böttcher *et al.*, 1997). Daher sollte es theoretisch möglich sein, HBc-abgeleitete CLPs als ikosahedral symmetrische Plattform für Fremdproteine zu nutzen. Durch eine topologisch geeignete Fixierung am Coreprotein-Träger, sollte es prinzipiell möglich sein, die Fremd-Domänen einer ikosahedral symmetrischen Anordnung zu unterwerfen. Dadurch sollten die Fremdproteine wie der Träger selbst, einer hochauflösenden Strukturanalyse zugänglich werden. Prinzipiell wäre dies eine neue Methode, um auch für nicht kristallisierbare Proteine eine Strukturanalytik im Bereich von besser als 10 Å Auflösung zu erreichen. Viele einzelne chimäre Partikel werden durch kryo-elektronenmikroskopische Verfahren abgebildet, um dann zu einer Summe von Einzelbildern zusammengefasst zu werden. Die daraus bezogenen Elektronendichtekarten können schließlich einer Bildrekonstruktion der Partikel zugänglich gemacht werden.

Prinzipiell sind sowohl C-terminale als auch zentrale (c/e1) Insertionen für eine Strukturanalyse von Fremdproteinen denkbar. Voraussetzung für eine optimale Übertragung der ikosahedralen Symmetrie ist allerdings eine möglichst starre Verknüpfung der Fremdprotein-Untereinheiten mit dem Träger. Bei zu flexibler Befestigung könnten die einzelnen Fremd-Domänen räumlich nicht exakt gleiche Positionen einnehmen, was in der Analytik nur zu einer gemittelten Elektronendichte

mit entsprechend geringerer Auflösung führt. So konnte kürzlich anhand der Insertion von GFP in das c/e1 Epitop gezeigt werden, dass beide Proteinuntereinheiten eine korrekte räumliche Faltung ausbilden konnten und die GFP-Domänen an der Oberfläche der Partikel präsentiert wurden. Durch die Verwendung einer flexiblen Fixierung der GFP-Einheiten am Träger konnte jedoch bei der Auswertung der erhaltenen Elektronendichtekarte keine ausreichende Auflösung der GFP-Struktur erzielt werden (Kratz *et al.*, 1999). Durch Modifikation und /oder Verkürzung der Linkersequenzen könnte möglicherweise eine verbesserte Fixierung der GFP-Domänen auf der Kapsidoberfläche erreicht werden. Die Wahl einer geeigneten Linkersequenz wird einerseits vom Wunsch beeinflusst, die Fremd-Domänen möglichst dicht am Träger zu befestigen, um eine möglichst hohe Auflösung zu erzielen, andererseits darf dadurch die Fähigkeit des Fusionsproteins zur Partikelbildung nicht in Mitleidenschaft gezogen werden.

Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Herstellung von chimären Partikeln, ist aber die unabhängige Faltung aller beteiligten Proteinuntereinheiten. Wie in Abbildung 2-9 veranschaulicht, ist dies insbesondere bei einer zentralen Insertion in das c/e1 Epitop nicht trivial, da hier die Fremd-Domäne, durch die zweiseitige Fixierung mit dem Träger, die Coreprotein Sequenz unterbricht. Die N- und C-terminale "Halbdomäne" des Coreproteins wie auch das Fremdprotein müssen völlig unabhängig voneinander ihre nativen Sekundärstrukturen ausbilden, um dann zu einer kompletten dreidimensionalen Struktur zu gelangen. Der Vorteil einer C-terminalen Fusion liegt darin, dass die Primärsequenz des Coreproteins nicht unterbrochen wird; das entsprechende Fusionsprotein besteht aus zwei separaten Domänen, die sich unabhängig voneinander falten können. Andererseits bietet das Partikelinnere nur ein begrenztes Raumangebot, sodass die Größe der Fremdproteine limitiert ist.

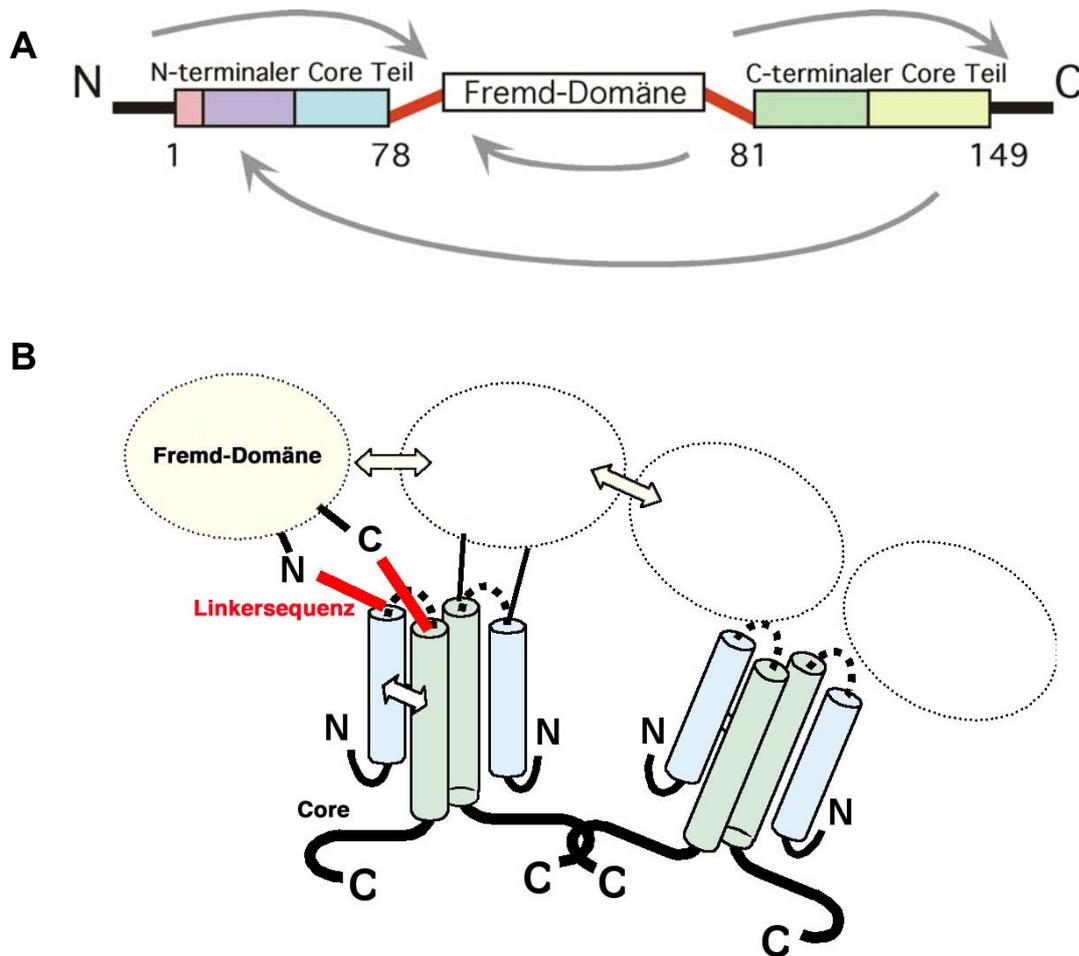


Abbildung 2-9: Strukturelle Kriterien bei Insertion einer Fremd-Domäne in das c/e1 Epitop des Coreproteins. (A) Zur Ausbildung der nativen Sekundärstruktur müssen sich der N-terminale und der C-terminale Core Anteil sowie die eingefügte Fremd-Domäne unabhängig voneinander falten (vergleiche auch Abbildung 2-4 zur Lage des Insertionsortes der Fremd-Domäne im c/e1 Epitop). Die Fremd-Domäne darf bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur keine sterische Behinderung darstellen. (B) Die Fremd-Domänen dürfen durch ihre Verbindung mit dem Träger und durch ihren Raumbedarf die Assemblierung der Partikel nicht behindern.

Nicht nur die unabhängige Faltung aller Teil-Domänen des Fusionsproteins ist ein kritischer Schritt. Die vollständig gefalteten Fremd-Domänen können aufgrund ihres Raumbedarfs auf der Partikeloberfläche oder im Partikelinnenraum die Dimerisierung der chimären Coreprotein Monomere und schließlich die Assoziation zum kompletten Partikel stören. Eine „Verdünnung“ der Fremd-Domänen durch teilweisen Ersatz mit unmodifizierten Wildtyp-Proteinuntereinheiten könnte das Raumangebot für die Fremd-Epitope erhöhen. Durch eine definierte *in vitro* Herstellung von Misch- oder Mosaikpartikeln ließe sich das Raumangebot für die zu präsentierenden Fremd-Domänen regulieren.

Ein weiterer Störfaktor kann das Assoziationsverhalten der Fremdproteine an sich darstellen. Ein ausgeprägtes Dimerisierungs- oder Multimerisierungsverhalten der Fremd-Domänen kann den Vorgang der Assemblierung so weit beeinflussen, dass es zu keiner Ausbildung von stabilen chimären Partikel kommen kann.

2.6.6.2. HBc-CLPs als Transportbehälter für heterologe Nukleinsäuren (Gentransfer)

Ein weiterer möglicher Einsatzbereich von CLPs liegt in der Verwendung als Transportbehälter für heterologe Nukleinsäuren im Sinne eines Gentransfers. Für gentherapeutische Anwendungen müssen die CLPs mehrere wichtige Voraussetzungen erfüllen. Zum einen muss die Fähigkeit gegeben sein, Nukleinsäure zu binden und diese vor Nukleasen geschützt zu verpacken. Zum anderen muss die Fracht von spezifischen Zielzellen aufgenommen, dort freigegeben und in diesen exprimiert werden.

Für eine spezifische *in vitro* Verpackung von Nukleinsäuren in HBc-CLPs wäre prinzipiell das Wildtyp Coreprotein aa 1 - 183 durch die im C-Terminus gelegene Nukleinsäurebindungsdomäne (siehe 2.6.2) am besten geeignet. Durch Quervernetzung der unverkürzten HBc183 Coreproteine über Disulfidbrücken der Cysteinreste Cys183, wie auch mögliche stabilisierende Interaktionen der basischen C-terminalen Region mit Nukleinsäure, lassen sich Wildtyp Partikel nur unter sehr drastischen Behandlungen wieder öffnen, z.B. durch Detergenzien wie SDS oder denaturierende Substanzen wie Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff in hoher Konzentration. Da dabei aber die native Faltung des Coreproteins zerstört wird, ist die Dissoziation nicht reversibel (Birnbaum und Nassal, 1990), (Wingfield *et al.*, 1995). Eine *in vitro* Reassoziaton, die eine Verpackung von Nukleinsäure ermöglichen würde, ist daher bislang mit dem Coreprotein HBc1-183 nicht möglich.

C-terminal verkürzte Core Varianten bilden deutlich weniger stabile Partikel d.h. durch eine Destabilisierung der Corestruktur ist eine vereinfachte *in vitro* Dissoziation z.B. durch Einsatz von niedrig konzentriertem Harnstoff und Reassoziaton möglich. Durch die fehlende Nukleinsäurebindungsdomäne ist hier aber nur eine unspezifische Aufnahme von heterologer Nukleinsäure in die Kapside möglich. Als minimales RNA-Verpackungssegment sollte mindestens die C-terminale Coresequenz R150RRDRGRS in den Varianten vorhanden sein, für eine spezifische Bindung von DNA hingegen ist das längere R150RRDRGRSPRR160RT Segment

notwendig (vergleiche die Coresequenz in Abbildung 2-8) (Hatton *et al.*, 1992). Durch die Verwendung von Core-Deletionsvarianten, die einen Teil oder die vollständige Nukleinsäurebindungsdomäne enthalten, und gleichzeitig ein praktikables *in vitro* Dissoziations- und Reassoziationsverhalten aufweisen, könnte die spezifische Verpackung von Nukleinsäure für gentherapeutische Anwendungen systematisch optimiert werden.

2.6.6.3. HBc-CLPs zur Impfstoff-Herstellung

Das Nukleokapsid von HBV, serologisch auch als HBcAg bezeichnet, ist ein sehr starkes Immunogen, das im Körper eine starke und sehr lang anhaltende humorale Immunantwort auslöst (Hoofnagle *et al.*, 1973). Das Haupt-B-Zell-Epitop „c“ liegt im Bereich der Aminosäuren aa 78 – 83, und somit auf der Spitze der Spikes, und überlappt das HBe Epitop 1 (e1) (Salfeld *et al.*, 1989), (Sällberg *et al.*, 1991). Zusätzlich existiert ein weiteres B-Zell-Epitop e2 am Ende der C-terminalen $\alpha 5$ Helix, welches den Bereich aa 127 - 133 umfasst und zumindest teilweise auf der Partikeloberfläche zugänglich ist (Pushko *et al.*, 1994). Partikuläres HBcAg kann sowohl eine T-Zell-unabhängige als auch T-Zell-abhängige Immunantwort hervorrufen, das lineare HBeAg hingegen, welches das gleiche T-Zell-Epitop aufweist wie das HBcAg, zeigt eine strikte T-Zell-abhängige Antwort (Milich und McLachlan, 1986), (Schödel *et al.*, 1996). Virus-ähnliche Partikel wie z.B. HBc-basierende CLPs können durch die Präsentation von vielfachen, identischen Antigen-Epitopen auch eine Adjuvans-unabhängige zytotoxische T-Zell-Antwort hervorrufen (Milich *et al.*, 1997). Abhängig vom Insertionsort in das HBcAg sollte sich die T-Zell-abhängige Immunantwort auch auf Fremd-Epitope übertragen lassen. Durch die einheitliche Anordnung in einem ikosahedralen Partikel ist zudem mit einer T-Zell-unabhängigen B-Zell Stimulierung, also einer Antikörperproduktion zu rechnen (Ulrich *et al.*, 1998).

Zumindest kurze N-terminale Insertionen werden an der Oberfläche der Corepartikel präsentiert und ermöglichen in manchen Fällen die Produktion von Antikörpern. Ein Beispiel stellt die N-terminale Fusion einer 23 aa Domäne des M2 Proteins des Influenza A Virus dar. Diese führte nach Immunisierung bei Mäusen zu einem 100%igen Schutz durch Antikörper gegen eine Infektion mit Influenza A (Neiryck *et al.*, 1999).

C-terminale Insertionen sind oft nur schwach immunogen, da die Fremd-Epitope wahrscheinlich nicht auf der Oberfläche der Partikel exponiert werden. Im Sinne einer antiviral wirkenden Therapie konnte die 17 kDa große (167 aa) *Staphylococcus aureus* Nuklease (SN) erfolgreich C-terminal an eine verkürzte Coreprotein Variante fusioniert werden. Im Zuge einer Koexpression und Koassemblierung mit unmodifizierten Coreproteinen konnte gezeigt werden, dass diese CLPs nur eine schwache anti-SN B-Zell Immunantwort auslösten, die Enzymaktivität der Nuklease aber innerhalb der Partikel nachweisbar war. Daraus konnte geschlossen werden, dass das C-terminal fusionierte Enzym in das Lumen der Mosaikpartikel verpackt vorlag (Beterams *et al.*, 2000), (Beterams und Nassal, 2001).

Das immundominante Epitop des Coreproteins (c/e1 Epitop) zeichnet sich als Insertionsort für Fremd-Epitope insbesondere durch die Exposition an der Partikeloberfläche aus. Eine Insertion in das c/e1 Epitop führt zum teilweisen Verlust der antigenen Eigenschaften des HBcAg, die Reaktivität mit den meisten HBc-spezifischen, monoklonalen Antikörpern wird aufgehoben. Die Antigenität der Fremd-Epitope hingegen ist durch eine zentrale Insertion begünstigt (Schödel *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu C-terminalen oder N-terminalen Fusionen führen die c/e1 Insertionen zur Bildung von hochtitrigen spezifischen Antikörpern gegen das Fremd-Epitop und einer niedrigen anti-HBc Antikörperbildung. Dies konnte auch für die Insertion von GFP gezeigt werden, da die chimären Partikel eine starke humorale Immunantwort gegen natives GFP auslösen konnten (Kratz *et al.*, 1999).

Besonders bei einer Anwendung der HBc-CLPs zur Impfstoff-Herstellung sollten nicht nur kurze Sequenzbereiche des Antigens dargestellt werden können, die Präsentation aller Epitope des großen Antigens wäre ein erstrebenswertes Ziel. Eine gezielte „Verdünnung“ des Anteils an Fremd-Epitopen in einem *in vitro* hergestellten Mosaikpartikel könnte auch hier den Raumbedarf der präsentierten Antigene erhöhen.

3. Zielsetzung

HBV Coreproteine assemblieren in *E. coli* zu rekombinanten Kapsid-ähnlichen Partikeln (CLPs) mit ikosahedraler Symmetrie. Durch Insertionen von Fremd-Epitopen in das Coreprotein lassen sich chimäre Partikel herstellen, die abhängig vom Insertionsort die virusfremden Domänen innerhalb der Kapside oder auf der Kapsidoberfläche präsentieren können.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Fähigkeit von Coreproteinen, zu CLPs mit hoher Symmetrie zu assemblieren, für eine Strukturanalyse der Fremd-Domänen nutzen ließe. Durch Fixierung von Fremd-Epitopen in den topologisch äquivalenten Positionen des Kapsids sollte sich die hochsymmetrische Anordnung auf die Insertionen übertragen lassen. Für die Strukturanalysen mussten möglichst homogene und hoch konzentrierte CLPs hergestellt werden, die dann durch PD. Dr. Bettina Böttcher am EMBL in Heidelberg analysiert werden sollten. Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen von vielen, möglichst identischen chimären Partikeln sollten dabei zusammengefasst und einer Bildrekonstruktion unterzogen werden. Ausgehend von der zentralen Insertion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als Modellprotein bekannter Struktur, sollten chimäre HBV Kapside auf ihre generelle Eignung als ikosahedral symmetrische Plattform untersucht werden. Ein vorhandenes Core-GFP Konstrukt mit einer langen und flexiblen Linkersequenz zur Befestigung der GFP-Einheiten am Träger hatte keine regelmäßige Anordnung der Fremd-Domänen aufgewiesen, wodurch die Strukturanalyse in einer geringen Auflösung resultiert hatte.

Durch gezielte Modifikationen und Verkürzung der Linkersequenz sollte eine möglich starre Fixierung der GFP-Domänen auf der Kapsidoberfläche erreicht werden, die aber andererseits nicht die Fähigkeit des Fusionsproteins zur Partikelbildung beeinträchtigen würde. Der primäre Teil der Arbeit befasste sich daher mit der Expression, Reinigung und Konzentrierung von neu konstruierten Core-GFP Varianten. Diese sollten nach biochemischer Charakterisierung ihrer Partikelbildungsfähigkeit auf ihre Eignung für hochauflösende Strukturuntersuchungen elektronenmikroskopisch überprüft werden. Würde sich das Optimierungsverfahren für GFP als Modellprotein als erfolgreich erweisen, könnten

weitere, eventuell strukturell unbekannte Proteine an das Coreprotein fusioniert werden und einer Strukturanalyse unterzogen werden.

Auch in der Anwendung der Corepartikel zur Impfstoff-Herstellung ist die Präsentation von großen Fremd-Domänen erstrebenswert. Da aber das Raumangebot sowohl innerhalb der HBV Kapside als auch auf der Partikeloberfläche eingeschränkt ist, sollten im zweiten Teil der Arbeit durch gezielte Herabsetzung des Anteils an Fusionsproteinen Mosaik-Partikel hergestellt werden, die durch den Gehalt an unmodifizierten Coreprotein-Untereinheiten ein erhöhtes Platzangebot für die Fremd-Domänen bieten. Dafür sollte eine Methode geschaffen werden, die nicht nur die *in vitro* Herstellung von Mosaikpartikeln mit definierter Zusammensetzung ermöglichen würde, sondern auch die Kombination von mehreren verschiedenen Fremd-Epitopen in räumlich variierbaren Anordnungen zuließe.

Ein *in vitro* Assemblierungssystem erfordert die Verwendung von reversibel dissoziierbaren Partikeln. Im Sinne möglicher gentherapeutischen Anwendungen könnte diese Eigenschaft in HBc-abgeleiteten Kapsid-ähnlichen Partikeln zur Verpackung von nicht-viralen Nukleinsäuren umgesetzt werden. Daher befasste sich der dritte Teil dieser Arbeit mit der spezifischen Verpackung von Nukleinsäure in HBV Corepartikel. Durch Konstruktion von chimären Partikeln, die im Partikelinnenraum spezifische Nukleinsäurebindungsdomänen besitzen, sollte untersucht werden, ob DNA oder RNA in diese Partikel verpackt, und später, vor Nukleasen geschützt, auch in eukaryote Zellen hinein transportiert werden könnte.

Im HBV Infektionszyklus kommt es im Zuge der Verpackung der prägenomischen RNA in die Kapside, der nachfolgenden DNA Reifung innerhalb der Kapside und des Transports von Kapsiden zur Kernpore zu reversiblen Phosphorylierungsereignissen des Coreproteins. Um im letzten Teil dieser Arbeit den Einfluss dieser Modifikation auch *in vitro* untersuchen zu können, sollte die kürzlich beschriebene Serin-Arginin-Protein-spezifische-Kinase 1 (SRPK 1) als aussichtsreicher Kandidat einer möglichen HBV Coreprotein-spezifischen Kinase verwendet werden. Nach Expression und Reinigung der Kinase sollte ein *in vitro* Phosphorylierungsverfahren für Coreproteinen bzw. Corepartikeln etabliert werden. Speziell die Phosphorylierung von assemblierten Corepartikeln sollte Aufschluss über die Zugänglichkeit der C-terminal und somit primär innen liegenden Phosphorylierungsstellen geben. Eine

erfolgreiche Phosphorylierung der Proteine sollte danach durch radioaktive und nicht-radioaktive Verfahren darstellbar gemacht werden. Letztlich sollte der Phosphorylierungsstatus von Coreproteinen verglichen werden, die entweder *in vitro* oder durch Koexpression mit der Kinase SRPK 1 in *E. coli* Zellen phosphoryliert wurden. Abschließend sollte der Einfluss der SRPK 1-spezifischen Phosphorylierungen auf die Bindung von heterologer Nukleinsäure an die Coreproteine und, in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Kann (Universität Giessen), auch auf den Kerntransport von rekombinanten Corepartikeln untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. *E. coli* Stämme

- TOP10 (Invitrogen):
 F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsd RMS-mcr BC*) ϕ 80 *lacZ* Δ M15 Δ *lacX7* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galk* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*
- GI698 (Invitrogen):
 F^- , λ^- *lacI^q* *lacPL8* *ampC::P_{trp}* *cl* *mcrA* *mcrB*, INV (*mnd-mnE*)
- BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen):
 F^- *ompT* *hdsS_B* (*r_B⁻* *m_B⁻*) *gal* *dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)
- BL21*cp: Bestehend aus BL21*(Invitrogen):
 F^- *ompT* *hdsS_B* (*r_B⁻* *m_B⁻*) *gal* *dcm* (DE3) und zusätzlich transformiert mit dem Codon plus (cp) Plasmid aus BL21cp (Stratagene), welches für seltene *E. coli* t-RNAs (*argU* *ileY* *leuW* Cam^R) codiert

4.1.2. Plasmide für Klonierungen

4.1.2.1. Plasmide für pPL-Konstrukte

- pPLC/ c1-149-c/e1-GFP:
Das Plasmid (Amp^R) kodiert unter Kontrolle des λ -PL-Promotors für das verkürzte Coreprotein HBc1-149. Die Aminosäuren aa P79 und aa A80 des c/e1 Epitops sind deletiert und durch das grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt. Auf beiden Seiten von GFP befindet sich ein G₄-S-G₄ Linker (Kratz *et al.*, 1999).
- pPLC/c1-149 c/e1-RFP:
Das Plasmid (Amp^R) kodiert unter Kontrolle des λ -PL-Promotors für das verkürzte Coreprotein HBc1-149. Die Aminosäuren aa P79 und aa A80 des c/e1 Epitops sind deletiert und durch das rot fluoreszierende Protein (RFP) ersetzt. Auf beiden Seiten von GFP befindet sich ein G₄-S-G₄ Linker.

4.1.2.2. Plasmide für pET-Konstrukte

- pET28-HBc1-149-c/e1-(G₄-S-G₄-Linker)-GFP:
Das Plasmid (Kan^R) kodiert unter Kontrolle des T7-Promotors für das verkürzte Coreprotein HBc1-149. Die Aminosäuren aa P79 und aa A80 des c/e1 Epitops sind deletiert und durch das grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt. Auf beiden Seiten von GFP befindet sich ein G₄-S-G₄ Linker
- pET28amp2-HBc1-149-c/e1-(G₄-S-G₄-Linker)-GFP-H₆.
Das Plasmid (Amp^R) kodiert unter Kontrolle des T7-Promotors für das verkürzte Coreprotein HBc1-149 mit C-terminaler Fusion des His₆-Peptids. Die Aminosäuren aa P79 und aa A80 des c/e1 Epitops sind deletiert und durch das grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt. Auf beiden Seiten von GFP befindet sich ein G₄-S-G₄ Linker.

4.1.3. Oligonukleotidprimer für Klonierungen

- BG # 5731 pL(+):
GGCAATGCAAGGTCTCCT
- BG # 5732 pL(-):
GCGCCCAATACGCAAACCGCC
- 11-17533 C-Gly 77/78 (-) :
5'- CTA CCA GGT CTC TAG AAG CAG GGC CCC CAC CTC CGG A- 3'
Zusammen mit Primer BG #5731 pL(+) zur Insertion von GFP in das c/e1 Epitop ohne Deletion, d.h. Coreprotein Originalsequenz L76 - A80 vorhanden.
- 11-17532 N-Gly 77/78 (+) :
5'- GGG TGT TAA CCT CGG TGG AGG TGG CTC CGG -3'
Zusammen mit Primer BG #5732 pL(-) zur Insertion von GFP in das c/e1 Epitop unter der Deletion von E77 - A80.
- 11-25746 C-CGly5 (-) :
5'- CCC CTC TAG AGC CAC CTC CAC CCT TGT ACA GCT C -3'
Zur Herstellung von verkürzten Linkern mit 4 Glycinresten; Insertion von GFP in das c/e1 Epitop.
- 11-25745 C-NGly5 (+) :
5'- GTT AAC CTC GAG GAT GGA GGG GGT GGT ACC ATG A -3'
Zur Herstellung von verkürzten Linkern mit 4 Glycinresten; Insertion von GFP in das c/e1 Epitop

- 11-30915 C-CGly-1 (-) :
5'- CCC CTC TAG AAC CCT TGT ACA GCT CGT CC -3'
Zur Herstellung von verkürzten Linkern mit 1 Glycinrest; Insertion von GFP in das c/e1 Epitop
- 11- 30914 C-NGly-1 (+) :
5'- GGT TAA CCT CGA GGA TGG AAC CAT GAG CAA GGG C- 3'
Zur Herstellung von verkürzten Linkern mit 1 Glycinrest; Insertion von GFP in das c/e1 Epitop

4.1.4. Antikörper

4.1.4.1. Polyklonale Antikörper

Gegen Kaninchen bzw. Maus gerichtete Ziegen-Antikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (PO) oder Alkalischer-Phosphatase (AP), (Dianova).

- Ziege- anti-Maus- PO
- Ziege- anti-Kaninchen- PO
- Ziege- anti-Maus- AP

4.1.4.2. Monoklonale Antikörper

- anti-GFP: Mischung aus zwei monoklonalen Maus-Antikörpern (Klon 7.1 und 13.1) zur Detektion von GFP Protein und GFP-Fusionsproteinen
- mc275: gegen diskontinuierliches Epitop auf nativem HBc Kapsid gerichteter monoklonaler Maus-Antikörper (Pushko *et al.*, 1994)
- mc158: gegen lineares HBe Epitop AS 129 - 132 gerichteter monoklonaler Maus-Antikörper (Sällberg *et al.*, 1991) (Salfeld *et al.*, 1989)
- mc312: gegen lineares HBc Epitop AS 76 - 84 gerichteter monoklonaler Maus-Antikörper (Sällberg *et al.*, 1991)
- anti-tetra-His: gegen HHHH-Sequenz gerichteter monoklonaler Antikörper (Qiagen)
- anti-Xpress: gegen Xpress- Epitop gerichteter monoklonaler Antikörper (Invitrogen)

4.1.5. Chemikalien und Enzyme

4.1.5.1. Chemikalien

Häufig verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterial, die bevorzugt von einem Hersteller bezogen wurden, sind gesondert aufgeführt:

- Acrylamid/ Bisacrylamid Fertiglösung 30 % (29:1); Applichem
- Agarose mit niedriger Schmelztemperatur (Low Melting Agarose: SeaPlaque Agarose); FMC BioProducts
- Bakterienmedien:
 - Bacto Agar; Difco Laboratories
 - Induktionsmedium: Induction Base Medium; Invitrogen
 - LB-Medium: Luria Bertani Base; Invitrogen
 - RM-Medium: RM Base Medium; Invitrogen
 - RMG-Agar, Invitrogen
- Bradford Reagenz: Protein Assay Dye Reagent Concentrate # 500-0006; Bio-Rad
- DNA Quick Spin bzw. RNA Quick Spin Columns; Roche
- GlycoBlue; Ambion
- Größenmarker:
 - High Marker RPN 756 bzw. Low Marker RPN 755; Amersham Biosciences
 - Marker VII; Roche
 - Marker XIV; Roche
 - peqGold 1Kb DNA Leiter (250 - 10000 bp); Peqlab
 - peqGold High Range RNA Leiter (100 - 1000 bp); Peqlab
- Kits:
 - Gel Extraction Kit; Invitrogen
 - QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit ; Qiagen
 - QIA Plasmid Maxi Kit; Qiagen
 - QIAquick Nucleotide Removal Kit; Qiagen
 - QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen

- NBT (Nitrobluetetrazolium)/ BCIP (5- Bromo- 4- Chloro-3- Indolyl Phosphat) Reagenz; Roche
- PVDF Membran (Immobilon P); Millipore
- 1x Protease Inhibitor Complete Mix w/o EDTA; Roche
- Röntgenfilme; Kodak
- Ultrapure dNTP- Set; Peqlab
- Slide-A-Lyzer und Slide-A-Lyzer™-Mini; Pierce
- Ultrafiltrationseinheiten(Amicon Ultra; Centricon; Microcon); Millipore
- Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifugationen: 1,4 ml Polycarbonat Röhrchen und 2,2 ml bzw. 13 ml Polyallomer Röhrchen; Beckmann
- γ -³²P-ATP (spez. Aktivität 3000 Ci/mMol); Amersham Biosciences

Die üblichen Feinchemikalien, Alkohole, Laugen und Säuren in p.A. Qualität wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Fluka, Sigma, Applichem, Merck, Serva; Riedel-de-Haën über die Reagenzienzentrale des Uniklinikums Freiburg bezogen.

4.1.5.2. Enzyme

Häufig verwendete Enzyme, die bevorzugt von einem Hersteller bezogen wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt:

Tabelle 1: Häufig verwendete Enzyme, mit spezifischen Bezeichnung und Bezugsquellen.

Art der Enzyme	Spezifische Bezeichnung	Bezugsquelle
Standard Restriktionsenzyme		New England Biolabs (NEB); Promega; Roche
Modifizierende Enzyme:		
DNA Polymerasen	Pwo DNA Polymerase	Peqlab
Kinasen	T4 Polynukleotid Kinase	NEB
Ligasen	T4-DNA Ligase	NEB
Lysozym	--	Roche
Nukleasen	Benzonase	Novagen
	DNase I	Roche
	RNase A	Roche
	Micrococcus Nuklease S7	Roche

Phosphatasen	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	NEB
	Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche
	<i>E. coli</i> Alkalische Phosphatase	Sigma
Proteinasen	Proteinase K	Sigma

4.1.5.3. Geräte

Alle üblichen und speziellen Laborgeräte, die während dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte mit Hersteller- bzw. Bezugsquellen.

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Memmert
DNA Gelelektrophorese	Peqlab
Entwicklermaschinen: Hyperprozessor RPN 1700 CP100	Amersham Pharmacia Biotech AGFA
ELISA Reader Modell 450	Bio-Rad
Elektroporationsgerät: Gene Pulser II und Pulse Controller II	Bio-Rad
Feinwaage	Mettler AE240
French Press: SLM Aminco	G. Heinemann
Geltrockner	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen	Heraeus
Kühlzentrifugen	Sorvall RC-5B (Du Pont);
Kühl-Tischzentrifuge Biofuge	Heraeus
PCR-Geräte: UNO Thermo	Biometra
pH-Meter 701 Calimatic	Kluck
Phospho-Imager Fujifilm BAS 1500	Heraeus Instruments
Photometer Ultraspec 3000	Pharmacia
Refraktometer RL-2	Schmidt & Haensch
Schüttelinkubatoren: Innova 4000 bzw. 4230	New Brunswick Scientific
SDS-PAGE Gelelektrophorese	Bio-Rad
Stratalinker UV Crosslinker 1800	Stratagene
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Szintillationsgerät Tricarb 2000 CA	Canberra Packard

Tischzentrifuge: Microfuge MC-13	Amicon
Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad
Ultraschallgerät: Sonifier B-12 Cell Disrupter	Branson; Fa. Heinemann
Ultrazentrifugen: Sorval Ultra 80 Centricon T-1033 Optima LE 80k Ultrazentrifuge	Du Pont Kontron Instruments Beckmann
Ultra-Tischzentrifuge: Optima TLX-Ultrazentrifuge	Beckmann
UV Gel Dokumentation UVT-28MP; Easy RH, Video Graphic Prime UP-890LE	Herolab
Waage PT 1200	Sartorius

4.2. Allgemeine Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Stammhaltung und Kultivierung

Zur Kultivierung von GI698 Zellen wurde ein spezielles Minimal-Medium, RM-Medium bzw. RMG-Agar von Invitrogen verwendet. 1 Liter RM-Medium enthält 2 % Casaminosäuren, 0,2 % Glucose, 1 mM MgCl₂, 1 x M9 Salze, wobei 1 Liter 10 x M9 Salze aus 60 g Na₂HPO₄, 30 g NaCl und 10 g NH₄Cl; pH 7,4 bestehen. Zur Fertigstellung von RM-Medium musste Glycerin nach Angaben des Herstellers zugegeben werden. Für die Expression von Proteinen wurde ein spezielles Tryptophan-armes Induktionsmedium (Invitrogen), dem Glucose nach Angaben des Hersteller zugesetzt wurde, verwendet. LB-Medium wurde sowohl zur Kultivierung von TOP10 oder BL21 Zellen als auch für Expressionskulturen als Induktionsmedium verwendet.

Bei Bedarf wurden die Kultivierungsmedien bzw. Induktionsmedien, sowie die Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum (siehe Tabelle 3) als Selektionsmarker versetzt. Diese werden hier zur Vereinfachung im weiteren Verlauf mit LB-selektiv Medium, RM-selektiv Medium, Induktions-selektiv Medium bezeichnet.

Tabelle 3: Zur Selektion verwendete Antibiotika mit Angaben über die Stammlösung und die benötigten Arbeitskonzentrationen.

	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	50 µg/ml
Carbenicillin	50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	25 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100 % Ethanol	34 µg/ml

Für eine kürzere Aufbewahrungszeit wurden Verdünnungsausstriche von GI698 Zellen auf RMG-Agarplatten bzw. von TOP10 oder BL21 Zellen auf LB-Agarplatten angefertigt. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert und anschließend mit Parafilm verschlossen bei 4°C gelagert. Zur Langzeitaufbewahrung der verschiedenen *E. coli* Stämme wurden 700 µl einer frischen Übernachtskultur (LB- bzw. RM-Medium) mit 300 µl 100 %-igem Glycerin vermischt und bei -80°C aufbewahrt (Glycerolkultur). Aus den Glycerolkulturen konnten bei Bedarf direkt Vorkulturen angeimpft werden.

Falls nicht anders erwähnt, wurden für Übernachtskulturen oder DNA Mini Präparationen (Minipreps) (siehe 4.2.3) 3 - 5 ml LB-selektiv Medium bzw. RM-selektiv Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 10 - 15 Stunden im Schüttler bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Für DNA Präparationen im großen Massstab (Maxipreps; siehe 4.2.3) wurden diese Vorkulturen 1:100 mit LB-selektiv Medium bzw. RM-selektiv Medium verdünnt und im Weithals-Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C bzw. 37°C im Schüttler ÜN inkubiert.

Für Expressionskulturen wurden größere Übernachtskulturen mit 20 - 25 ml angezogen, die Zellen wurden kurz durch Zentrifugation, für 5 min mit 4500 rpm bei RT pelletiert, in frischem LB-/ RM-Medium resuspendiert und damit 300 ml LB-selektiv Medium bzw. Induktions-selektiv Medium auf eine Ausgangs-OD₆₀₀ = 0,1 angeimpft. Die Kultur wurde bei 30°C bzw. 37°C schüttelnd inkubiert bis die gewünschte Induktions-OD₆₀₀ = 0,6 erreicht wurde. Der Wachstumsverlauf wurde durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm bzw. 600 nm gegen LB-Medium im Ultraspec 3000 Spektrophotometer gemessen. Nach Zugabe des jeweiligen Induktors IPTG [1 mM] bzw. Tryptophan [0,1 mg/ml] wurde die Kultur über Nacht bei RT weiter inkubiert.

Die Kultivierungs- bzw. Induktionsbedingungen der unterschiedlichen Bakterienstämme sind in Tabelle 4 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4: Vergleichende Darstellung der unterschiedlichen Kultivierungs- und Induktionsbedingungen für TOP10/ BL21 bzw. GI698 Zellen.

	TOP10/ BL21 Zellen	GI698 Zellen
Kultivierungstemperatur	37°C	30°C
Kultivierungsmedium	LB-Medium: (Luria Bertani Base)	RM-Medium: RM Base Medium + Glyzerin,
Festmedien	Zusatz von 1,5 % (w/v) Bacto Agar zum LB-Medium	RMG-Agar
Induktionsmedium	LB-Medium	Induktions Medium + 0,5 % Glucose
Induktor	1 mM Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	0.1 mg/ml Tryptophan

4.2.2. Klonierungen

Die in diese Arbeit verwendeten Plasmide wurden nach molekularbiologischen Standardprotokollen angefertigt (Mullis und Faloona, 1987), (Sambrook *et al.*, 1989), (Ausubel und Frederick, 1996). Für Klonierungen benötigte DNA-Fragmente wurden mithilfe von synthetischen Oligonukleotiden, einer bekannten DNA-Matrize und einer DNA-Polymerase, wobei meistens Pwo DNA Polymerase verwendet wurde, im Thermocycler mit dem Labor Standardprogramm (Punkt 1 = .1) amplifiziert. Der Reaktionsansatz wurde in folgender Reihenfolge zusammen pipettiert, wodurch sich die angegebenen Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten ergab:

<u>Additiv</u>	<u>Endkonzentration</u>
dNTP-Mischung[2,5 µM/dNTP]	10 µM
10 x Pwo-Puffer	1x
Primer 1 [100 pmol/µl]	100 pmol
Primer 2 [100 pmol/µl]	100 pmol
DNA-Matrize	100 ng
H ₂ O	ad 100 µl
Pwo-Polymerase [1 U/µl]	0,75 U

Die Reaktionsbedingungen des Labor-Standardprogramm (.1) waren:

5 min	92°C		25 Zyklen
30 sec	92°C		
45 sec	48°C		
2 min	72°C		
1 min	72°C		
∞	4°		

Die speziell für Klonierungen benötigten Puffer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Puffer für Klonierungen.

TES-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 10 mM NaCl
50x TAE pH 8,0	2 M Tris-Azetat; 50 mM EDTA (242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0)

Die erzeugten DNA-Fragmente wurden auf einem analytischen Agarosegel überprüft. Das gewünschte DNA-Fragment wurde entweder aus einem "low melting" TAE-Agarosegel präpariert, indem das DNA enthaltene Gelstück in TES-Puffer geschmolzen wurde und das DNA-Fragment über eine Phenolextraktion mit nachfolgender Natriumazetat/ Ethanolpräzipitation isoliert wurde (Parker und Seed, 1980), (Wieslander, 1979). Größere DNA-Fragmente (≥ 1 kb) wurden aus einem präparativen TAE-Agarosegel mittels "Gel Extraction Kit" nach Angaben des Herstellers eluiert. Sowohl die gereinigten DNA-Fragmente als auch die benötigten Vektorplasmide wurden zur Herstellung von kompatiblen Enden mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Der Restriktionsverdau wurde im allgemeinen für 1 - 2 Stunden bei enzymespezifischer Temperatur durchgeführt, wobei nach 1 Stunde 1/10 Volumen des Ansatzes zur Kontrolle der Vollständigkeit des Verdaus auf ein analytisches TAE-Agarosegel aufgetragen wurde. Um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation der Vektor-DNA zu verringern, wurden bei Bedarf die DNA-Enden zusätzlich mit "Shrimp Alkaline Phosphatase" (SAP) dephosphoryliert. Die anschließende Ligation von DNA-Fragment und Vektor-DNA wurde mit der 2 - 3-fachen molaren Menge an Insert im Verhältnis zum Vektor angesetzt. Die Ligation wurde bei Raumtemperatur für 1 h oder ÜN bei 16°C durchgeführt.

Die Ligationsansätze wurden direkt zur Transformation in *E. coli* Zellen eingesetzt. Bei TOP10 bzw. BL21 Zellen wurde die "schnelle" Transformation ohne Hitzeschock

angewendet (Pope und Kent, 1996). Dabei werden die chemisch (CaCl_2) kompetenten Zellen 5 - 10 min auf Eis mit der zu transformierenden DNA inkubiert, nach Zugabe von 500 μl LB-Medium 1 h bei 37°C geschüttelt und auf einer angewärmten LB-selektiv Agarplatte ausplattiert. Diese wurde bis zum Erscheinen von Kolonien bei 37°C weiter inkubiert.

Zur Transformation von elektrokompenten GI689 Zellen wurden 1 - 2 μl des Ligationsansatzes in einem Eppendorfröhrchen vorlegt und auf Eis gestellt. Zur DNA wurden ca. 35 μl kompetente Zellen pipettiert, durch Anschneiden gemischt und in eine auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette; 0,2 cm Elektrodenabstand) überführt, wobei das Gemisch vorsichtig auf den Boden der Küvette geschüttelt wurde. Die Suspension wurde für ca. 5 min auf Eis inkubiert. Die Standardeinstellungen des Elektroporationsgeräts (Gene Pulser II) waren 25 μF und 2,5 kV; die des Pulse Controllers II betragen 200 Ω . Die Digitalanzeige wurde auf "Time const(ant)" umgeschaltet und die Transformation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Transformationsansatz wurden direkt in die Elektroporationsküvette 500 μl RM-Medium pipettiert, gemischt, in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt und 30 - 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf einer RM-selektiv Agarplatte ausplattiert.

4.2.3. Plasmidisolierung und Konzentrationsbestimmung

Alle Plasmidpräparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und der nachfolgenden Adsorption der Plasmid DNA an ein immobilisiertes Silikonharz unter Hochsalz Bedingungen (Miniprep Plasmid DNA) bzw. einer Anionenaustauscher Säule unter Niedrigsalz Bedingungen (Maxiprep Plasmid DNA) durchgeführt. Dabei wurden für Minipreps der QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit bzw. für Maxipreps QIA Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Konzentration der gereinigten Maxiprep DNA wurde über die Adsorption bei 260 nm im Ultraspec 3000 Spektrophotometer in einer Quarzküvette ermittelt.

Dabei entspricht die $\text{OD}_{260\text{nm}} = 1$ ca. 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA.

4.2.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der „Enzymatischen DNA Sequenzierung“ unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977). Es wurde mit der „Cycle-Sequencing“ Reaktion gearbeitet, die

zu einer Signalverstärkung, durch mehrfache Verwendung desselben Matrizenstrangs der zu analysierenden DNA führt. Die verwendete BigDye Reaktionsmischung enthält alle dafür notwendigen dNTPs, die mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert vorliegen, eine Polymerase und ein spezifisches Puffersystem. Die Primer wurden auf eine Arbeitskonzentration von 1 pmol/μl mit H₂O eingestellt.

20 μl Reaktionsansatz enthielten:

- 4 μl BigDye Mix
- 3,2 μl Primer
- 14 μl DNA (z.B. Miniprep-Plasmid-DNA)

Die Proben wurden mit Mineralöl überschichtet und im Biometra Thermocycler (Programm Punkt 3 = .3) amplifiziert. Die Reaktionsprodukte wurden ohne Mineralöl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 80 μl 75 % Isopropanol für 15 min bei RT gefällt. Die DNA wurde für 20 min mit 14000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und anschließend mit 250 μl 75 % Isopropanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min mit 14000 rpm bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Glaspasteurpipette abgenommen und das Pellet für 1 min bei 90°C im Thermoblock getrocknet.

Die getrocknete DNA wurde auf Eis abgekühlt und lichtgeschützt zur weiteren Analyse in die „Core Facility“ der Uniklinik Freiburg gebracht.

4.3. Allgemeine Protein-Biochemischen Methoden

4.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Hierzu wurden 10 - 15 %-ige Trenngele gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol mit H₂O abgewaschen, das Trenngel mit einem 4 %-igem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingeführt.

Die speziell für SDS-PAGE benötigten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für SDS-PAGE.

Acrylamid Stammlösung 30 % (29:1)	29 Teile Acrylamid; 1 Teil Bisacrylamid
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl pH 6,8
5x Laufpuffer SDS-PAGE	125 mM Tris; 960 mM Glycin; 2,5 % SDS
4x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,02 % Bromphenolblau 4 % SDS; 10 % Glycerin; 10 % β -Mercaptoethanol

Die Gele wurden meist auf Vorrat angefertigt, in mit 1x SDS-Laufpuffer befeuchtete Tücher eingewickelt und mit Folie luftdicht verschlossen bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. In Tabelle 7 sind die Mengen der einzelnen Komponenten zur Herstellung eines Trenn- bzw. Sammelgels mit bestimmter Polyacrylamid Konzentration angegeben.

Tabelle 7: Mengenangaben zur Herstellung von 10 - 15 %-igen Trenn- und 4 %-igen Sammelgelen für SDS-PAGE.

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	4 %
Polyacrylamid Konzentration	10 %	12,5 %	15 %	4 %
30 % Acrylamid 29:1 (ml)	1,675	2,075	2,5	0,375
Trenngelpuffer (ml)	1,25	1,25	1,25	--
Sammelgelpuffer (ml)	--	--	--	0,312
10 % SDS (μ l)	25	50	50	50
Ammoniumpersulfat (gesättigt) (μ l)	10	10	10	2
TEMED (μ l)	5	5	5	2,5
H ₂ O (ml)	2,025	1,625	1,2	1,775

Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert, eventuell entstandenes Kondenswasser wurde abzentrifugiert und die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 180 V im Trenngel und 230 V im Sammelgel, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte oder sich die Proben weit genug aufgetrennt hatten. Als Proteinmarker wurde entweder ein hoch- (High Marker RPN 756) bzw. niedermolekulares Standardproteingemisch (Low Marker RPN 755), deren

Proteinzusammensetzungen in Tabelle 8 aufgeführt sind, verwendet. Es wurden jeweils 3 µl des Markers auf das Gel aufgetragen.

Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Gele im Geltrockner (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers getrocknet.

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Proteinmarker RPN 755 und RPN 756.

Proteine Low Marker RPN 755	Molekulare Masse in kDa	Proteine High Marker RPN 756
--	220	Myosin
--	97	Phosphorylase B
--	66	BSA
Ovalbumin	45	Ovalbumin
Carboanhydrase	30	Carboanhydrase
Trypsininhibitor	20,1	Trypsininhibitor
Lysozym	14,3	Lysozym
Aprotinin	6,5	--
Insulin (b) Kette	3,5	--
Insulin (a) Kette	2,5	--

4.3.2. Tris-Tricin Gelsystem

Um eine höhere Auftrennung z.B. bei sehr kleinen Proteinen zu erzielen oder um sehr geringe Molekulargewichtsunterschiede bei phosphorylierten zu nicht-phosphorylierten Coreproteinen in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen zu erzielen, wurde das Tris-Tricin Gelsystem nach Schägger und von Jagow verwendet (Schägger und von Jagow, 1987). Dieses erlaubte eine sehr gute Auftrennung von ca. 1 kDa bis ca. 100 kDa.

Die Zusammensetzung der speziell für Tris-Tricin Gelsystem benötigten Puffer ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer für Tris-Tricin Gele.

Gelpuffer	3 M Tris, 0,3 % SDS pH 8,45
10x Anodenpuffer	2 M Tris-HCl pH 8,9
10x Kathodenpuffer	1 M Tris, 1 M Tricin; 1 % SDS, pH 8,25
Tricin-Ladepuffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % SDS; 24 % Glycerin 4 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau

Die Mengen der einzelnen Komponenten zur Herstellung eines in der Regel 15 %-igen Trenngels bzw. 4 %-igen Sammelgels für das Tris-Tricin Gelsystem sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Mengenangaben zur Herstellung eines 15 %-igen Trenngels und 4 %-igen Sammelgels für das Tris-Tricin Gelsystem.

	Trenngel	Sammelgel
Polyacrylamid Konzentration	15 %	4 %
30 % Acrylamid 29:1 (ml)	3,00	0,27
Gelpuffer (ml)	2,0	0,5
75 % Glycerin (ml)	0,85	--
H ₂ O (ml)	0,15	1,23
TEMED (µl)	5,0	2,0
Ammoniumpersulfat(gesättigt) (µl)	10,0	2,5

Der Gellauf erfolgte im Kühlraum mit auf 4°C vorgekühltem Anoden- und Kathodenpuffern, wobei letzterer, für einen besseren Wärmeaustausch mit dem Gel, bis an den oberen Rand der Gelkammer aufgefüllt wurde. Die Geltaschen wurden vor dem Probenauftrag mehrmals mit Puffer gespült. Der Gellauf wurde mit 40 mA pro Gel bis zum Erreichen der unteren Gelkante durchgeführt.

4.3.3. SDS-Agarosegele

Zur Auftrennung von Nukleinsäureproben, die noch einen geringen Anteil an Protein aufweisen konnten, wurden vertikale 20 cm x 20 cm SDS-Agarosegele verwendet. Zwischen die zwei Glasplatten wurden nach gründlicher Reinigung mit 70 % Ethanol die Plastikabstandhalter (Spacer) eingelegt, und beide Platten durch Gewebepapier miteinander verklebt. Zusätzlich wurden beide Platten mithilfe von Klammern fest gegeneinander gepresst. Die Agarose wurde in Wasser aufgeköcht, eventuelle entstandene Flüssigkeitsverluste wurden wieder ersetzt und nach Abkühlen der Lösung auf ca. 65°C wurden 20x SDS-Agarosegel-Puffer und 10 % SDS-Stammlösung zugegeben.

Die Zusammensetzung der speziell für SDS-Agarosegele benötigten Puffer ist in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer für SDS-Agarosegele.

20x SDS-Agarosegel-Puffer	800 mM Tris; 100 mM Na-Azetat; 20 mM EDTA, pH 7,5 (Eisessig)
1x SDS-Agarosegel-Puffer	40 mM Tris; 5 mM Na-Azetat; 1 mM EDTA; pH 7,5, 0,1 % SDS
SDS-Agarosegel Probenpuffer	6x DNA-Probenpuffer + 1 % SDS

Zur Herstellung von 100 ml 1,2 % SDS-Agaroselösung wurden pipettiert:

1,2 g Agarose

94 ml H₂O

5 ml 20x SDS-Agarosegel-Puffer [1x]

1 ml 10 % SDS Stammlösung [0,1 %]

Die noch warme Lösung wurde dann schnellstmöglich und luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Platten gegossen, die zuvor für ca. 1 min bei voller Leistung in der Mikrowelle erwärmt worden waren. Beim Eingießen wurden die Platten schräg gehalten, der Kamm wurde erst beim Erreichen der oberen Glaskante in die Agarose hinein gedrückt. Die Platten wurden zur Aushärtung auf ca. 3 cm Höhe schräg abgelegt. Da sich die Agarose beim Abkühlen stark zusammenzog, wurde bis zur vollständigen Aushärtung noch weitere Lösung nachgefüllt. Zur Entfernung des Kamms wurde die Verklebung gelöst und die Platten flach auf den Tisch gelegt. Durch vorsichtiges Schieben der oberen Glasplatte nach unten wurde der Kamm zugänglich, und konnte mithilfe eines scharfen Skalpells von anhaftenden Gelresten befreit werden. Danach wurde die obere Glasplatte wieder in die Ursprungsposition geschoben und die beiden Platten durch Klammern fixiert.

Vorsicht: Da das Gel SDS enthält, kann es sehr leicht zwischen den Glasplatten herausrutschen. Dies vermeidet man, wenn man im Puffertank einen Kamm unter die Glasplatten unterlegt und das Gel durch schmale Gewebestreifen fixiert.

Die Platten wurden in die Gel-Apparatur eingespannt und die Pufferkammern mit 1x SDS-Agarosegel-Puffer gefüllt. Der Gellauf erfolgte bei max. 14 Watt für 1,5 h. Nach dem Lauf wurde die obere Glasplatte vorsichtig abgehoben und auf das frei liegende Gel wurde ein alter Kodak Röntgenfilm aufgelegt. Durch Umdrehen der Platte konnte

das Gel auf dem Röntgenfilm festgeklebt werden und wurde so unter einem Föhn vollständig getrocknet.

4.3.4. Detektion von aufgetrennten Proteinen

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden entweder direkt im Gel durch Anfärbung mit Coomassie® Blau R-250 detektiert oder auf eine Trägermembran transferiert, um eine immunologische Detektion durchzuführen. Signale radioaktiv markierter Proteine wurden entweder direkt nach Trocknen der Gele im Phospho-Imager System Fujifilm BAS 1500 detektiert oder nach Transfer auf eine Membran immunologisch nachgewiesen.

4.3.4.1. Coomassie Blau Färbung

Die Anfärbung der Proteine nach Auftrennung im SDS-PAGE oder im nativen Agarosegel erfolgte in frischer Färbelösung unter leichtem Schwenken durch Inkubation für mindesten 30 min oder bis die Gele stark dunkelblau gefärbt waren. Die nachfolgende Entfärbung bis zum Erscheinen von klaren Proteinbanden wurde durch Zugabe eines saugfähigen Papiertuches zur Entfärberlösung beschleunigt. Die Entfärbung wurde durch Transfer der Gele in Wasser gestoppt, wobei die Gele bis zum Trocknen im Gelrockner in Wasser gelagert wurden. Die Nachweisgrenze der Coomassie Blau Färbung liegt bei ca. 100 ng/Bande.

Die Zusammensetzung der Lösungen, die für die Coomassie Blau Färbung benötigt werden, ist in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Lösungen für Coomassie Blau Färbungen.

Färbelösung	0,06 % Coomassie Brilliant Blau R250; 50 % Methanol; 10 % Essigsäure; H ₂ O
Entfärber	5 % Methanol; 7,5 % Essigsäure; H ₂ O

4.3.4.2. Western Blot Analyse

Im SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden in der "Semi-Dry-Blot" Apparatur auf Polyvinylidene Fluoride Membranen (PVDF) transferiert. Dafür wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel für 5 min in Semi-dry Blotting-Puffer äquilibriert. Die untere Elektrode der Blotting Apparatur wurde mit Puffer befeuchtet und drei Schichten in Puffer getränkte Whatmanpapiere mit einem sauberen

Wassermannröhrchen luftblasenfrei aufgerollt. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und in Puffer gespült, auf die Whatmanpapiere gelegt und mit dem äquilibrierten Gel bedeckt. Nach auflegen von drei weiteren Schichten Whatmanpapier wurde die obere Elektrode befeuchtet und 15 min bei 15 Volt oder 30 - 60 min bei mehreren Gelen bzw. einem großen Gel transferiert. Nach dem Transfer wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C auf der Wippe in 5 % Blocking-Lösung abgesättigt (geblockt). Der Lösung wurde dann der primäre Antikörper in der gewünschten Verdünnung (meist 1:10000) zugegeben und für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Der Blot wurde danach 3x mit 1x TTBS für je 5 min bei RT gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper (1:10000 in 1x TTBS) für 30 - 45 min bei RT inkubiert wurde. Abschließend wurde die Membran 3x mit 1x TTBS gewaschen.

Die Detektion war abhängig von der Herkunft des sekundären Antikörpers. War dieser mit Alkaline Phosphatase (AP) gekoppelt, wurde die Membran weitere 5 min bei RT in Alkaline Phosphatase-Puffer (AP-Puffer) inkubiert. Durch Zugabe der Substrate Nitrobluetetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat (BCIP), die fertig gemischt als NBT/ BCIP Reagenz vorlagen, konnte die AP-Enzymaktivität über die Ausbildung eines blau-violetten Präzipitats auf der Membran nachgewiesen werden. Die Reaktion wurde durch Überführen in Wasser gestoppt und die gefärbte Membran wurde zur weiteren Dokumentation eingescannt.

Meerrettich-Peroxidase (PO)-gekoppelte Sekundärantikörper wurden mit dem "ECL Plus Western blotting detection reagent" nach Herstellerangaben detektiert. Hierbei kommt es zur enzymatischen Oxidation des Luminogens PS-3, welches in Gegenwart von Wasserstoffperoxid im alkalischen Milieu mit einer Lichtemission reagiert, die durch Exposition eines BIOMAX MR Films nachgewiesen werden kann.

Die an die Proteine gebundenen Primärantikörper konnten durch "stripping" wieder entfernt werden, wodurch verschiedener Antikörper nacheinander für eine immunologische Detektion verwendet werden konnten. Die Membran wurde dafür für 30 min bei 50°C in Stripping-Puffer unter mehrmaligem Schütteln inkubiert, 3x mit 1x TTBS für 5 min gewaschen und erneut für 1 h bei RT mit Blocking-Puffer abgesättigt. Anschließend wurde wieder mit der Zugabe des neuen Primärantikörpers begonnen.

Die Zusammensetzung der speziell für die Western Blot Analyse benötigten Puffer und Lösungen ist in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Zusammensetzung der für Western Blot Analysen benötigten Puffer und Lösungen.

Semi-Dry-Puffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin (genaue Einwaage: pH-Wert!); 20 % Methanol; H ₂ O
10x TTBS	100 mM 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 150 mM NaCl; 2 % Tween-20; H ₂ O
Blocking-Puffer	5 % Milchpulver in 1x TTBS
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,5; 50 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 2 % SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol

4.3.4.3. Detektion von radioaktiv markierten Proteinen

Radioaktiv markierte Coreproteine konnten entweder auf einem denaturierenden SDS-PAGE, einem vertikalen SDS-Agarosegel oder einem nativen Agarosegel (horizontal) aufgetrennt werden. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde auf einem Whatmanpapier aufgelegt, mit einer Klarsichtfolie bedeckt und für 2 h bei 80°C im Vakuumtrockner vollständig getrocknet. Native Agarosegele wurden entweder direkt nach dem Lauf nach dem gleichen Verfahren auf Whatmanpapier getrocknet oder ÜN mit TN-300 auf PVDF Membran geblottet. SDS-Agarosegele wurden auf einen gebrauchten Röntgenfilm gelegt und unter einem Föhn vollständig getrocknet. Die getrockneten Gele bzw. die Membranen wurden danach mit Klarsichtfolie bedeckt und in eine Phospho-Imager Kassette eingeklebt. Der zu exponierende Screen wurde durch starke Beleuchtung im Eraser (Raytest) für 30 min gelöscht und auf das Gel bzw. die Membran aufgelegt. Meistens wurde nach 1-stündiger Exposition der Screen nach Angaben des Herstellers im Phospho-Imager Fujifilm BAS 1500 analysiert. Bei Bedarf wurden längere oder kürzere Expositionen angefertigt. Die gespeicherten Daten konnten direkt für eine Bildverarbeitung exportiert werden oder zur Quantifizierung der Signale mit dem Computerprogramm Image-Quant weiter bearbeitet werden.

4.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe der Bradford Methode bestimmt (Bradford, 1976). Die Messung erfolgte mit dem Bradford Reagenz (Bio-Rad) nach Angaben

des Herstellers. Dabei wurde sowohl 1 ml Ansätze als auch Microtiterplatten Ansätze verwendet.

Als Standard diente eine Bio-Rad Standard II Lösung [1,37 mg/ml], die für die Aufnahme einer linearen Kalibriergerade so verdünnt wurde, dass Proteinlösungen in einen BSA-Konzentrationsbereich von 0,2 mg/ml - 0,9 mg/ml bzw. 0,05 mg/ml - 0,5 mg/ml (Microtiterplatte) zur Verfügung standen. Der Farbumschlag der Proben bei Bindung der Proteine an die saure Coomassie Brilliant Blau G250 Lösung wurden entweder in Plastik Einmal Küvetten im Ultraspec 3000 Spektrophotometer oder im ELISA Reader nach Angaben des Herstellers bei 595 nm gemessen. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

4.4. Expression, Reinigung und Analyse von HBV Corefusionsproteinen

4.4.1. Proteinexpression und Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zellen

4.4.1.1. Ultraschallmethode

5 ml RM-selektiv Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und mehrere Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde in 50 ml RM-selektiv Medium 1:1000 überimpft und über Nacht (ÜN) bei 30°C weiter inkubiert. 300 ml Induktions-selektiv Medium mit einem Zusatz von 0,5 % Glucose wurden mit der Übernachtskultur auf Ausgangs-OD₅₅₀= 0,1 - 0,2 angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD₅₅₀= 0,5 geschüttelt. Der Wachstumsverlauf wurde durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm gegen RM-Medium im Ultraspec 3000 Spektrophotometer gemessen. Die Induktion der Expression erfolgt durch Zugabe von Tryptophan [0,1 mg/ml] und einer nachfolgenden Inkubation für mindestens 5 h oder ÜN bei RT. Die induzierten Bakterien wurden durch Sedimentation für 15 min mit 6000 rpm bei 4°C im HFA 14.290 Rotor (Sorval RC5B Zentrifuge) pelletiert. Das Pellet wurde in Waschpuffer (1/10 des Induktionsvolumens) resuspendiert, und nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min mit 6000 rpm bei 4°C bei -20°C /ÜN oder für mindestens 2 h bei -80°C eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde dann in 30 ml (1/10 des Induktionsvolumen) Waschpuffer aufgenommen, mit frisch angesetztem Lysozym [100µg/ml] und Triton X-100 [0,1 %] versetzt und solange auf Eis inkubiert bis die Lösung sehr zähflüssig wurde. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (Branson Sonifier B-12) unter

Verwendung des Macrotips und einer Einstellung der Ausgangsleistung von 65 % (Stufe 6,5) durch 8 - 10 Impulse für 15 sec mit je 45 sec Pause aufgebrochen, bis die Lösung dünnflüssig wurde. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Lysat für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C im SS34 Rotor zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf Eis mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung tropfenweise auf eine Endkonzentration von 40 % Ammoniumsulfat gebracht und für mindestens 30 min auf Eis weiter gerührt. Das entstandene Präzipitat wurde für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C im SS34 Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in 400 - 500 µl 1x TNE-500 bei 50 ml Induktionskulturen bzw. 1 - 2 ml 1x TNE-500 bei 300 ml Induktionskulturen aufgenommen und ÜN bei 4°C im Slide-A-Lyzer (MWCO 10 kDa) gegen einen Liter 1x TNE-500 dialysiert. Um unlösliche Proteine abzutrennen, wurde das abgezogene Dialysat für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der lösliche Proteinüberstand wurde für analytische bzw. präparative Sucrosegradienten weiter verwendet.

Die speziell für die Ultraschall-Methode benötigten Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zellen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zellen durch die Ultraschall-Methode.

Tryptophan Stammlösung	10 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert
Glucose Stammlösung	10 % in H ₂ O, sterilfiltriert
Waschpuffer	50 mM Tris pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0
1x TNE-500	10 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0
Lysozym Stammlösung	50 mg/ml in Waschpuffer
Triton X-100 Stammlösung	10 % in H ₂ O
100 % Ammoniumsulfat (4,1M)	76,7 g + 100 ml H ₂ O

4.4.1.2. Zellaufschluss mit der French Press

Die Induktionskultur wurde wie unter 2.5.1.1 beschrieben angezogen und geerntet. Das eingefrorene Zellpellet wurde in mindestens 10 ml frisch angesetzttem French Press Aufschlusspuffer ohne PMSF resuspendiert, PMSF [1 mM] als zusätzliche Proteaseinhibitor wurde der Lösung direkt vor dem Aufschluss zugegeben, wobei bei mehreren Proben darauf geachtet wurde, diese erst kurz vor dem Aufschluss

aufzutauen und zu verarbeiten. Die Probe wurde nach Anleitung des Herstellers zweimal in der Standard French Pressure 40K Cell (SLM Aminco) aufgeschlossen, beim zweiten Durchlauf wurden die Proben in flüssigen Stickstoff getropft und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die gefrorenen Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und Zelltrümmer wurden für 30 min mit 13000 rpm bei 4°C im SS34 Rotor entfernt. Der klare Überstand wurde wie in 4.4.1.1 beschrieben mit einer 100 % Ammoniumsulfatlösung in 20 mM Tris pH 7,5 auf eine Endkonzentration von 40 % Ammoniumsulfat gebracht, 30 min auf Eis gerührt und das gebildete Präzipitat für 30 min mit 13000 rpm bei 4°C pelletiert. In seltenen Fällen befand sich danach im Überstand noch ein kleiner Anteil Core-GFP Proteinen, was sich anhand der Färbung nachweisen ließ. Dieser wurde aus dem Überstand mit einer Endkonzentration von 60 % Ammoniumsulfat nachgefällt. Das Proteinpellet wurde in 1 - 2 ml 1x TNE-500 aufgenommen und ÜN bei 4°C im Slide-A-Lyzer (MWCO 10 kDa) gegen einen Liter 1x TNE-500 dialysiert. Das abgezogene Dialysat wurde für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, um unlösliche Proteine abzutrennen. Der lösliche Proteinüberstand wurde für analytische bzw. präparative Sucrosegradienten weiter verwendet.

Die speziell für die French Press Methode benötigten Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zellen sind in Tabelle 15 aufgeführt, alle weiteren Zutaten wurden in Tabelle 14 beschrieben.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus GI698 Zellen durch die French Press Methode.

French Press Aufschlusspuffer	50 mM Tris pH 8,0; 140 mM KCl; 360 mM NaCl; 1 mM DTT; 10 % Glycerin; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNaseI; 1x Protease Inhibitor Complete ohne EDTA Puffer ohne PMSF ansetzen, später auf [1 mM] frisch zugeben!
100 % Ammoniumsulfat in Tris (4,1 M)	76,7 g + 100 ml 20 mM Tris pH 7,5

4.4.2. Proteinexpression und Reinigung von Coreproteinen aus BL21 Zellen

Die Kultivierung, Ernte und der Aufschluss von BL21 Zellen entspricht prinzipiell der in 4.4.1 beschriebenen Methode. Geändert wurden das Anzuchtmedium und Expressionsmedium in LB-selektiv Medium, die Messung der optischen Dichte bei 600 nm, das Wachstum der Kultur bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ und der Induktion durch IPTG [1 mg/ml] bei nachfolgender Inkubation für mindestens 5 h oder ÜN bei RT. Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen, die speziell zur Reinigung von Coreproteinen aus BL21 Zellen verwendet wurden, ist in Tabelle 16 angegeben.

Ein sehr wichtige Änderung des Protokolls aus 4.4.1 war der Einsatz einer Nuklease zum enzymatischen Verdau freigesetzter Nukleinsäuren, der in einer verkürzte Ultraschalldauer resultierte: Zusätzlich können mit diesem Bakterienstamm durch eine Proteinexpression unter Kontrolle des lac T7-Promoters insgesamt höhere Proteinausbeuten erzielt werden, wodurch die Ammoniumsulfatfällung nicht mehr angewendet werden musste.

Mit einer Einzelkolonie wurden 20 ml LB-selektiv Medium angeimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskulturen wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 5 min mit 4500 rpm bei RT pelletiert und mit 2 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Mit 1,5 - 2 ml der Bakteriensuspension wurden 300 ml LB-selektiv Medium auf eine Ausgangs- $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bei 37°C weiter inkubiert bis $OD_{600} = 0,6$ erreicht wurde. Der Wachstumsverlauf wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm gegen LB-Medium im Ultraspec 3000 Spektrophotometer verfolgt. Die Kultur wurde durch Zugabe von IPTG [1 mg/ml] induziert und ÜN bei RT exprimiert. Die Bakterienzellen wurden für 15 min mit 5500 rpm bei 4°C im HFA 14.290 Rotor (Sorval RC5B Zentrifuge) pelletiert, das Pellet wurde in 10 ml 1x TN pH 8,0 resuspendiert, und nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min mit 6000 rpm bei 4°C bei -20°C/ÜN oder für mindestens 2 h bei -80°C eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde in 5 ml 1x TN pH 8,0 aufgenommen, mit frisch angesetztem Lysozym [1 mg/ml] und Triton X-100 [0,5 %] versetzt und solange auf Eis inkubiert bis die Lösung sehr zähflüssig war (ca. 30 min). Der enzymatische Verdau der freigesetzten Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von $MgCl_2$ [1 mM] und 25 U/ml Benzonase (Stammkonzentration 25 U/μl)

und einer Inkubation von 15 min bei RT auf dem Drehrad. Die dünnflüssige Lösung wurde in einem vorgekühlten 20 ml Becherglas auf Eis wieder abgekühlt. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonifier B-12) unter Verwendung des Macrotips und einer Einstellung der Ausgangsleistung von 55 % (Stufe 5,5) durch drei Impulse für 10 sec mit je 50 sec Pause und zwei bis drei Impulse für 10 sec mit je 110 sec Pause aufgebrochen. Die Lösung sollte dabei sehr kalt bleiben und durfte nicht schäumen; dafür wurde das Becherglas während des Schallvorgangs in die Hand genommen um eine optimale Eintauchtiefe zu gewährleisten. Nicht-grüne Lysate änderten während des Ultraschalls ihre Farbe von weißlich-trüb zu hell-opak, aber nicht wirklich durchsichtig. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Lysat für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C im SS34 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20°C aufbewahrt bis geklärt war, ob das Protein löslich war und sich somit im Überstand des Lysats befand. Das Lysat wurde ÜN bei 4°C inkubiert und vor der weiteren Verwendung abermals für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von Coreproteinen aus BL21 Zellen durch die Ultraschall-Methode.

TN Puffer	25 mM Tris; 50 mM NaCl pH 8,0
ITPG Stammlösung	10 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert

4.4.3. Sucrosegradienten

Bei den durchgeführten Sucrosegradienten handelte es sich um Dichtegradienten-Differential- oder Zonenzentrifugationen.

Der Gradient ist am Boden des Zentrifugenröhrchens am dichtesten und nimmt mit der Höhe an Dichte ab. Die Eigendichte eines Partikels ist an jedem Punkt der Trennstufe größer als die der Dichtegradientenlösung. Der Dichtegradient aus Sucrose verhindert, dass ein Teilchen mit zunehmender Entfernung von der Rotorachse schneller sedimentiert. Während der Zentrifugation wandern die Partikel mit einer Geschwindigkeit durch den Gradienten, die von der Größe und Form der Partikel, der Zentripetalbeschleunigung sowie Dichte und Viskosität des Mediums abhängt. Enthält die Probe, die auf den vorgeformten Gradienten aufgeschichtet wird, eine Mischung verschiedener Partikel, so wandert jede Partikelklasse unabhängig von den anderen durch den Gradienten und eine Trennung der Partikel

kann selbst dann erzielt werden, wenn die Unterschiede in den Sedimentationseigenschaften nur gering sind. Wird aber die Zentrifugation nicht rechtzeitig beendet, kann die Probe vollständig sedimentieren.

4.4.3.1. Analytische Sucrosegradienten

Als analytische Sucrosegradienten wurden die Gradienten bezeichnet, die sowohl mit einem geringen Probenvolumen als auch geringen Volumen der Sucrocestufen durchgeführt wurden. Dieser Gradient erlaubt es in sehr kurzer Zeit eine Aussage über das Sedimentationsverhalten und somit auch über die Fähigkeit zur Partikelbildung der Coreproteine zu treffen. Dafür wurden sowohl Gradienten mit einem Gesamtvolumen von 1,4 ml (dickwandige Polycarbonat Röhrrchen; Beckmann) bzw. 2,2 ml (dünnwandige Polyallomer Röhrrchen; Beckmann) verwendet. Der diskontinuierlicher Sucrosegradient wurde beginnend mit der höchsten Sucrosekonzentration durch vorsichtiges Überschichten mit den nächst niederen Konzentrationsstufen hergestellt. Zur Herstellung eines linearen Gradienten wurde der fertige Stufengradient mit Parafilm verschlossen und vorsichtig auf die Seite gelegt, wobei sich durch Diffusion zwischen den einzelnen Schichten in relativ kurzer Zeit (mindestens 2 h bei RT) ein nahezu linearer Gradient einstellte. Zuletzt wurde die zu analysierende Probe an Coreprotein vorsichtig auf die oberste Schicht mit der niedrigsten Sucrosekonzentration (10 %) pipettiert, wobei das Volumen der Probe maximal 1,5 - 1,7x größer als die einzelnen Sucrocestufen war. Die beladenen Zentrifugenröhrrchen wurden auf die letzte Kommastelle genau austariert und die Zentrifugation gemäß Rotor (TLS55) und Zentrifuge (Optima TLX Ultrazentrifuge) für 45 min mit 55000 rpm bei 20°C gestartet. Unter den angegebenen Sucrose- und Laufbedingungen ließen sich innerhalb des Gradienten nicht-assemblierte Core Dimere von Corepartikeln und Proteinaggregaten in verschiedene Banden innerhalb des Gradienten abtrennen.

Eine typische Verteilung von Coreprotein nach Zentrifugation durch einen Sucroседichtegradienten ist schematisch in Abbildung 4-1 dargestellt. Die nachfolgende Analyse der aufgetrennten Proteine durch SDS-PAGE und nativer Agarose Gelelektrophorese zeigte, dass nicht-assemblierte Coreproteine (Dimere) meist in den oberen Fraktionen (Fraktion 1 - 4), vollständige Kapside in den Fraktionen 5 - 9 und Aggregate in den Bodenfraktionen 11 - 14 zu finden waren.

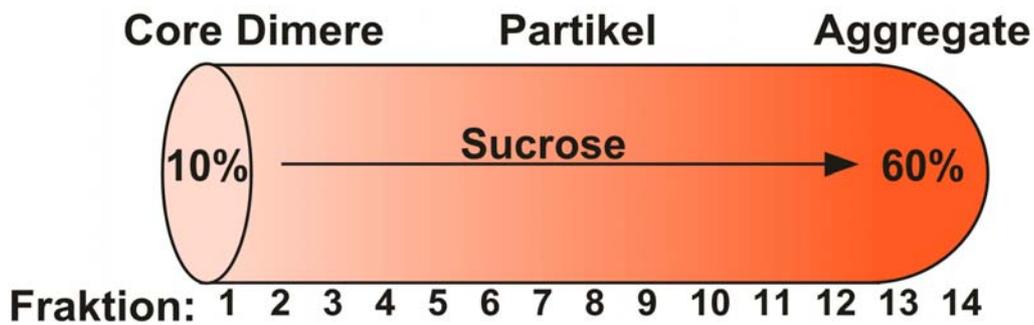


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung einer Sedimentationsanalyse von HBV Coreproteinen durch Zentrifugation im Sucroседichtegradient. Die Probe durch einen Stufengradienten mit aufsteigenden Sucrosekonzentrationen von 10 % bis 60 % zentrifugiert. Durch ihre partikuläre Form reichern sich während der Zentrifugation assemblierte Corepartikel in der Mitte des Gradienten bei einer Sucrosekonzentration von ca. 30 - 40 % bzw. in den mittleren Fraktionen 5 - 9 an. Unassemblierte Untereinheiten können nicht durch den Gradienten wandern und sind in den oberen Schichten zu finden. Hochmolekulare Aggregate wandern durch den Gradienten hindurch bis in die Bodenfraktionen 11 - 14.

Nach dem Lauf wurde der Sucrosegradient von oben nach unten vorsichtig in 14 gleich große Fraktionen geerntet, je 5 - 10 µl jeder Sucrosefraktion wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine entweder durch Coomassie Blaufärbung oder immunologisch detektiert. Zusätzlich wurden bei Bedarf je 5 - 10 µl jeder Sucrosefraktion auf einem nativen 1 % TAE-Agarosegel aufgetrennt (siehe 4.4.4). Die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen, die speziell für eine Sedimentationsanalyse von HBV Coreproteinen verwendet wurden, ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für Sucroседichtegradienten.

10x TN-300	250 mM Tris; 3000 mM NaCl; pH 7,5 mit HCl
TN-300	25 mM Tris; 300 mM NaCl; pH 7,5
80 % Sucrose-Stammlösung	z.B. in TN-300: 80 g Sucrose; 10 ml 10x TN-300, H ₂ O ad 100 ml

Tabelle 18 gibt die Menge an 80 % Sucrose-Stammlösung bzw. die Menge an Puffer in ml an, die zur Herstellung von je 10 ml Sucroselösung mit aufsteigenden Sucrosekonzentrationen von 10 % - 60 % benötigt werden. Die jeweilige Dichte und der refraktäre Index bei 20°C sind ebenfalls angegeben.

Tabelle 18: Pipetierschema zur Herstellung von Sucroslösungen mit aufsteigenden Sucrosekonzentrationen.

Sucrose Konzentration (w/w)	Volumen 80 % Sucrose- Stammlösung (ml)	Volumen 1x Puffer z.B. TN-300 (ml)	Dichte bei 20°C (g/cm ³)	Refraktärer Index η bei 20°C
10 %	1,30	8,70	1,0381	1,3479
20 %	2,71	7,29	1,0810	1,3639
30 %	4,24	5,76	1,1270	1,3811
40 %	5,91	4,09	1,1764	1,3997
50 %	7,73	2,27	1,2296	1,4200
60 %	9,71	0,29	1,2865	1,4418

4.4.3.2. Präparative Sucrosegradienten

Präparative Sucrosegradienten wurden meist im Anschluss an analytische Gradienten durchgeführt, wobei hier sowohl ein größeres Probenvolumen als auch Volumen der Sucrorestufen eingesetzt wurde. Dabei kamen hauptsächlich Sucrosegradienten mit einem Gesamtvolumen von 13 ml zum Einsatz, wobei sich eine Stufengröße von je 1,8 ml und einem Probenvolumen von maximal 2,2 ml bewährte. Die Zentrifugation erfolgte für 1 h 45 min mit 41000 rpm bei 20°C im TST41.14 Rotor in einer der vorhandenen Ultrazentrifugen. Auch hier wurde nach dem Lauf der Gradient von oben nach unten in 14 gleich großen Fraktionen geerntet. Gleiche Fraktionen identischer Gradienten wurden dabei vereinigt. Die Analyse der Sucrosefraktion wurde entsprechend der analytischen Gradienten durchgeführt.

4.4.4. Native Gelelektrophorese

Nicht assemblierte Coreproteine und stabile Corepartikel können anhand ihrer Oberflächenladung mittels einer nativen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden (Serwer *et al.*, 1995). Dabei laufen Kapside als distinkte Bande im elektrischen Feld, nicht-assemblierte Proteine hingegen lassen sich als diffuse Bande nachweisen. Das Laufverhalten der Proteine in diesem System lässt sich durch verschiedene Puffersysteme und im geringen Maße auch durch die Konzentration der Agarose beeinflussen. Durch Zugabe von Ethidiumbromid [0,5 µg/ml] zum Gelsystem konnte optional verpackte Nukleinsäure im UV-Licht nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung der speziell für native Agarosegele

benötigten Puffer und Lösungen ist in Tabelle 19 am Ende des Abschnitts angegeben.

Die Analyse von Sucrosegradientfraktionen erfolgte meist direkt, d.h. ohne weiteren Zusatz von Probenpuffer im 1 % TAE-Gel (pH 8,0). Entzuckerte und fluoreszierende Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit einem Auftragspuffer ohne Farbe versetzt, damit es zu keiner Überlagerung mit Bromphenolblau kommen konnte. Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten Coreproteine entweder im Gel direkt durch Coomassie Blau angefärbt, bis zum Erscheinen von klaren Proteinbanden wieder entfärbt und zur Lagerung für 1,5 h im Vakuumtrockner bei 80°C getrocknet. Alternativ wurden die aufgetrennten Corepartikel durch Kappilartransfer aus dem Agarosegel auf eine PVDF Membran transferiert. Dafür wurden die Kanten des Gels mit einem Skalpell glatt geschnitten, eventuell hochstehende Agarosereste an den Taschen des Gels wurden vorsichtig geglättet. Das Gel wurde für 15 min in TN-300 Puffer äquilibriert, bevor der eigentliche Aufbau des Blots vorgenommen wurde. Eine Glasplatte oder eine andere geeignete Schale wurde zwischen zwei mit TN-300 gefüllten Puffertanks gelagert und mit einer Pufferbrücke, bestehend aus einer Lage Whatmanpapier bedeckt. Diese wurde mit TN-300 Puffer gut befeuchtet, wobei alle Luftblasen mit einem sauberen Wassermannröhrchen entfernt wurden. Darauf wurden drei weitere Schichten in Puffer getränkte Whatmanpapiere luftblasenfrei aufgerollt. Das äquilibrierte Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf gelegt. Darüber wurde eine Lage Klarsichtfolie gespannt, die mit einer neuen Skalpellklinge exakt an den Gelkanten so ausgeschnitten wurde, dass der Puffer nur durch das Gel und nicht durch die angrenzenden Papierbereiche dringen konnte. Die PVDF Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und in Puffer gespült, auf das Gel gelegt und mit drei weiteren Schichten feuchtem Whatmanpapier bedeckt. Der Transfer erfolgte entweder für mindesten 4 h oder ÜN bei RT. Nach dem Transfer wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen auf der PVDF Membran für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C auf der Wippe in 5 % Blocking-Lösung abgesättigt (geblockt). Danach konnten durch geeignete primäre Antikörper die gebundenen Coreproteine immunologisch detektiert werden (siehe 4.3.4.2).

Tabelle 19: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für native Agarosegele.

6x DNA Probenpuffer	0,15 % Bromphenolblau; 0,15 % Xylencyanol; 30 % Glycerin; 50 mM EDTA pH 8,0
Auftragspuffer ohne Farbe	10 mM EDTA pH 8,0; 50 % Glycerin
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml in H ₂ O
Neutraler pH-Wert: 50xTAE pH 8,0	2 M Tris Azetat; 50 mM EDTA pH 8,0
Leicht saurer pH-Wert: 10x Bis-Tris Pipes EDTA (BTPE) pH 6,6	100 mM PIPES; 300 mM BisTris; 100 mM EDTA pH 8,0
Leicht alkalischer pH-Wert: 10xTB-Puffer pH 9,6	2 M Tris; 0,5 M Borsäure

4.4.5. Umpuffern von Proteinlösungen

4.4.5.1. Dialyse

Um proteinhaltige Lösungen umzupuffern oder bei Sucrosegradientfraktionen die Sucrosekonzentration vor weiteren Verarbeitungsschritten wie z.B. Einengen zu erniedrigen, wurde je nach Ausgangsvolumen der Lösung eine geeignete Dialysekassette (Slide-A-Lyzer) mit einer Ausschlussgröße (Molecular Weight Cut Off, MWCO) von 10 - 30 kDa verwendet. Bei sehr kleinem Volumina unter 100 µl wurden Minidialyseeinheiten (Slide-A-Lyzer™-Mini) verwendet. Die Dialyse wurde meist für 2 h bei RT oder ÜN bei 4°C unter ständigem Rühren durchgeführt.

4.4.5.2. Gelfiltration

Um bei Sucrosegradientfraktionen die Zuckerkonzentration zu erniedrigen wurde alternativ zur Dialyse eine Gelfiltration in selbstbeschickten Säulen (Mobitec) durchgeführt.

Dafür wurde Sephadex-G50 in TN-300 gequollen, luftblasenfrei in die Säulen gefüllt und mit mindestens drei Säulenvolumen TN-300 nachgespült bis sich das Sephadexmaterial vollständig gesetzt hatte. Die sucrosehaltige Lösung wurde vorsichtig auf das Gelbett aufgetropft. Die ersten zwei bis drei aus der Säule austretenden Tropfen wurden meistens verworfen, danach wurde das Eluat aufgefangen. Auf die Säule wurde ein weiteres Probenvolumen TN-300 Puffer aufgegeben, das folgende Eluat wurde in mehreren Fraktionen aufgefangen. Alle Proteinhaltigen Fraktionen der Gelfiltration (Proteingehalt bestimmt über die Farbe

bei Core-GFP Fusionsproteinen, bzw. SDS-PAGE bei nicht gefärbten Proteinen) wurden im Refraktometer RL-2 auf eine Reduktion der Sucrosekonzentration hin überprüft und die Fraktionen mit der geringsten Zuckerkonzentration wurden für eine weitere Verarbeitung vereinigt.

4.4.6. Erhöhung der Proteinkonzentration durch Ultrafiltration

Zur Erhöhung der Konzentrierung von Proteinlösungen wurden je nach Ausgangsvolumen und Molekulargewicht des zu konzentrierenden Proteins verschiedene Ultrafiltrationseinheiten wie Microcon bis 500 µl, Centricon bis 2 ml bzw. Amicon Ultra für 4 ml bzw. 15 ml (alle Millipore) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei Corefusionsproteinen wurde zur Erhöhung der Konzentration meistens eine Ausschlussgröße von 30 kDa gewählt, da hier niedermolekulare Verunreinigung sehr schnell, Coreproteine bzw. assemblierte Core Partikel aber erst nach sehr langen Zentrifugationszeiten die Membran passieren können.

4.4.7. Elektronen Mikroskopie (EM)

Die zu untersuchenden Corefusionsprotein Proben mussten für die Untersuchung im Elektronen Mikroskop (EM) mindestens eine Konzentration von 1 mg/ml aufweisen. Sucrosegradientproben, die ungefähr diese Konzentration aufwiesen, wurden direkt für die Elektronenmikroskopie verwendet, weniger konzentrierte Proben wurden entzuckert (vergleiche 4.4.5) und auf die benötigte Konzentration eingeeengt.

Für die Anfertigung von negativ kontrastierten Proben wird als Untergrund ist eine Schicht aus amorphem Kohlenstoff verwendet. Diese wird auf ein Kupfernetz (Grid) als Trägermaterial aufgebracht, das dann direkt in den Probenhalter des EM eingelegt wird.

Zur Herstellung von Grids wurde zunächst eine frisch durch Spalten freigelegte Glimmeroberfläche im Bedampfungsgerät mit Kohlenstoff bis zur gewünschten Dicke bedampft. Die Grids wurden ausgelegt und mit Wasser bedeckt. Nach einem Tag wurde die Glimmerschicht in H₂O abgeschwemmt. Durch vorsichtiges Absenken des Wasserspiegels wurde die Glimmerschicht auf die Grids abgesenkt. Die Grids wurden dann vorsichtig entnommen, seitlich auf Filterpapier trocken getupft und staubfrei gelagert. Um eine frische Oberfläche zu erhalten, die Proteine stärker adsorbiert, wurde das Netzchen im Bedampfungsgerät bei 0,4 mbar Luft für 1 min mit maximaler Stromstärke beglimmt. Zur Probenvorbereitung wurde ein frisch beglimmtes Kupfernetz mit dem Kohlefilm nach oben in einer Antikapillar-Pinzette

festgeklemmt. Mindestens 5 µl einer Corefusionsprotein Probe wurden vorsichtig aufgebracht und für 2 min auf dem Netz belassen. Dann wurde der Tropfen durch seitliches Aufsetzen des Netzes auf Filterpapier abgesaugt. Bei sucrosehaltigen Proben wurde das noch feuchte Netz sofort zweimal in je 100 µl destilliertem Wasser gewaschen (nur Oberseite des Netzes eintauchen!). Anschließend wurden 10 µl der jeweiligen Kontrastierungslösung (Freiburg oder EMBL, siehe Tabelle 20) aufgetragen und für 2 min auf dem Netz belassen. Nach erneutem Abtupfen und Trocknen bei RT war das Netz fertig für die Betrachtung im Elektronenmikroskop. Die Auswertung der Grids erfolgte am Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg am EM 400/ Philips bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV. Aufnahmen wurden bei Vergrößerung von 27000x bis 105000x gemacht. Nach Entwicklung wurden die Negative mit dem Scanner EMiL bei maximaler Auflösung (2032 dpi) eingescannt.

Alternativ wurden die vorbereiteten Netzchen am EMBL, Heidelberg, am Philips CM 120 Biotwin betrachtet und digital aufgezeichnet.

Die Analyse geeigneter Proben durch Kryo-Elektronenmikroskopie erfolgte wie beschrieben (Böttcher *et al.*, 1997) nach Frieren der Proben am Philips CM300 FEG am EMBL, Heidelberg.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Lösungen zur negativ Kontrastierung.

Kontrastierungslösung Freiburg: 2 % (w/v) Uranylazetat	47 mM $\text{UO}_2(\text{OAc})_2$; pH 4,2
Kontrastierungslösung EMBL: 2 % (w/v) Phosphorwolframsäure	ca. 7 mM $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \times \text{H}_2\text{O}$; pH 7,6 (NaOH)

4.5. Herstellung von Mosaik Partikeln

4.5.1. Reinigung von Coreproteinen über native Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die hier verwendete Reinigung der Coreproteine beruht darauf, dass an die rekombinant zu exprimierenden Proteine eine Peptidsequenz aus sechs Histidinresten (His₆-Peptid) angehängt wird. Dieses His₆-Peptid, welches üblicherweise als His-Tag bezeichnet wird, ermöglicht die Reinigung der Proteine über die Komplexbildung mit Nickelionen (Ni-Nitrilotriacetic-Acid = Ni-NTA), die an

eine Agarose (Nickel-Agarose) immobilisiert vorliegen. Durch Konkurrenz mit Imidazol kann das gebundene Protein wieder von der Agarose eluiert werden.

Alle benötigten Puffer sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Zur Reinigung über native Ni-NTA Affinitätschromatographie kann die Lyse der Bakterienzellen optional wie in 4.4.2 beschrieben durchgeführt werden; Imidazol [10 mM] kann dann bei Bedarf zum klaren Lysat vor Bindung an die Nickelsäule zugegeben werden, dies ist aber für die Bindung der Proteine nicht essentiell. Normalerweise wurde das gefrorene Pellet in 5 ml Lysepuffer (LS) aufgenommen, mit frisch angesetztem Lysozym [1 mg/ml] und Triton X-100 [0,5 %] versetzt und solange auf Eis inkubiert bis die Lösung sehr zähflüssig war (ca. 30 min). Der Verdau der freigesetzten Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von $MgCl_2$ [1 mM] und 25 U/ml Benzonase und Inkubation für 15 min bei RT auf dem Drehrad. Die dünnflüssige Lösung wurde in einem vorgekühlten 20 ml Becherglas auf Eis wieder abgekühlt. Danach wurden die Zellen im Ultraschall (Branson Sonifier B-12) bei Verwendung des Makrotip und einer Einstellung der Ausgangsleistung von 55 % (Stufe 5,5) durch drei Impulse für 10 sec mit je 50 sec Pause und zwei bis drei Impulse für 10 sec mit je 110 sec Pause aufgebrochen. Die Lösung sollte dabei sehr kalt bleiben und durfte nicht schäumen; dafür wurde das Becherglas während des Schallvorgangs in die Hand genommen. Nicht-grüne Lösungen änderten ihre Farbe von weißlich-trüb zu hell-opak, aber nicht wirklich durchsichtig. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Lysat für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C im SS34 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20°C aufbewahrt bis geklärt war, ob das Protein löslich war und sich somit im Überstand des Lysats befand.

Die Nickel-Agarose wurde durch mehrmaliges Waschen (mindestens 3-faches Säulenvolumen) mit Lysepuffer mit 50 mM NaCl (low salt = LS) äquilibriert. Das klare Lysat wurde entweder komplett mit der äquilibrierten Nickel-Agarose in einem 15 ml Reaktionsgefäß für ca. 1 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert oder das Lysat wurde langsam auf die vorbereitete Säule aufgetropft, die Säule verschlossen und so für ca. 1 h bei RT inkubiert. Das Waschen der Nickel-Agarose mit Waschpuffer 1 (LS) und Waschpuffer 2 (LS) erfolgte jeweils mit ca. 2-fachem Säulenvolumen. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von mind. 3-fachem Säulenvolumen Elutionspuffer A (LS). Um fester gebundene Proteine von der Säule zu eluieren wurde die Nickel-Agarose abschließend mit Elutionspuffer B bei 2-fachem

Säulenvolumen gewaschen. Jeweils 5 µl aller erhaltenen Wasch- und Elutionsproben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie Blaufärbung detektiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein in hoher Konzentration und in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Puffer für die Reinigung von Proteinen über native Ni-NTA Affinitätschromatographie.

Lysepuffer (LS)	10 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer (Na ₂ HPO ₃ /NaH ₂ HPO ₃) pH 8,0; 50 mM NaCl
Waschpuffer 1 (LS)	20 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Waschpuffer 2 (LS)	50 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Elutionspuffer A (LS)	250 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Elutionspuffer B (LS)	800 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl

4.5.2. Reinigung der Proteine über semi-denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie

Alle benötigten Puffer zur Reinigung von Proteinen über semi-denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie sind in Tabelle 22 angegeben.

Bei unlöslichen Proteinen, bei denen es sich gezeigt hatte, dass sie nach nativer Reinigung im Zellpellet zu finden waren, wurde das gefrorene Zellpellet direkt in denaturierendem Lysepuffer (denaturierend low salt = DLS) resuspendiert und ca. 20 min bei RT inkubiert, wobei die Suspension zwischendurch kräftig gevortext wurde. Da Benzonase bis zu einer Harnstoffkonzentration von ca. 5 M Enzymaktivität aufweist, konnte ein Verdau der freigesetzten Nukleinsäuren durch Zugabe von MgCl₂ [1 mM] und 25 U/ml Benzonase und Inkubation für weitere 15 min bei RT auf dem Drehrad, erfolgen. Zur Abtrennung des Zelltrümmer wurde die Zellsuspension für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C im SS34 Rotor oder in der Tisch-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Die Proteine sollten sich danach im löslichen Überstand befinden. Die Nickel-Agarose wurde durch mehrmaliges Waschen (mindestens 3-faches Säulenvolumen) mit Lysepuffer (DLS) äquilibriert. Das klare Lysat wurde entweder komplett mit der äquilibrierten Nickel-Agarose in einem 15 ml Röhrchen für ca. 1 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert oder das Lysat wurde

langsam auf die vorbereitete Säule aufgetropft, die Säule wurde verschlossen und so für ca. 1 h bei RT inkubiert. Das Waschen der Nickel-Agarose mit Waschpuffer 1 (DLS) und Waschpuffer 2 (DLS) erfolgte jeweils mit ca. 2-fachem Säulenvolumen. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von mind. 3-fachem Säulenvolumen Elutionspuffer A (DLS). Um fester gebundene Proteine von der Säule zu eluieren, wurde die Nickel-Agarose abschließend mit Elutionspuffer B (DLS) bei 2-fachem Säulenvolumen gewaschen. Jeweils 5 µl aller erhaltenen Wasch- und Elutionsproben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie Blaufärbung detektiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein in hoher Konzentration und in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Puffer für die Reinigung von Proteinen über semi-denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie.

Lysepuffer (DLS)	5 M Harnstoff; 10 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8,0; 50 mM NaCl
Waschpuffer 1 (DLS)	5 M Harnstoff; 20 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Waschpuffer 2 (DLS)	5 M Harnstoff; 50 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Elutionspuffer A (DLS)	5 M Harnstoff; 250 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Elutionspuffer B (DLS)	5 M Harnstoff; 800 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl

4.5.3. *In vitro* Assemblierung

Um das Verhältnis der einzelnen Proteine exakt einstellen zu können, wurden vor der Versuchsdurchführung von den jeweiligen Proteinlösungen die Konzentration mit einem Bradford Assay (siehe 4.3.5) bestimmt oder in Vorversuchen in einer SDS-PAGE verglichen. Danach wurden die Proben je nach Herkunft ihrer Reinigung wie folgt für die gemeinsame Bindung an eine Ni-NTA Säule vorbereitet:

A: Entzuckerte Sucrosegradient Proben:

Durch Zugabe von Denaturierungspuffer (DP) zur verwendeten Proteinmenge wurde diese auf eine Harnstoff Endkonzentration von meistens 5 M gebracht,

bei sehr stabilen älteren Wildtyp HBc1-149 Proben wurde auf 5,5 - 6 M Harnstoff erhöht.

B: Proben, gereinigt über native Nickelsäule:

Zur Verringerung der Imidazolkonzentration von 250 mM auf 10 mM wurden die Proben mind. 1 h bei RT gegen Lysepuffer (LS) dialysiert. Danach wurden die Proben durch Zugabe von Denaturierungspuffer (DP) auf die gewünschte Harnstoff Endkonzentration (5 M) eingestellt.

C: Proben, gereinigt über semi-denaturierende Nickelsäule:

Zur Verringerung der Imidazolkonzentration von 250 mM auf 10 mM unter Beibehaltung der Harnstoffkonzentration, wurden die Proben mind. 1 h bei RT gegen denaturierenden Lysepuffer (DLS) dialysiert.

Die beiden denaturierten Proteinproben wurden im gewünschten Verhältnis in einem 15 ml Röhrchen gemischt und zusammen mit der in denaturierendem Lysepuffer (DLS) zuvor äquilibrierten Nickel-Agarose für ca. 1 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Das Waschen der Nickel-Agarose erfolgte bei absteigender Harnstoffkonzentration und ansteigender Salzkonzentration (high salt = HS) mit Waschpuffer A (DLS) bis Waschpuffer E (HS) mit je 2-fachem Säulenvolumen. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von mind. 3-fachem Säulenvolumen Elutionspuffer A (HS). Um fester gebundene Proteine von der Säule zu eluieren wurde die Nickel-Agarose abschließend mit Elutionspuffer B (HS) bei 2-fachem Säulenvolumen gewaschen. Jeweils 5 µl aller erhaltenen Wasch- und Elutionsproben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie Blaufärbung detektiert. Fraktionen, die beide gewünschten Proteine in hoher Konzentration und in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Alle für eine *in vitro* Assemblierung benötigten Puffer sind in Tabelle 23 aufgeführt, wobei die abnehmenden Harnstoffkonzentrationen und die ansteigenden Imidazolkonzentrationen zur Verdeutlichung durchgehend angegeben sind.

Tabelle 23: Zusammensetzung der Puffer für die *in vitro* Assemblierung von HBV Coreproteinen durch Ni-NTA Affinitätschromatographie.

Denaturierungspuffer (DP)	8 M Harnstoff; 10 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 8,0; 50 mM NaCl
Lysepuffer (DLS)	5 M Harnstoff; 10 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Waschpuffer A (DLS)	5 M Harnstoff; 20 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Waschpuffer B (DLS)	2,5 M Harnstoff; 20 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Waschpuffer C (DLS)	1 M Harnstoff; 20 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Waschpuffer D (LS)	0 M Harnstoff; 20 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 50 mM NaCl
Waschpuffer E (HS)	0 M Harnstoff; 50 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl
Elutionspuffer A (HS)	0 M Harnstoff; 250 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl
Elutionspuffer B (HS)	0 M Harnstoff; 800 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl

4.5.4. Analyse der Mosaikpartikel

Zur weiteren Analyse der in 2.5.3 gemeinsam eluierten Coreproteine wurden diese für mindestens 2 h bei RT gegen TN-300 dialysiert. Danach wurden die Proben durch Ultrafiltration konzentriert und das Sedimentationsverhalten in einem analytischen Sucrosegradienten überprüft. Der Sucrosegradient wurde in 14 gleich großen Fraktionen geerntet, je 5 - 10 µl jeder Sucrosefraktion wurden in einer SDS-PAGE bzw. nativen 1 % TAE-Agarosegel Elektrophorese aufgetrennt und die Proteine entweder durch Coomassie Blaufärbung oder immunologisch detektiert. Alle Fraktionen, die entstandene Mosaikpartikel enthielten wurden vereinigt und bei 4°C gelagert.

Zur weiteren Charakterisierung der Mosaikpartikel wurde die Proteinkonzentration bestimmt und ca. 1 - 2 µg Corepartikel für 30 - 60 min bei 100 V auf einem weiteren nativen Agarosegel aufgetrennt. Die entstandenen distinkten Proteinbanden wurden anhand ihrer Fluoreszenz bzw. Ethidiumbromidfärbung unter UV Licht mit einem Skalpell exakt aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden für 10 min bei 100°C geschmolzen, mit mindestens zwei Volumenanteilen 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für weitere 10 min bei 100°C erhitzt. Die flüssigen Proben wurden

schnellstmöglich in große zusammengeklebte Auftragstaschen einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend entweder direkt durch Coomassiefärbung detektiert oder für eine immunologische Detektion im Semi-Dry Blot auf eine PVDF Membran transferiert.

Alternativ zum Ausschneiden der Mosaikpartikelbanden wurden die Coreproteine aus dem Agarosegel durch Kapillartransfer auf eine PVDF Membran geblottet, wobei hier nur 1/10 der Proteinmenge (0,1 - 0,2 µg) verwendet wurde. Durch unterschiedliche spezifische Primärantikörper wurden die im Mosaikpartikel enthaltenen Coreproteine nacheinander nachgewiesen. Die abschließende Analyse der Mosaikpartikel erfolgte wie in 4.4.7 beschrieben nach Negativkontrastierung im EM.

4.6. Verpackung von Nukleinsäure in Core Partikel

4.6.1. Reinigung der Proteine

Die verwendeten Coreproteine wurden wie in 4.5.2 beschrieben mit 5 M Harnstoff enthaltenden Lösungen über eine semi-denaturierende Nickel-NTA-Säule gereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Protein in hoher Konzentration und in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt (vergleiche 4.3.5).

4.6.2. Radioaktive Markierung von DNA und RNA Leitern zur Verpackung

Je 5 µg peqGold 1k kb DNA Leiter (250 - 10000 bp) und peqGold High Range RNA Leiter (100 - 1000 bp) wurden mit 2 U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) in SAP-Reaktionspuffer für 15 min bei 37°C dephosphoryliert. Das Enzym wurde anschließend für 15 min bei 65°C inaktiviert. Zur Abtrennung des Enzyms und der Salze vom Reaktionsansatz wurde die DNA über eine QIAquick Nucleotide Removal Säule (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die markierte RNA wurde mit 3 M Na-Azetat und 2,5-fachen Volumen 100 % Ethanol gefällt und anschließend in DEPC-H₂O aufgenommen. Die 5'-Enden der Nukleinsäure wurde anschließend mit jeweils 30 µCi γ -³²P-ATP in T4-Polynukleotid Kinase Puffer mit 10 U - 20 U T4-Polynukleotid Kinase (T4-PNK) für 30 min bei 37°C markiert. Zur Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden wurden beide Ansätze in DNA Quick Spin bzw. RNA Quick Spin Columns nach Angaben des Herstellers abzentrifugiert und die Säulen 1x mit DEPC-H₂O gewaschen. Dem vereinigten Eluat wurde nach Messung der

verbliebenen Aktivität im Szintillationsgerät 1/10 des Gesamtvolumen entnommen (Aliquot 1) und bis zur weiteren Verwendung als Referenz der eingesetzten Menge an markierter Nukleinsäure und als Größenmarker für die nachfolgende Analyse im Agarosegel, bei -20°C gelagert. Der Rest wurde zur Verpackung in HBV Kapside eingesetzt.

Die Zusammensetzung des SAP-Reaktionspuffers und des T4 Polynukleotid Kinase Puffers ist in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Benötigte Puffer zur Dephosphorylierung und radioaktiven Markierung der 5'-Enden von Nukleinsäure.

SAP-Reaktionspuffer	500 mM Tris-HCl pH 8,5; 50 mM MgCl_2
T4 Polynukleotid Kinase Puffer	70 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT

4.6.3. Markierung von linearer, doppelsträngiger DNA zur Verpackung

5 μg Plasmid DNA wurden mit 2 U Restriktionsenzym EcoR I nach Standardprotokoll für 1 h bei 37°C linearisiert, mit 1,5 U SAP für 1 h bei 37°C dephosphoryliert und das Enzym 15 min bei 65°C inaktiviert. Auf die Abtrennung des Enzyms und der Salze wurde verzichtet. Die 5'-Enden der Nukleinsäure wurde dann mit 20 U T4-PNK und $30\mu\text{Ci } \gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ für 1 h bei 37°C markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden nach Angaben des Herstellers über eine DNA Quick Spin Nukleotide Säule abgetrennt. Das Eluat wurde ÜN bei -20°C eingefroren. Das wieder aufgetaute Eluat wurde mit 40 U des zweiten Restriktionsenzym Sal I für 2 h bei 37°C nachgeschnitten. Der Restriktionsansatz wurde zur Abtrennung der Restriktionsendonukleasen mit einem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers bei zweimaliger Elution mit dem beiliegenden EB-Puffer gereinigt und die verbliebene Aktivität im Szintillationsgerät gemessen. Dem vereinigten Eluat wurde nach Messung der verbliebenen Aktivität 1/10 des Gesamtvolumen entnommen und bis zur weiteren Verwendung als Referenz der eingesetzten Menge an markierter Nukleinsäure und als Größenmarker für die nachfolgende Analyse im Agarosegel bei -20°C gelagert. Der Rest wurde zur Verpackung in HBV Kapside eingesetzt.

4.6.4. Verpackung und Abtrennung nicht verpackter Nukleinsäure

Zur Verpackung von markierter Nukleinsäure in HBV Kapside wurden zwischen 200 - 400 µg semi-denaturiertes Coreprotein (Reinigung siehe 4.5.2) verwendet, wobei die dafür benötigten Puffer im Anschluss in Tabelle 25 aufgeführt sind.

Die Proteinlösung wurde in einem Standardreaktionsgefäß mit der γ - ^{32}P -markierten Nukleinsäure durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig gemischt. Danach wurde die Aktivität der Mischung gemessen, 1/10 des Gesamtvolumens wurde entnommen und als ursprünglicher Gesamtansatz bei 4°C gelagert. Der Rest wurde mit einer Spritze in eine Dialysekammer gefüllt und für 1 h bei RT gegen 250 ml Dialysepuffer A dialysiert. Der Puffer wurde verworfen (radioaktiver Flüssigabfall) und gegen 250 ml Dialysepuffer B ausgetauscht. Die abschließende Dialyse nach erneuertem Pufferwechsel gegen 250 ml TN-300 erfolgte ÜN bei 4°C. Das Dialysat wurde vorsichtig abgezogen und teilweise wurde 1/10 Volumen zur Kontrolle bei 4°C gelagert. Zur Abtrennung von nicht-verpackter Nukleinsäure und gleichzeitigen Gewinnung von vollständig assemblierten Kapsiden wurde eine isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dafür wurde ein diskontinuierlicher CsCl-Dichtegradient angefertigt. In dickwandigen 1,4 ml Polycarbonat Röhrchen (Beckmann) wurde die Dichte CsCl-Lösung mit der geringsten Dichte ($1,1 \text{ g/cm}^3$) vorgelegt. Die aufsteigend dichteren CsCl-Stufen ($1,2 \text{ g/cm}^3$ - $1,5 \text{ g/cm}^3$) wurden vorsichtig mit einer ausgezogenen Proteingel-Spitze unterschichtet. Auf den vorgeformten Gradienten wurde das Dialysat vorsichtig überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in der Optima TLX Ultrazentrifuge (TLS55 Rotor) entweder bei für 6 h mit 55000 rpm bei 4°C oder für 19 h mit 31000 rpm bei 4°C. Der Gradient wurde vorsichtig von oben nach unten in 7 gleich großen Fraktionen geerntet und das Material bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Dialysepuffer zur Verpackung von Nukleinsäure in Core Partikel.

Dialysepuffer A	3 M Harnstoff; 25 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl pH 7,5
Dialysepuffer B	1,5 M Harnstoff; 25 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl pH 7,5

4.6.5. Analyse der spezifisch verpackten Nukleinsäure

Nach Bestimmung der Aktivität jeder einzelnen in 2.6.4 erhaltenen CsCl-Fractionen wurden je 1/20 - 1/40 Volumen jeder Fraktion mit 6x DNA Probenpuffer vermischt und auf einem nativen 1,2 % TAE-Agarosegel aufgetrennt. Das Laufverhalten der assemblierten Kapside, der verpackten Nukleinsäuren und die Abtrennung der nicht-verpackten Nukleinsäuren wurden anschließend im getrockneten Gel durch das Phospho-Imager System detektiert. Um die Menge an assemblierten und Nukleinsäure enthaltenen Kapsiden zu bestimmen wurden je 1/20 - 1/40 Vol. jeder CsCl-Fraktion zusammen mit einer Verdünnungsreihe (0,005 µg - 0,2 µg) an unmarkiertem Coreprotein auf einem nativen 1,2 % TAE-Agarosegel bei 120V für 1,5 h aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Kapillartransfer mit TN-300 für mindestens 3 h oder ÜN bei RT auf eine PVDF Membran transferiert. Danach wurden die Coreproteine über einen mit Alkaline Phosphatase gekoppeltem Core-spezifischem Antikörper auf der Membran detektiert und die Membran zur späteren Dokumentation eingescannt. Nukleinsäure enthaltende Kapsidfraktionen wurden vereinigt und je nach Endvolumen in einer Dialysekassette oder einem Slide-A-Lyzer™-Mini für 1 h bei RT gegen TN-300 dialysiert. Das abgezogene Dialysat wurde wieder halbiert.

Alle benötigten Puffer und Lösungen zur Analyse der spezifisch verpackten Nukleinsäuren aus HBV Core Partikeln sind in Tabelle 26 aufgeführt. Zur enzymatischen Entfernung aller nicht-verpackten, aber noch mit dem Kapsid assoziierten Nukleinsäuren, wurde die eine Hälfte mit CaCl₂ [10 mM] versetzt und 2 U - 4 U Micrococcus Nuklease (MN) zugegeben. Der enzymatische Verdau erfolgte für 30 min bei 37°C. Der anderen Hälfte wurde die entsprechende Menge an TN-300 Puffer zugegeben und ebenfalls 30 min bei 37°C inkubiert. 1/10 der Reaktionsansätze wurde nach 30 min mit 6x DNA-Probenpuffer vermischt, in einem 1,5 %-igem horizontalen Agarosegel aufgetrennt und nach Trocknen des Gels auf die Vollständigkeit des Nuklease Verdaus hin überprüft. Bei Bedarf wurden die Ansätze bei 37°C für weitere 30 min inkubiert.

Der Aufschluss der mit Nukleinsäure bepackten Kapside (mit/ohne MN Verdau) erfolgte entweder durch Zugabe von EDTA [12 mM] und SDS [2 %], oder mit einem zusätzlichen Protein Verdau durch Proteinase K [0,4 mg/ml] für 30 min bei 37°C in EDTA [20 mM] und SDS [2 %]. Durch Zugabe von 1 Volumen Tris-gesättigtem Phenol wurden die Proteine anschließend extrahiert. Die Nukleinsäuren im

wässrigen Überstand wurden nach Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Azetat, 2,5 Vol.100 % Ethanol und 2 µl GlycoBlue für 1 h bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation bei für 30 min mit 13000 rpm bei 4°C wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, wieder abzentrifugiert (für 10 min mit 13000 rpm bei 4°C) und in 20 µl TE aufgenommen. Die Hälfte des Ansatzes wurde für 1,5 h bei 14 Watt in einem horizontalen 1,2 - 1,5 % SDS-Agarosegel aufgetrennt, das getrocknete Gel wurde im Phospho-Imager analysiert.

Tabelle 26: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Analyse von verpackter Nukleinsäure aus HBV Core Partikeln.

EDTA Stammlösung	0,5 M EDTA; pH 8,0
CaCl ₂ Stammlösung	1 M in H ₂ O
SDS Stammlösung	10 % in H ₂ O
Proteinase K Stammlösung	10 mg/ml in H ₂ O
1x TE	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0

4.7. Phosphorylierung von Corepartikeln

4.7.1. Native Reinigung von SRPK 1 über Ni-NTA Affinitätschromatographie

Für *in vitro* Phosphorylierungen von HBV und DHBV Coreproteinen wurde die Serin-Arginin-Protein-Spezifische-Kinase 1 (SRPK 1) verwendet, wobei das Gen für SRPK 1 in den Expressionsvektor pRSET-B (Invitrogen) inkloniert vorlag. Das Konstrukt wurde in BL21*cp Zellen exprimiert und die Proteine mittels N-terminaler Fusion des His₆-Peptids über eine Nickel-NTA Säule nativ gereinigt. Das mitgelieferte Protokoll zum Aufschluss der Zellen wurde dazu leicht modifiziert. Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen ist in Tabelle 27 angegeben. Die durch Zentrifugation geernteten Bakterienzellen wurden in 5 ml TN-Puffer resuspendiert und mit frisch angesetztem Lysozym [1 mg/ml] und Triton X-100 [0,5 %] versetzt. Die Suspension wurde für ca. 30 min auf Eis inkubiert bis die Lösung sehr zähflüssig wurde. Nach Zugabe von MgCl₂ [1 mM] und 25 U/ml Benzonase (Novagen; Stammkonzentration 25 U/µl) wurde die Lösung kurz in der Hand erwärmt (ca. 30 sec) und sofort wieder auf Eis gestellt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Suspension wieder dünnflüssig wurde. Danach wurde die Lösung mit einer 25x Proteaseinhibitor Cocktail-Lösung (Incomplete d.h. ohne

EDTA) auf eine 1x Inhibitor Konzentration gebracht. Die dünnflüssige Lösung wurde in einem vorgekühlten 20 ml Becherglas auf Eis weiter abgekühlt. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonifier B-12) unter Verwendung des Macrotips und einer Einstellung der Ausgangsleistung von 55 % (Stufe 5,5) durch sechs Impulse für 10 sec mit je 50 sec Pause aufgebrochen. Die klare Lösung wurde in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt und Zelltrümmer bei für 15 min mit 13000 rpm bei 4°C in der Tisch-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde abschließend durch einen 0,22 µm Filter filtriert. 1,5 ml Nickel-Agarose wurde mit Lysepuffer, dem Proteaseinhibitor Cocktail [1x] zugesetzt wurde, äquilibriert und mit dem Filtrat vermischt. Die Mischung wurde anschließend für 1 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Das Waschen des gepackten Säulenmaterials mit Waschpuffer 1 (HS) und Waschpuffer 2 (HS) erfolgte jeweils mit ca. 2-fachem Säulenvolumen und unter Zugabe von Proteaseinhibitor Cocktail [1x] und Glycerin [10 %].

Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 3 x 2 ml Elutionspuffer A (HS) in vorgekühlte Reaktionsgefäße. Fester gebundene Proteine wurden von der Säule mit zweimal 2 ml Elutionspuffer B (HS) gewaschen. Alle Fraktionen wurden auf Eis gelagert. Jeweils 10 µl aller erhaltenen Wasch- und Elutionsproben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie Blaufärbung bzw. nach Western Blot Analyse immunologisch mit einem Anti-His Antikörper detektiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein in hoher Konzentration und in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und ÜN bei 4°C gegen einen Liter SRPK 1-Dialysepuffer dialysiert. Zur endgültigen Lagerung wurde das Dialysat durch direkte Zugabe von Stammlösungen auf die Endkonzentration des SRPK 1-Lagerpuffers von 50 % Glycerin, 20 mM HEPES pH 7,6, 100 mM KCl und 10 mM β-ME gebracht. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Protein in 500 µl Portionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Tabelle 27: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Reinigung von SRPK 1 über nativen Ni-NTA Affinitätschromatographie.

Lysepuffer (HS)	10 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl
Waschpuffer 1 (HS)	20 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 1x Protease Inhibitor Cocktail
Waschpuffer 2 (HS)	50 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 1x Protease Inhibitor Cocktail

Elutionspuffer A (HS)	250 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 1x Protease Inhibitor Cocktail
Elutionspuffer B (HS)	800 mM Imidazol; 50 mM Na-Phosphat-Puffer; 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 1x Protease Inhibitor Cocktail
SRPK 1-Dialysepuffer	25 % Glycerin; 20 mM HEPES pH 7,6; 100 mM KCl; 10 mM β -ME
SRPK 1-Lagerpuffer	50 % Glycerin; 20 mM HEPES pH 7,6; 100 mM KCl; 10 mM β -ME
KCl Stammlösung	1 M KCl
HEPES Stammlösung	1 M HEPES, pH 7,6 mit KOH
β -Mercaptoethanol (β -ME)	14,3 M

4.7.2. „Permeabilisierung“ von HBV Kapsiden

Um die nach der Partikelbildung vermutlich im Inneren der Kapside liegenden C-Termini der HBV Coreproteine zumindest zeitweise zugänglich zu machen, wurde eine Schwächung der Kapsidstruktur, einer Art „Permeabilisierung“, nach (Kann *et al.*, 1999) durchgeführt. Für eine spätere Verwendung von 1 μ g behandelte Kapside wurden 10 μ g Corepartikel „permeabilisiert“. Corepartikel, die üblicherweise in TN-300 Puffer gelagert wurden, wurden durch eine 1:10 Verdünnung mit Wasser schlagartig von Hochsalz- (300 mM NaCl) auf Niedrigsalzbedingungen (30 mM NaCl) gebracht und für 30 min bei 37°C inkubiert. 2 μ g „permeabilisierte“ Corepartikel wurden dem Reaktionsansatz entnommen und in der nachfolgenden Kinasereaktion eingesetzt.

4.7.3. Analyse der SRPK 1 *in vitro* Kinaseaktivität

Die Analyse der *in vitro* Kinaseaktivität der gereinigten SRPK 1 an HBV Partikeln erfolgte nach Adaption an verschiedene Protokolle zur Phosphorylierung (Kann und Gerlich, 1994; Kann *et al.*, 1999; Kann *et al.*, 1993), (Daub *et al.*, 2002) und J. P. Kreivi, (persönliche Kommunikation). Bei allen durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungen wurden je 2 μ g Coreprotein eingesetzt. Um die optimale Konzentration an aktiver SRPK 1 zu ermitteln, wurden in einem Vorversuch verschiedene Konzentrationen der Kinase (0,17 μ g, 0,85 μ g, 1,7 μ g) mit je 2 μ g Coreprotein verwendet. In späteren Versuchen wurden jeweils 0,17 μ g SRPK1 in jeder Reaktion eingesetzt.

Die Proteinproben wurden mit Kinase-Reaktionspuffer (siehe Tabelle 28) gemischt, für 30 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 4x SDS-

Probenpuffer gestoppt. Jeweils 1 µg Coreprotein wurde dann nach Aufkochen der Proben für 5 min bei 100°C auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, wobei der Gellauf beendet wurde, wenn die Blaufront den unteren Gelrand erreicht hatte, da sich dort der größte Anteil an nicht-eingebauten Nukleotiden befand. Das SDS-Gel wurde für 1 h bei 80°C auf dem Vakuumtrockner getrocknet und die Signale mit dem Phospho-Imager System analysiert. Alternativ wurden die Reaktionen am Ende der Kinasierung mit 6x DNA Probenpuffer versetzt und auf einem nativen 1 % TAE-Agarosegel für mindestens 2 h bei 80V aufgetrennt. Das Agarosegel wurde wie in 4.4.4 beschrieben mit einem Skalpell getrimmt und die Proteine entweder für mindestens 4 h oder ÜN mit TN-300 auf eine PVDF Membran transferiert. Die Coreproteine wurden entweder direkt von der Membran im Phospho-Imager System detektiert oder immunologisch nachgewiesen.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Kinase-Reaktionspuffers zur *in vitro* Phosphorylierung von HBV Coreprotein Varianten.

Kinase-Reaktionspuffer	10 mM MgCl ₂ ; 50 mM HEPES pH 7,6; 150 mM NaCl; 50 µM ATP; 1 µCi γ ³² P-ATP
------------------------	---

4.7.4. Dephosphorylierung durch CIAP und Alkaline Phosphatase

Mithilfe verschiedener Phosphatasen wurde untersucht, ob es sich bei der *in vitro* Phosphorylierung von Coreproteinen durch SRPK 1 um eine reversible Reaktion handelte. Zu den in 2.7.2 phosphorylierten Proben wurden anschließend direkt zum Reaktionsansatz 40 U Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP; NEB) bzw. 0,47 U Alkalische Phosphatase aus *E. coli* (#P4252, Suspension in 2,5 M (NH₄)₂SO₄; Sigma) zugegeben und für 30 min bei 30°C bzw. ÜN bei 37°C inkubiert. Jeweils 1 µg Probe wurde auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet, und im Phospho-Imager System analysiert. Der zweite Teil des Reaktionsansatzes wurde auf einem nativen 1 % TAE-Agarosegel aufgetragen und nach dem Lauf durch Kapillartransfer auf eine PVDF Membran geblottet. Diese wurde zuerst direkt im Phospho-Imager System analysiert, anschließend wurden die Coreproteine auf der Membran immunologisch detektiert.

4.7.5. „Autophosphorylierung“ bei Koexpression von SRPK 1

Um die Phosphorylierungsaktivität von in *E. coli* (BL21*cp) koexprimierter Kinase SRPK 1 bei Koexpression von HBV Coreproteinen zu untersuchen, wurden die

gemeinsam exprimierten Proteine unter Zugabe des Phosphatase-Inhibitors β -Phosphoglycerat [10 mM] wie in 4.4.2 beschrieben isoliert. Das klare Lysat wurde über einen analytischen Sucrosegradienten aufgetrennt und in 14 Fraktionen geerntet. Je 8 μ l der Sucrosefraktionen wurde in einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine wurden durch Coomassie Blau detektiert. Von den Mittelfraktionen des Gradienten wurden je 10 μ l auf ein natives Agarosegel aufgetragen. Nach Betrachtung des Laufverhaltens unter UV Licht wurden die Coreproteine durch Coomassie Färbung detektiert. Fraktionen, die das gesuchte Coreprotein und die eventuell mit isolierte Kinase in der größten Konzentration enthielten, wurden vereinigt und ÜN gegen TN-300 dialysiert. Das Dialysat wurde durch Ultrafiltration (MWCO 10 kDa) konzentriert. 2 μ g des Konzentrates wurden direkt oder nach „Permeabilisierung“ (vergleiche 4.7.2) für 15 min bei 40°C im "Autophosphorylierungs-Assay" eingesetzt. Den Reaktionsansätzen wurden nur die Substrate γ -³²P-ATP und ATP, aber keine zusätzliche Kinase zugegeben. 1 μ g Coreprotein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt, im Phospho-Imager analysiert und anschließend Coomassie gefärbt. Der zweite Teil des Reaktionsansatzes wurde auf einem 1 % TAE-Gel aufgetrennt, mit Kapillartransfer auf einen PVDF Membran geblottet und sowohl direkt im Phospho-Imager als auch immunologisch detektiert.

5. Ergebnisse

5.1. Herstellung von HBV Corefusionsproteinen für hochauflösende Strukturanalysen

Mit dem 238 AA langen GFP als Modellprotein mit bekannter Struktur konnte gezeigt werden, dass die Insertion eines vollständigen Proteins in das c/e1 Epitop des verkürzten HBV Coreproteins unter Erhalt der Partikelbildungsfähigkeit grundsätzlich möglich ist (Kratz *et al.*, 1999). Sterische Behinderungen durch das Insert wurden in dem verwendeten Konstrukt durch lange und flexible Linkersequenzen auf beiden Seiten des GFP Proteins vermieden. In Abbildung 5-1 ist das Modell einer GFP-Insertion in die antigene Schleife des Coreproteins unter Berücksichtigung der Größenverhältnisse beider Proteinuntereinheiten dargestellt. Durch die Bildung von grün fluoreszierenden Partikeln ließ sich direkt nachweisen, dass sich alle beteiligten Proteindomänen unabhängig voneinander falten konnten. In den Strukturanalysen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildrekonstruktion konnte aber die bekannte „Tonnen“-Struktur der GFP-Domänen nicht aufgelöst werden. Mögliche Ursachen lagen z.B. in der nicht ausreichend starren Fixierung der GFP-Domänen durch die langen und flexiblen Linkersequenzen. Sie gestattete dem Insert, an räumlich unterschiedlichen Orten über dem Träger ausgerichtet zu werden. Außerdem wies die nach der Herstellung dieses Core-GFP Konstrukts veröffentlichte Röntgenstrukturanalyse des HBV Coreproteins (Wynne *et al.*, 1999a) darauf hin, dass das immundominante c/e1 Epitop möglicherweise die Aminosäurereste AS 77/ 78 und nicht wie bisher angenommen den Bereich AS 79/ 80 umfassen könnte (Conway *et al.*, 1998a). Eine Insertion in AS 79/80 hätte demnach zur Folge, dass sich das Fremdprotein nicht wie gewünscht auf der Spitze der Spikes befinden würde, sondern zur Seite geneigt wäre. Um eine bessere Auflösung der GFP-Struktur zu erzielen, schien eine möglichst starre und/oder kurze Verbindung der Fremdproteine mit dem Träger (Coreprotein) notwendig zu sein. Der erste Teil des in dieser Arbeit durchgeführten Projektes „Strukturuntersuchungen von HBV Corefusionsproteinen“ nutzte weiterhin GFP als Modell für ein Fremdprotein. Der Vorteil von GFP lag erstens in der bekannten Struktur des Proteins (Ormö *et al.*, 1996), zweitens konnte über die Ausbildung des Chromophors das exprimierte Corefusionsprotein nicht nur einfach detektiert, sondern auch eine erste Aussage

über die native Faltung des Proteins gemacht werden. Um für GFP die angestrebte Auflösung der Struktur durch Kryo-Elektronenmikroskopie, Erstellung von dreidimensionalen Dichtekarten und computerunterstützter Bildrekonstruktion zu erzielen, umfasste das Projekt zunächst die Modifikation der Linkersequenzen und die Veränderung des Insertionsortes der GFP-Domänen auf der Kapsidoberfläche.

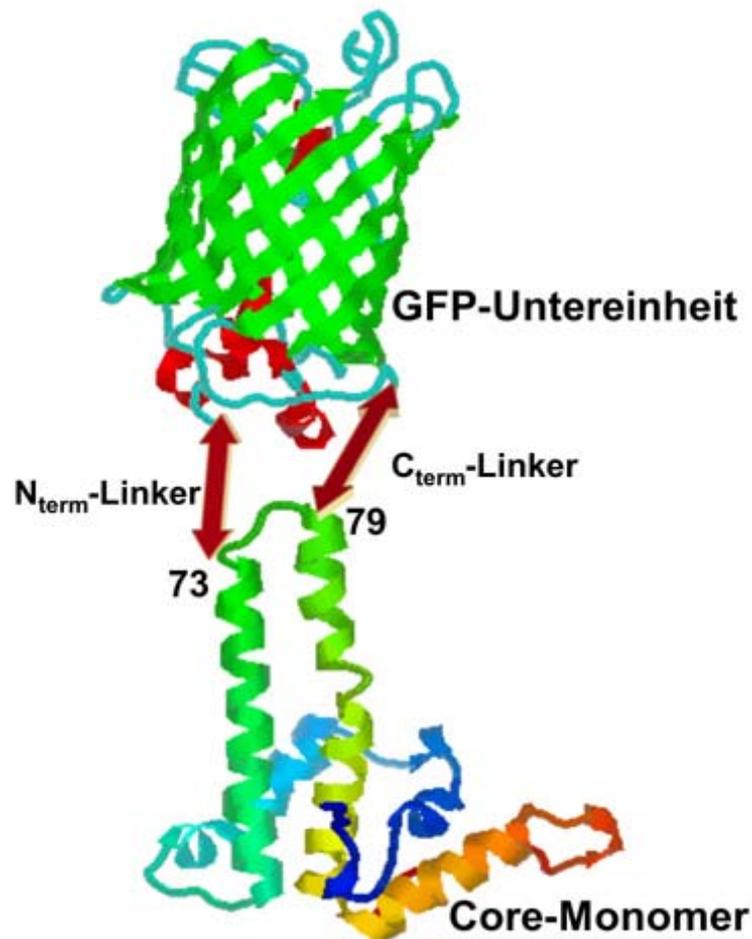


Abbildung 5-1: Modell der GFP-Insertion in die antigene Schleife des Coreproteins. Zu sehen sind die Kristallstrukturen einer GFP-Untereinheit (Ormö *et al.*, 1996) und eines Core Monomers (Wynne *et al.*, 1999a). In ein Monomer des Coreproteins wird zwischen die Helices α_3 und α_4 (vergleiche Abbildung 2-5) in das c/e1 Epitop eine GFP-Untereinheit inseriert. Die Aminosäurereste des N-terminalen und des C-terminalen Linkers als Übergang zwischen dem Coreprotein und GFP sind schematisch als Pfeile dargestellt.

Da für eine hochauflösende elektronenmikroskopische Analytik hoch konzentrierte Lösungen mit möglichst reinen und einheitlichen Partikeln zur Verfügung stehen mussten, war zudem eine Optimierung der Expressions-, Reinigungs- und Konzentrierungsverfahren erforderlich. Nach deren Etablierung sollten mittels biochemischer Charakterisierung, vorwiegend durch Sedimentation in

Sucrosegradienten und durch native Agarose Gelelektrophorese, die am besten geeigneten Varianten des Core-GFP Fusionsproteine identifiziert werden. Diese würden dann auf ihre Eignung für hochauflösende Strukturuntersuchungen durch negativ Kontrastierung im Elektronenmikroskop überprüft werden. Letztlich sollte in Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Böttcher am EMBL in Heidelberg eine Auswertung der Proben mittels Kryo-Elektronenmikroskopie und die Erstellung von dreidimensionalen Dichtekarten erfolgen.

5.1.1. Klonierung der HBV Core-GFP Konstrukte

Als ursprünglicher Insertionsort für die GFP Einheiten wurde von Kratz *et al.* der c/e1-Antigenloop gewählt. Die Insertion erfolgte zwischen den Aminosäureresten D78 und S81 bei gleichzeitiger Deletion von P79 und A80 unter Verwendung einer sehr langen und flexiblen Linkersequenz: Asp78-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-GFP-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser81 (Kratz *et al.*, 1999).

Durch PCR mit geeigneten Primern (vergleiche 4.1.3) und Klonierung wurden die in Tabelle 29 aufgeführten Core-GFP-Fusionsprotein Konstrukte hergestellt. Die Linkersequenzen waren entweder sukzessive verkürzt worden oder der Insertionsort war um eine Aminosäure in Richtung N-Terminus verschoben worden, sodass er zwischen den Aminosäureresten 77/ 78 lag. Alternativ wurden beide Veränderungen gleichzeitig vorgenommen.

Anfangs wurden die Konstrukte in den Expressionsvektor pPL (Invitrogen) kloniert, später wurden alle Varianten in den pET28-Expressionsvektor umklont. Von einer Auswahl der Konstrukte wurden zusätzlich Varianten mit einem C-terminalen His₆-Peptid hergestellt. Tabelle 29 am Ende des Abschnitts enthält eine Übersicht über alle hergestellten HBV Core-GFP Fusionsprotein Varianten in dieser Arbeit.

Die Optimierung der Expression, der nachfolgende Zellaufschluss, die Reinigung der Corefusionsproteine, die Begutachtung der Proben im Elektronenmikroskop und die abschließende Analyse durch Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung stellten sich als ein sehr langwieriger Prozess heraus. Daher wurde eine Selektion innerhalb der großen Anzahl zur Verfügung stehenden Konstrukte durchgeführt, um den Umfang der weiteren Untersuchungen zu begrenzen.

Tabelle 29: Beschreibung aller durch Klonierung hergestellten HBV Core-GFP Fusionsprotein Varianten.

Nr.	Beschreibung des Linkers +des Insertionsorts	pPL-Vektor	pET-Vektor	His ₆ -Peptid Version
1	N _{term} -L76-Gly ₄ SerGly ₄ -GFP-Gly ₄ SerGly ₄ -P79-C _{term} (Δ77/78)	√	√	-
2	N _{term} -L76-Gly ₄ SerGly ₄ -GFP-Gly ₄ SerGly ₄ -S81-C _{term} (Δ77-80)	√	√	-
3	N _{term} -E77-Gly ₄ SerGly ₄ -GFP-Gly ₄ SerGly ₄ -D78-C _{term} (Keine Deletion)	√	√	-
4	N _{term} -D78-Gly ₄ -GFP-Gly ₄ -S81-C _{term} (Δ79/80)	√	√	√
5	N _{term} -L76-Gly ₄ -GFP-Gly ₄ -P79-C _{term} Δ77/78	√	√	-
6	N _{term} -D78-Gly-GFP-Gly-S81-C _{term} (Δ79/80)	√	√	√
7	N _{term} -L76-Gly-GFP-Gly-P79-C _{term} Δ77/78	√	√	√
8	N _{term} -D78-Gly ₄ -GFP-Gly-S81-C _{term} (Δ79/80)	√	√	-
9	N _{term} -L76-Gly ₄ -GFP-Gly-P79-C _{term} Δ77/78	√	√	-
10	N _{term} -D78-Gly-GFP-Gly ₄ -S81-C _{term} (Δ79/80)	√	√	√
11	N _{term} -L76-Gly-GFP-Gly ₄ -P79-C _{term} Δ77/78	√	√	√

Abbildung 5-2 zeigt beispielhaft die Insertion von GFP in das c/e1 Epitop unter Verwendung eines Linkers, der auf vier Glycinreste zu beiden Seiten von GFP verkürzt wurde.

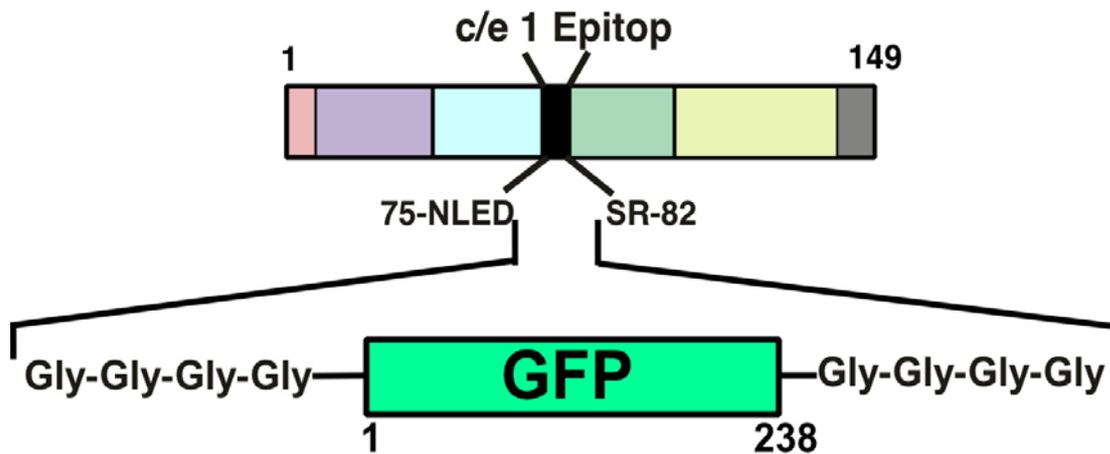


Abbildung 5-2: Schematische Primärsequenz der Core-GFP-Fusionen am Beispiel der GFP Insertion in das c/e1 Epitop des verkürzten Coreproteins HBc1-149 mit einem 4 Glycin-Linker. Die Coreprotein Aminosäure Pro 79 und Ala 80 wurden deletiert und durch das Insert GFP ersetzt, welches N- und C-terminal über vier Glycinreste mit dem Coreprotein verbunden ist (vergleiche Tabelle 29; Nr. 4).

5.1.2. Herstellung von HBV Core-GFP Fusionsproteinen im pPL-System

Alle pPL-Vektorkonstrukte wurden exprimiert und die Bakterienzellen mit den in 4.4.1.1 (Ultraschall) bzw. 4.4.1.2 (French Press) beschriebenen Methoden der Proteinreinigung aufgeschlossen. Leider unterlag die Expression der pPL-Konstrukte sehr starken Schwankungen. Beispielsweise konnte bei einem Zellaufschluss durch French Press in der Analyse der Sucrosegradientfraktionen durch SDS-PAGE gezeigt werden, dass sich in den einzelnen Fraktionen eine kaum mit Coomassie Blau anfärbbare Menge an Fusionsprotein befand (Nachweisgrenze: ca. 100 ng/Spur). Die anschließend durchgeführte Bestimmung der Proteinkonzentration zeigte dann auch, dass nur eine Ausbeute von ca. 500 µg Gesamtprotein in dieser Reinigung erzielt wurde. Andere Reinigungen brachten noch geringere Ausbeuten. Auch durch eine anschließende Ammoniumsulfatfällung konnte die Konzentration nicht weiter erhöht werden. Versuche bei vielversprechenden Proben, die eine gute Verteilung im Sucrosegradienten wie in Abbildung 4-1 gezeigt hatten, durch Ultrafiltration auf eine Endkonzentration von mindestens 3 - 5 mg/ml einzuengen, scheiterten. Vermutlich führte die unspezifische Adsorption der Proteine an die Ultrafiltrationsmembranen der verwendeten Centricon Säulen und die Aggregation der teilweise konzentrierten Proben zu hohen Verlusten. Das Ergebnis eines typischen Sucrosegradienten nach Expression eines pPL-Konstrukts ist in Abbildung 5-3 gezeigt.

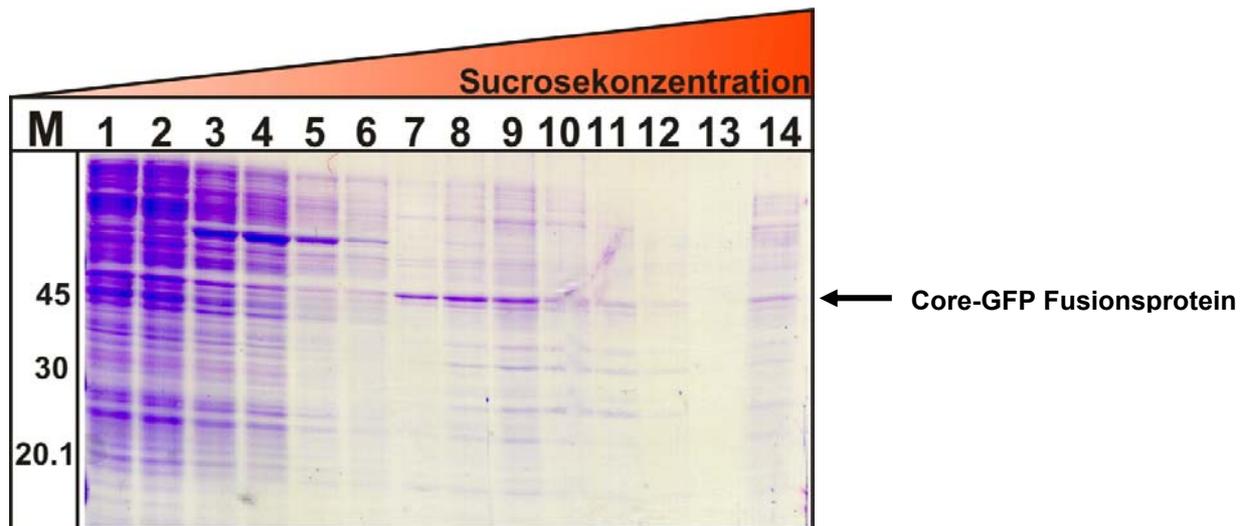


Abbildung 5-3: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit eines chimären HBC Core-GFP-Fusionsproteins durch das Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten. Auf den Sucrosegradienten wurde das Bakterienlysat des Konstruktes pPLCHBc149-c/e1- Δ 77/78-4GS4G-GFP-4GS4G (Nr. 1; Tabelle 29) aufgetragen und nach Zentrifugation in 14 gleich große Fraktionen aliquotiert. Je 10 μ l jeder Fraktion wurde auf einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Blaufärbung detektiert. Die von oben nach unten zunehmende Sucrosekonzentration im Gradienten ist wie in Abbildung 2-1 durch den Farbverlauf von hell-orange nach dunkel-orange veranschaulicht. Eine schwache Anreicherung der Core-GFP Fusionsproteine mit einer Größe von ca. 46 kDa (siehe Pfeil) ist in den Fraktionen 7 - 9 nachweisbar. M: Proteinmarker low.

5.1.3. Herstellung von HBV Core-GFP Fusionsproteinen im pET-System

Um eine höhere Expression zu erzielen, wurden die Konstrukte in einen pET28-Expressionsvektor umklontiert. Hier erfolgt die Proteinexpression unter Kontrolle des lac T7-Promoters, der eine sehr viel höhere Ausbeute verspricht. Wie erwartet zeigte sich, dass bei den Proteinreinigungen der BL21 (und Derivate) Expressionszellen eine höhere Ausbeute an Corefusionsprotein erzielt werden konnte. Leider ließ sich aber das bisher verwendete Reinigungsprotokoll nur begrenzt auf die neuen *E. coli* Expressionszellen übertragen. Besonders die Dauer und Anzahl der Impulse bei der Ultraschallbehandlung schien nicht für die Zellen geeignet zu sein. Bei der bisher gewählten Einstellung der Ausgangsleistung von 65 % und den durchgeführten 10 Impulsen stellte sich heraus, dass ein sehr hoher Anteil an bakteriellen Membranproteinen aus den Zellen herausgelöst wurde, welcher die Proteinreinigung stark kontaminierte. Diese Kontaminationen verhinderten vermutlich eine stabile Partikelbildung, was sich in den durchgeführten Sucrosegradienten widerspiegelte. Es schien möglich, dass die Membranproteine in der Lage dazu waren direkt die Corefusionsproteine zu binden, da sie sich sehr häufig auf der gleichen Höhe des

Sucrosegradienten in einer Bande anreicherten. Die Auftrennung der Corefusionsproteine im Gradienten zeigte daher nie die optimale Verteilung, sondern verlief fast durchgehend als "Schmier" über den ganzen Gradienten. Zudem befand sich ein sehr großer Anteil der Proteine als unlösliche Fraktion im Bakterienpellet. Für diese Konstrukte konnte kein optimales Reinigungsprotokoll gefunden werden. Das Sedimentationsverhalten und das Problem der mit gereinigten Membranproteine eines exprimierten pET28-Konstrukts im Sucrosegradienten ist in Abbildung 5-4 dargestellt.

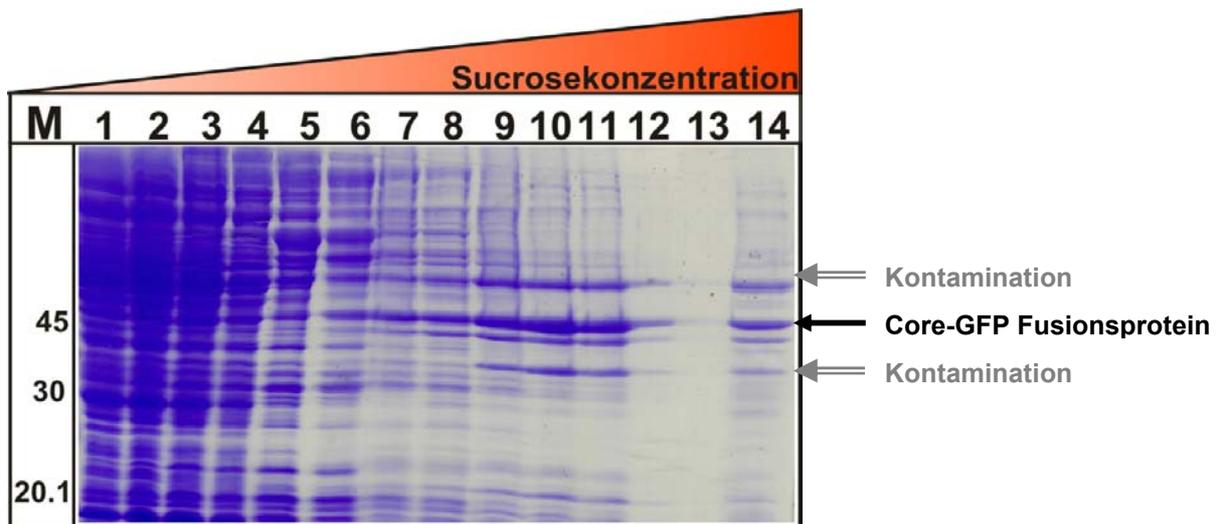


Abbildung 5-4: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit eines chimären HBc Core-GFP-Fusionsproteins durch das Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten. Auf den Sucrosegradienten wurde das Bakterienlysat des Konstruktes pET28HBc149-c/e1- Δ 79/80-4Gly-GFP-4Gly (Nr. 4; Tabelle 29) aufgetragen und nach Zentrifugation in 14 gleich große Fraktionen aliquotiert. Je 10 μ l jeder Fraktion wurde auf einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Blaufärbung detektiert. Die von oben nach unten zunehmende Sucrosekonzentration im Gradienten ist wie in Abbildung 2-1 durch den Farbverlauf von hell-orange nach dunkel-orange veranschaulicht. Das Core-GFP Fusionsprotein (schwarzer Pfeil) mit einer Größe von ca. 46 kDa ist über die Fraktionen 6 - 11 verteilt; kontaminierende Proteine (graue Pfeile) mit ca. 30 kDa bzw. 55 kDa sind zusammen mit dem GFP-Fusionsprotein in den Fraktionen 9 - 11 angereichert. M: Proteinmarker low.

Erst eine weitere Umklonierung der Konstrukte in den Expressionsvektor pET28amp2 brachte Erfolge bei der Proteinreinigung. Das HBV Gen wurde so in den Vektor hinein kloniert, dass die exprimierten Gene ein C-terminal fusioniertes His₆-Peptid erhielten. Ursprünglich wurde diese Strategie durchgeführt, um eine Reinigung der Corefusionsproteine mittels Nickelsäule zu ermöglichen. Durch das zusätzliche His₆-Peptid wurde auch die Löslichkeit der Proteine erhöht, was sich positiv auf die Ausbeute der Proteine auswirkte. Durch die Zugabe der Nuklease

Benzonase nach Lyse der Bakterienzellen wurde der Anteil der freien Nukleinsäuren im Lysat drastisch gesenkt. Die dadurch verringerte Viskosität der Lösung ermöglichte es, die nachfolgende Behandlung im Ultraschall zu verkürzen, wodurch der Anteil der kontaminierenden Membranproteine verringert wurde. Zudem konnte bei einem Zellaufschluss unter Niedrigsalz Bedingungen (50 mM NaCl) eine verminderte Assoziation mit den kontaminierenden *E. coli* Proteinen beobachtet werden. Erst nach erfolgtem Aufschluss der Zellen wurde durch Überführung der Corefusionsproteine in eine Hochsalzumgebung (300 mM NaCl) die Assemblierung zu Partikeln gefördert. Zusätzlich wurde das Protokoll zum Aufschluss der Proben durch Ultraschall weiter optimiert. Die Ultraschallbehandlung wurde bei verminderter Ausgangsleistung (55 %) und mit gut gekühlten Glasgefäßen durchgeführt, was sich in einem höheren Anteil an intakten, assemblierungsfähigen Coreproteinen niederschlug. Die so aufgearbeiteten Proteinproben zeigten dann eine sehr gute Auftrennung im Sucrosegradienten. Im oberen Teil des Gradienten befand sich nur noch ein geringer Anteil an nicht-assemblierten Coreproteinen, der Hauptanteil wurde wie erhofft in den Fraktionen 7 - 9 angereichert. Das Ergebnis einer optimalen Proteinexpression, Reinigung und Analyse in Sucrosegradienten ist in Abbildung 5-5 dargestellt.

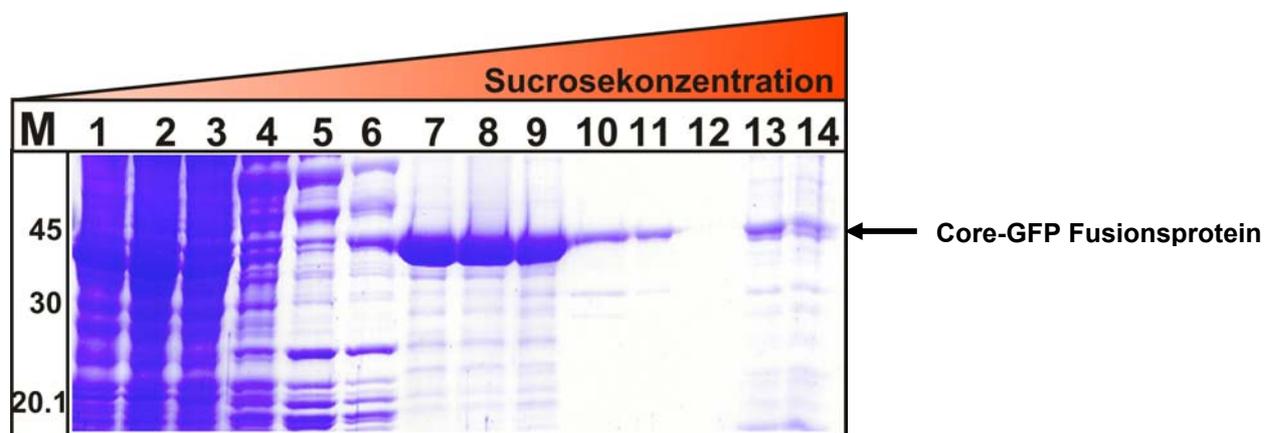


Abbildung 5-5: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit eines chimären HBC Core-GFP-Fusionsproteins nach Optimierung der Expressions- und Reinigungsbedingungen im Sucrosegradienten. Auf den Sucrosegradienten wurde das Bakterienlysat des Konstruktes pETamp2-HBc149-c/e1- Δ 79/80-GFP-1Gly/1Gly-H₆ aufgetragen und nach Zentrifugation in 14 gleich große Fraktionen aliquotiert. Je 5 μ l jeder Fraktion wurde auf einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Blaufärbung detektiert. Die von oben nach unten zunehmende Sucrosekonzentration im Gradienten ist wie in Abbildung 2-1 durch den Farbverlauf von hell-orange nach dunkel-orange veranschaulicht. Eine optimale Anreicherung der Core-GFP Fusionsproteine (siehe Pfeil) mit einer Größe von ca. 46 kDa ist in den Fraktionen 7 - 9 nachweisbar. M: Proteinmarker low.

Das erste Konstrukt pET28-amp2-HBc149-c/e1- Δ 79/80-GFP-4Gly/4Gly-H₆ (kurz HBc149-GFP-4Gly), welches für weiterführende Untersuchungen ausgewählt wurde, enthält eine auf je 4 Glycinreste (N-terminal und C-terminal) verkürzte Linkersequenz: D78-(Gly)₄-GFP-(Gly)₄-S81 (siehe Tabelle 29 in 5.1.1: Nr. 4) Diese Insertion ist schematisch in Abbildung 5-2 dargestellt. Der Insertionsort für GFP befand sich in diesem Konstrukt unverändert im c/e1 Epitop zwischen den Aminosäureresten P79/ A80. Diese Variante wurde gut exprimiert und zeigte bei der nachfolgenden Reinigung eine sehr gute Effizienz in der Partikelbildung. Von diesem Konstrukt konnten über die in 4.4.2 beschriebene Reinigungsmethode durch Ultraschall und nachfolgende Einkonzentrierung eine Probe mit einer Endkonzentration von ca. 7 mg/ml hergestellt werden. Diese Probe wurde mit 2 % Uranylazetat negativ kontrastiert und am EM 400/Philips begutachtet. Die angefertigten Bilder, wie das Beispiel in Abbildung 5-6 zeigt, dass die Probe sowohl in ausreichender Reinheit als auch in hoher Konzentration vorlag.

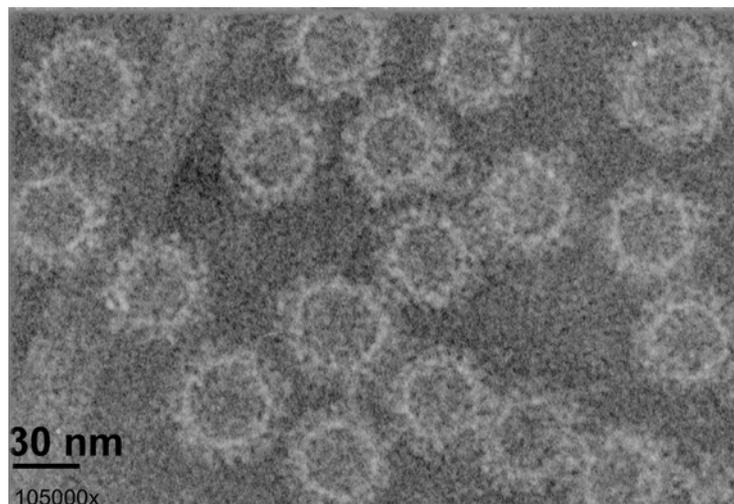


Abbildung 5-6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der verkürzten Coreprotein Variante pET28-amp2-HBc149-c/e1- Δ 79/80-GFP-4Gly/ 4Gly-H₆ mit einer Insertion von GFP in das zentrale c/e1 Epitop. Die durch Sucrosegradient gereinigte Probe wurde mit 2 % Uranylazetat negativ kontrastiert und bei einer Vergrößerung von 105000x aufgenommen, um den äußeren Ring der GFP-Einheiten besser darstellen zu können. Die Aufnahme wurde invertiert, d.h. die mit Uranylazetat kontrastierten Proteine erscheinen hell auf dunklem, weniger kontrastierten Untergrund. Der eingezeichnete Balken in der Aufnahme entspricht 30 nm.

Diese Probe wurde für weitere kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen und für die nachfolgende Bildverarbeitungen an das EMBL, Heidelberg geschickt. Die Probe

enthielt eine Mischpopulation aus $T = 3$ und $T = 4$ Partikeln. Abbildung 5-7 zeigt eine Übersichtsaufnahme der kryo-elektronenmikroskopischen Probe, in der die unterschiedlich großen Partikel mit unterschiedlich farbigen Kreisen markiert wurden. Da aber nur Partikel gleicher Triangulationszahl, d.h. einer Größe bei der Bildverarbeitung für eine Rekonstruktion verwendet werden können, mussten die Partikel dieser Mischpopulation vor der Verarbeitung erst einer Klasse zugeordnet werden. Leider konnte diese Zuordnung nicht durch die automatische Klassifizierung des verwendeten Bildverarbeitungsprogramms gemacht werden.

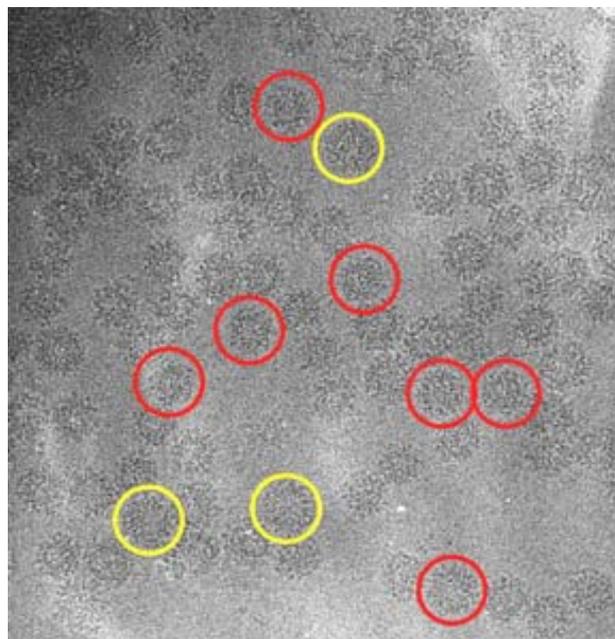


Abbildung 5-7: Kryo-elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme. Die gereinigte Probe enthält eine Mischung unterschiedlicher Partikelgrößen. Die durch Sucrosegradient gereinigte Probe wurde entzuckert, konzentriert und schockgefroren. In der Aufnahme wurden große Partikel mit gelben, kleine Partikel mit roten Kreisen markiert (Daten B. Böttcher; EMBL).

Obwohl auch eine Sortierung per Auge zu sehr vielen Fehlzuordnungen führen kann, wurden möglichst viele identische kleine Partikel aussortiert und einer Bildverarbeitung unterzogen. Danach wurden die „größeren“ Partikel aussortiert und getrennt ausgewertet.

Alle nachfolgenden Daten und die daraus resultierenden Abbildungen wurden von PD. Dr. Bettina Böttcher am EMBL, Heidelberg erstellt.

In Abbildung 5-8 ist als Ergebnis der Summenbilder die Dichteverteilung im äquatorialen Schnitt durch die Partikel gezeigt. Die Auswertung erfolgte im Vergleich

mit $T = 3$ Partikeln des Wildtype Coreproteins HBc183 ohne GFP Insert, da die entsprechende verkürzte Coreprotein Variante HBc149 keine ausreichende Anzahl kleiner $T = 3$ Teilchen für eine Auswertung liefert. Der im Inneren deutlich sichtbare Ring im rechten Bild entspricht der Core-Schale, der Oberfläche der Partikel, welche die typischen Poren aufweist. Deutlich sind die Coreprotein Dimere, welche die Spikes auf der Oberfläche bilden, zu erkennen. Im Vergleich dazu ist im linken Bild ein klar umgrenzter innerer Dichtring nur schwer erkennbar.

Äquatoriale Schnitte $T = 3$ Partikel

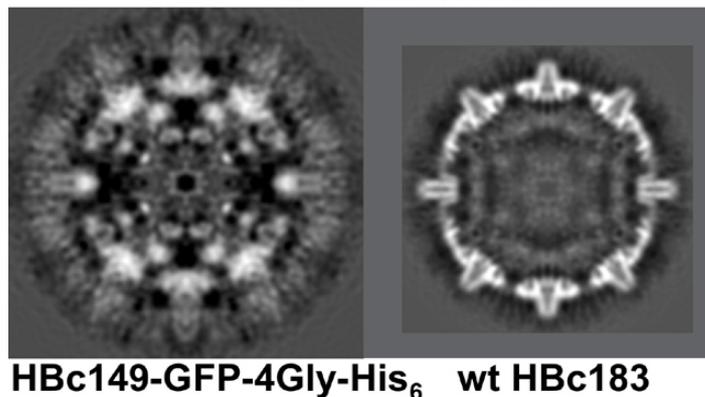


Abbildung 5-8: Äquatoriale Dichteverteilung in Partikeln mit Triangulationszahl $T = 3$. Die Abbildung rechts zeigt den hellen Dichtring der Core-Schale des Wildtyps HBc183. Die linke Abbildung zeigt die Anordnung verschiedener elektronendichter Bereiche der HBc149-GFP-4Gly-H₆ Variante.

Die Spitzen der Spikes sind verschwommen, d.h. die Auflösung in diesem Bereich ist sehr begrenzt. Die Partikel haben insgesamt einen größeren Außendurchmesser, welcher durch die aufgesetzten GFP-Einheiten verursacht wird. Diese erzeugen einen zusätzlichen äußeren helleren Dichtring. Die Intensität des äußeren Bereichs ist im Vergleich zum inneren Ring stark abgeschwächt, d.h. für die GFP-Einheiten konnte keine hinreichende Auflösung erzielt werden. Auffallend ist zudem, dass im Inneren dieser Partikel weitere helle Dichtebereiche zu finden sind. Dies deutet auf höher geordnete Bereiche im Inneren hin, über deren Ursache(n) zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden kann.

Abbildung 5-9 zeigt die Auftragung der erhaltenen Elektronendichten in Abhängigkeit des Abstandes von der Partikelmittle der jeweiligen Partikel im direkten Vergleich. In

der Dichteverteilung liegt das Hauptmaximum der Insertionsvariante bei ca. 115 Å, das des Wildtyps bei ca. 125 - 130 Å. Das Maximum der Insertionsvariante liegt also auf einem geringeren Radius als das der unmodifizierten Corepartikel. Da aber der Vergleich nicht mit dem zugehörigen T = 3 Partikel der verkürzten Coreprotein Variante HBc149 gemacht wurde, sondern mit einem Dichteprofil von HBc183, lässt sich das Ergebnis nicht eindeutig interpretieren. Würde es sich um Varianten der gleichen C-terminalen Aminosäuresequenz handeln, könnte man davon ausgehen, dass die Core-Schale der Core-GFP Partikel gegenüber den Wildtyp-Partikeln weniger geordnet ist oder diese leicht geschrumpft ist.

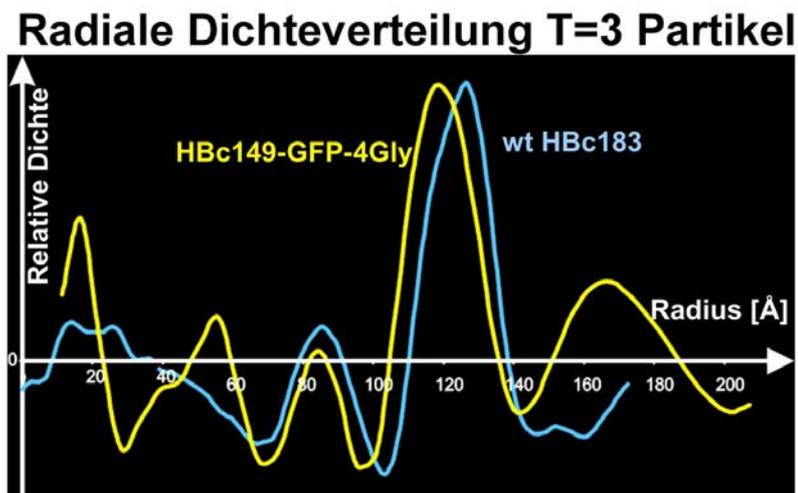


Abbildung 5-9: Auftragung der relativen Elektronendichte im Abhängigkeit vom Radius der Partikel mit Triangulationszahl $T = 3$. Aufgetragen wurden die Werte für die Core-GFP Insertionsvariante HBc149-GFP-4Gly-H₆ (gelb) im Vergleich zum Wildtyp HBc183 (blau). Die Insertionsvariante weist zwei kleinere elektronendichte Bereiche im Inneren der Partikel und einen größeren GFP-Dichtebereich (165 Å) außerhalb der Shell (120 Å) auf.

Die zusätzlichen innen liegenden elektronendichten Bereiche sind durch zwei weitere Maxima zwischen 10 - 22 Å und 45 - 60 Å dargestellt. Das entscheidende zusätzliche Elektronendichtemaximum der GFP-Anteile liegt bei ca. 165 Å, wodurch sich für die kleinen $T = 3$ Core-GFP Partikel ein durchschnittlicher Durchmesser von 33 nm bis 36 nm ergeben würde.

Anhand dieser Daten lässt sich die Verteilung der GFP-Einheiten auf der Partikeloberfläche angeben. Dabei werden ab einem bestimmten Radius außerhalb der Core-Schale die gemessenen Dichten den GFP-Einheiten zugewiesen und zur Veranschaulichung eingefärbt (hier orange). Abbildung 5-10 verdeutlicht die Lage

der GFP-Moleküle. Die extra Elektronendichten der GFP-Einheiten, hier als leicht dreieckige „Knubbel“ dargestellt, sind nicht wie erwartet genau über den Spikes des Partikels angeordnet, sondern über den lokalen dreifachen Symmetrieachsen. Aus symmetrischen Überlegungen wird in dieser Position je ein GFP-Molekül von einem Spike der zweifachen, der dreifachen und der fünffachen Symmetrieachse beigesteuert. Die hier dargestellte Dichte sollte daher aus einem GFP-Trimer gebildet werden. Es ist aber augenscheinlich, dass die gemessenen Dichten für drei GFP-Moleküle viel zu klein sind.

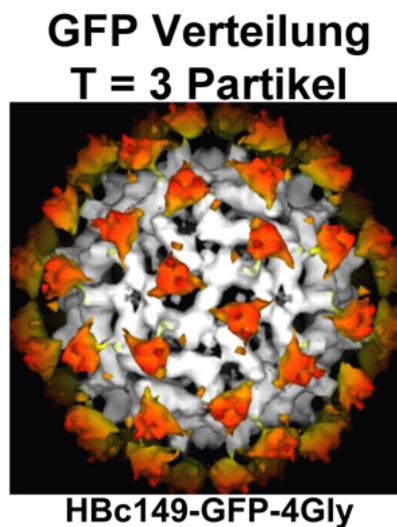


Abbildung 5-10: Rekonstruktion der GFP-Verteilung auf der Oberfläche der T = 3 Corepartikel. Die Masse der GFP-Einheiten ist orange eingefärbt. Zu sehen ist die Verteilung von GFP über dem Corepartikel (grau). Die Darstellung erfolgt in Aufsicht auf die zweifache Symmetrieebene. Die genaue Position der GFP-Einheiten auf den Dimeren ist nicht erkennbar.

Ein Einpassen des atomaren Modells von GFP in die beobachteten Elektronendichten ist das so genannte „Fitting“ nach Chacon und Wriggers (Situs 2.1: Colores (Chacon und Wriggers, 2002)). Das Einpassen sollte verdeutlichen, dass in die vorliegenden Elektronendichte-„Knubbel“ keine drei GFP-Moleküle eingepasst werden können. Abbildung 5-11 veranschaulicht, dass es zudem nicht möglich war, auch nach Variation der GFP-Orientierung, ein einzelnes GFP-Molekül einzupassen. Eine hochaufgelöste Darstellung des GFP war somit nicht möglich.

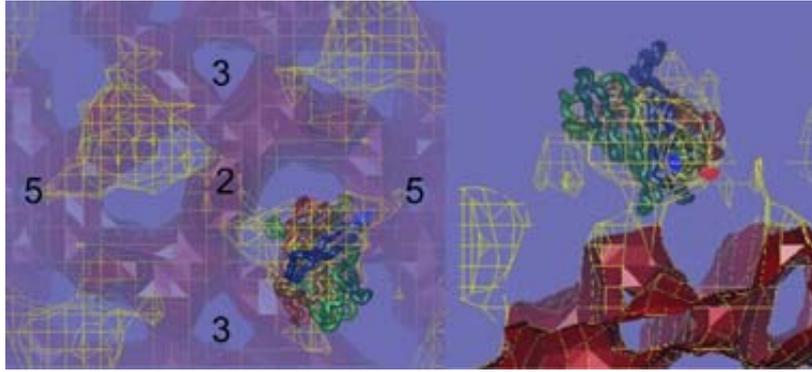


Abbildung 5-11: Die elektronendichte Masse über der $T = 3$ Partikelschale lässt sich nicht eindeutig zu GFP-Molekülen „fitten“. Die Darstellung links zeigt die äußere Elektronendichte der GFP-Einheiten entlang der lokalen dreifachen Symmetrieachsen als gelbes Netzwerk (links). Die zweifache bzw. die dreifachen und fünffachen Symmetrieachsen sind durch Zahlen markiert. Die seitliche Darstellung (rechts) veranschaulicht, dass weder drei noch ein einzelnes GFP-Molekül in gemessene Elektronendichte eingepasst werden kann.

Es deutete sich aber an, dass insbesondere die Spikes auf der zweifachen Symmetrieachse im Partikel verschoben sind. In der berechneten Rekonstruktion der Corepartikel Oberfläche in Abbildung 5-12 ist dargestellt, wie dieser Spiketyp gegenüber dem des Wildtyp drastisch verdreht ist. Die GFP-Dichte wurde in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. Aus der radialen Dichteabbildung wurde eine Rekonstruktion bis knapp über der Core-Schale berechnet. Da diese Berechnung stufenweise erfolgt, erscheinen die Spikes abgeschnitten.

Oberfläche der inneren Hülle T=3 Partikel

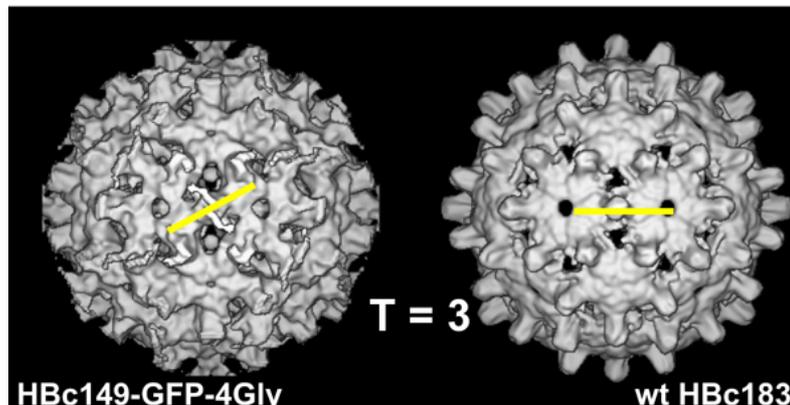


Abbildung 5-12: Rekonstruktion der Oberfläche der inneren Hülle der kleineren T = 3 Partikel. Die Abbildung zeigt die Core-Schale des Wildtyps HBc183 (rechts) und der HBc149-GFP-4Gly-H₆ Variante (links). Die Anordnung des Dimers auf der zweifachen Symmetrieachse des Icosaeders ist durch eine gelbe Linie symbolisiert. Dieser Typ von Dimer ist in der Insertionsvariante gegenüber dem des Wildtyps drastisch verdreht angeordnet.

Schematisch lässt sich diese Neuordnung dieses Dimer-Typs weiter verdeutlichen. In einem T = 3 Teilchen gibt es zwei Typen von Dimeren. In Abbildung 5-13 sind beide Typen durch nummerierte Ellipsen veranschaulicht. Die Ansicht erfolgt auf die dreifache Symmetrieachse. Der erste Typ (orange: 2) verbindet eine dreifache mit einer dreifachen Symmetrieachse. Der zweite Typ (beige: 5) verbindet die dreifache mit der fünffachen Symmetrieachse. Die Lage der Ellipsen veranschaulicht die Orientierung der Dimere. Die kleineren roten und blauen Kreise entsprechen den Linkerverbindungen von den GFP-Einheiten (große grüne Kreise) zu den Dimeren. Die obere Darstellung entspricht der beobachteten Dimer-Organisation von HBc183 bzw. der Umorganisation der HBc149-GFP-4Gly-H₆ Variante. Versucht man in diese die GFP-Trimer Elektronendichte sinnvoll einzupassen, ist dies ohne Verzerrung der Dimere bei HBc183 (unten rechts) in der lokalen dreifachen Symmetrieachse gut möglich. Durch das entsprechende zentrale Einpassen von GFP in der Variante (unten links) würde es zu der beschriebenen Verdrehung der Dimere an der zweifachen und eventuell auch an der fünffachen Symmetrieachse kommen.

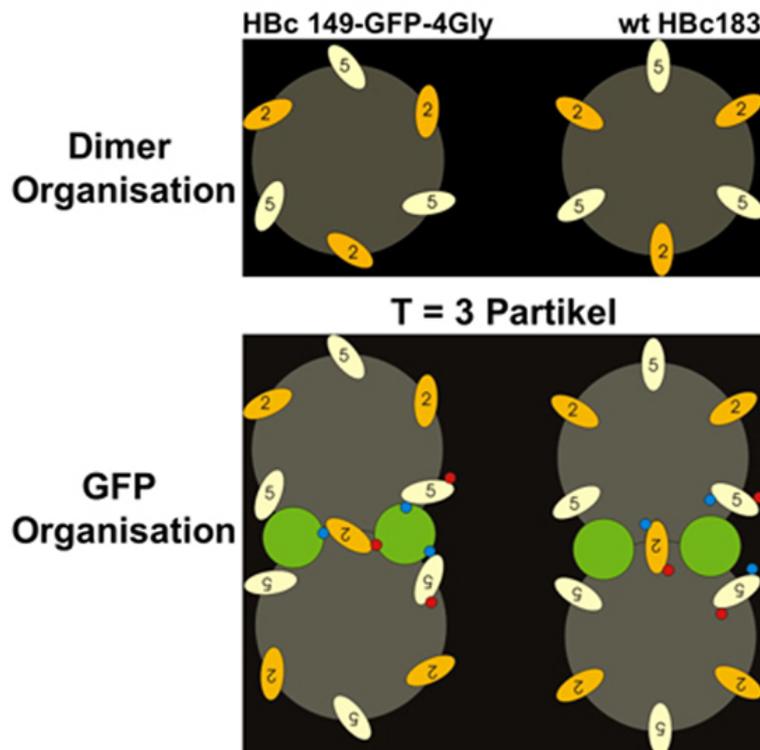


Abbildung 5-13: Die GFP-Insertion bewirkt eine Veränderung der Organisation des Dimers auf der zweifachen Symmetrieachse im Partikel. Die unterschiedlichen Dimer-Typen (siehe Text) sind durch Ovale schematisiert dargestellt und orange bzw. beige eingefärbt. Die grünen Kreise symbolisieren die GFP Einheiten, die über die Linker (kleine rote und blaue Kreise) mit den Dimeren verbunden werden.

Die Auswertung der Daten der größeren T = 4 Partikel ergab für die Struktur der Core-Schale und die Anordnung der Dimere abweichende Resultate. In Abbildung 5-14 ist wiederum als Ergebnis der Summenbilder die Dichteverteilung als äquatorialer Schnitt durch die Partikel angegeben. Die Auswertung erfolgte im Vergleich mit T = 4 Partikeln der Coreprotein Variante HBc149-H₆ ohne GFP-Insert.

Äquatoriale Schnitte T = 4 Partikel

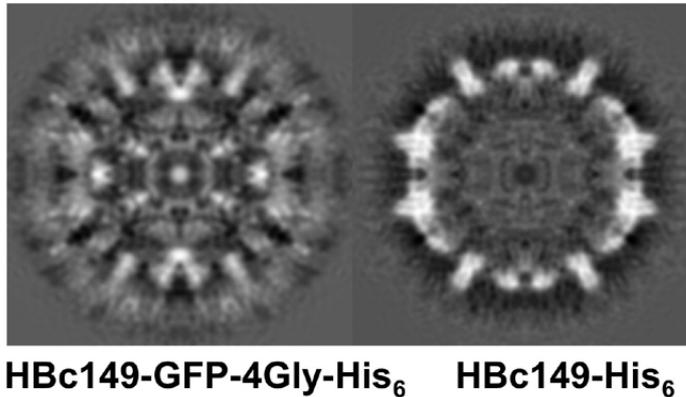


Abbildung 5-14: Äquatoriale Dichteverteilung in Partikeln mit Triangulationszahl $T = 4$. Die Abbildung rechts zeigt den hellen Dichtring der Core-Schale der C-terminal verkürzten Variante HBc149-H₆. Die linke Abbildung zeigt die Anordnung verschiedener elektronendichter Bereiche der HBc149-GFP-4Gly-H₆ Variante. Auffallend sind die vielen, wahrscheinlich geordneten Bereiche im Inneren der Partikel.

Im rechten Bild lässt sich bei dieser Variante ein heller Dichtring mit regelmäßig angeordneten Ausstülpungen erkennen. Dies entspricht der Masse der Corehülle mit den Spikes. Die Partikel im linken Bild haben wie schon die $T = 3$ Partikel einen vergrößerten Außendurchmesser. Ein klar umgrenzter innerer Dichtring ist auch hier nur schwer erkennbar, der zusätzliche äußeren Dichtring scheint aber etwas weniger diffus als bei den $T = 3$ Partikeln. Auffallend ist, dass der elektronendichte Bereich im Inneren der Partikel wieder sehr ausgeprägt ist. Die Helices der Spikes scheinen teilweise in das Innere der Partikel hineingezogen zu werden, sie erscheinen als V-förmige helle Dichte. Besonders der Boden des „V“ scheint einem tatsächlich geordneten Bereich zu entsprechen. Dieser könnte in der in der radialen Dichteverteilung (Abbildung 5-15) der lokalen „Dichte-Schulter“ bei ca. 110 Å entsprechen, die signifikant auftritt.

Abbildung 5-15 zeigt die Auftragung der erhaltenen Elektronendichten der jeweiligen Partikel im direkten Vergleich. Die Darstellung verdeutlicht, dass in der Dichteverteilung das Hauptmaximum der Insertionsvariante gegen das der unmodifizierten Partikel zu einem geringeren Radius hin verschoben ist. Dies würde wiederum für eine „Schrumpfung“ der inneren Core-Schale der Core-GFP Varianten sprechen, wie schon bei den $T = 3$ Partikeln angedeutet wurde. Die Auswertung der zum Vergleich herangezogenen HBc149-H₆ Partikel wurde am gleichen Mikroskop

wie die der Varianten gemacht. Dadurch kann der Schrumpfung auch mehr Bedeutung beigemessen werden als bei den kleinen Partikel in Abbildung 5-9. Die zusätzlichen innen liegenden elektronendichten Bereiche sind durch zwei weitere kleine Maxima zwischen 30 - 40 Å und 65 - 80 Å dargestellt. Das Maximum der Elektronendichte der GFP-Anteile liegt bei ca. 180 Å, wodurch sich für die großen Partikel ein durchschnittlicher Durchmesser von 36 nm bis 40 nm ergeben würde.

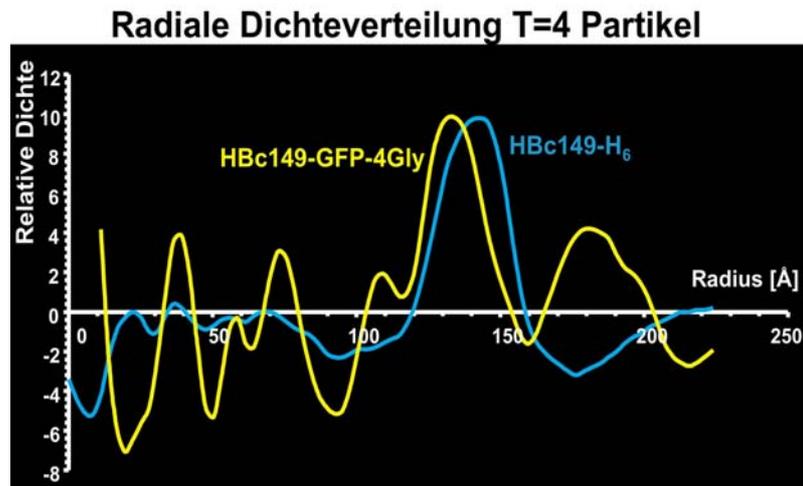


Abbildung 5-15: Auftragung der relativen Elektronendichte im Abhängigkeit vom Radius der Partikel mit Triangulationszahl $T = 4$. Aufgetragen wurden die Werte für die Core-GFP Insertionsvariante HBc149-GFP-4Gly-H₆ (gelb) im direkten Vergleich zum Konstrukt HBc149-H₆ (blau). Die Insertionsvariante weist mehrere zusätzliche elektronendichte Bereiche im Inneren der Partikel und außerhalb der Core-Schale auf.

Anhand der äußeren Elektronendichtedaten wurde erneut die Verteilung der GFP-Einheiten auf der Partikeloberfläche schematisiert. Abbildung 5-16 verdeutlicht, dass die Anordnung der GFP-Einheiten auf den $T = 4$ Partikel stark von den vorherigen Daten abwich. Bei den gewählten Einstellungen (Grenzwerte der Dichte in Abhängigkeit vom Radius) erscheinen die GFP-„Knubbel“ deutlich kleiner. Es könnte sich dabei um GFP-Dimere handeln, die nahezu direkt über den Spikes angeordnet sind.

GFP Verteilung T = 4 Partikel

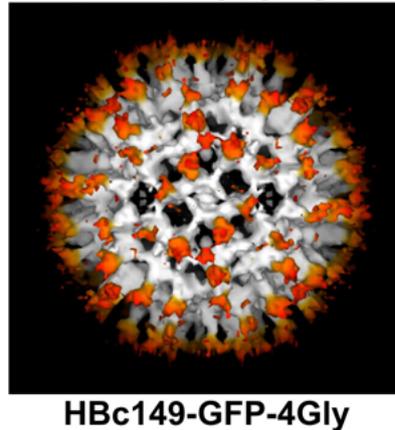


Abbildung 5-16: Rekonstruktion der GFP-Verteilung auf der Oberfläche der T = 4 Corepartikel. Abhängig vom Radius wurde die äußere Dichte den GFP-Einheiten zugeordnet und orange eingefärbt. Zu sehen ist eine gleichmäßige Verteilung von GFP über dem Corepartikel (grau). Die genaue Position der GFP-Einheiten auf den Dimeren ist nicht erkennbar.

Die erhaltene äußere Dichte konnte, wie in Abbildung 5-17 gezeigt, wiederum nur sehr unzureichend auf GFP übertragen werden. Sie war, wie schon zuvor bei den T = 3 Partikeln, deutlich zu klein um mehr als ein GFP Molekül darin unterzubringen.

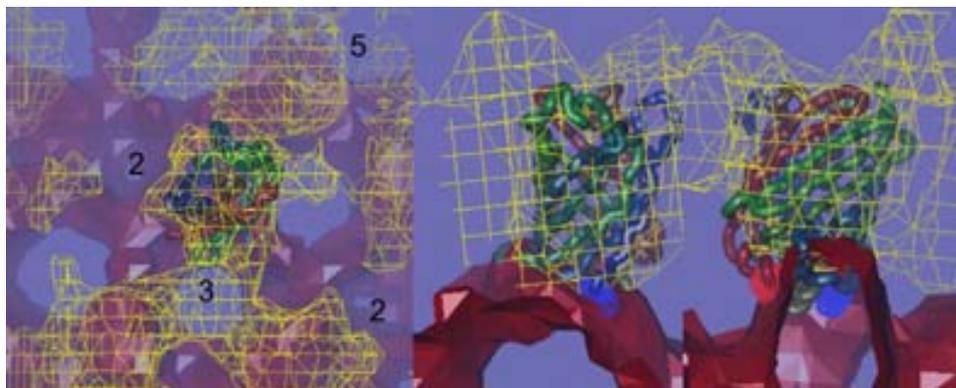


Abbildung 5-17: Die elektronendichte Masse über der T=4 Partikelhülle lässt sich eingeschränkt zu GFP-Molekülen „fitten“. Die Darstellung links zeigt die äußere Elektronendichte der GFP-Einheiten als gelbes Netzwerk, in das ein GFP-Molekül zur Veranschaulichung eingepasst ist. Zweifache, dreifache und fünffache Symmetrieachsen sind durch Zahlen markiert. Die seitliche Darstellung rechts zeigt, dass bei direkter Anordnung über den Spikes, die gemessene Elektronendichte auf nur ein GFP-Molekül eingepasst werden kann.

Da wiederum die äußeren Dichten (vergleiche auch Abbildung 5-14 und Abbildung 5-15) verschwommen, also von geringer Auflösung waren, konnte auch durch

„Fitting“ keine Optimierung erzielt werden. Somit wurde durch die gewählte 4-Glycin-Linkersequenz keine bessere Fixierung der GFP-Einheiten erreicht.

Die dreidimensionale Rekonstruktion der HBc149-GFP-4Gly T = 4 Partikel ohne die äußeren GFP-Dichten ist in Abbildung 5-18 dargestellt. Dimere, die eine zweifache mit einer fünffachen Symmetrieachse verbinden, sind durch rote Kreise dargestellt, Dimere, die eine zweifache mit einer zweifachen Symmetrieachse verbinden, durch gelbe Kreise. Die roten Pfeile weisen auf die geringfügige seitliche Verschiebung des ersten Dimer-Typs, die blaue Pfeile auf Spreizung bzw. Verschiebung des zweiten Dimer-Typs hin.

Oberfläche der inneren Hülle T=4 Partikel

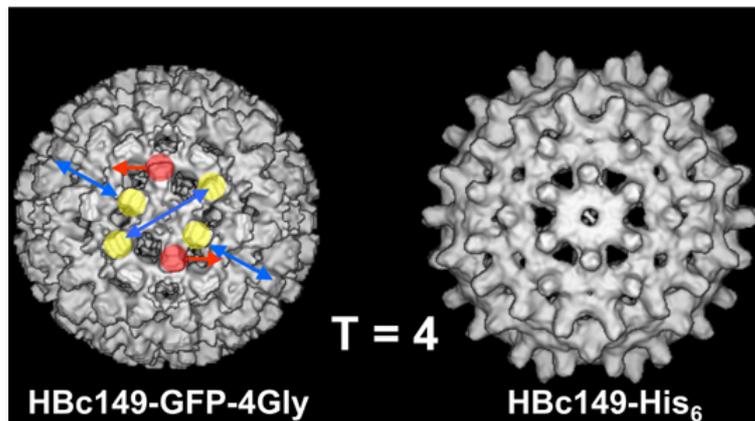


Abbildung 5-18: Rekonstruktion der Oberfläche der inneren Hülle der großen T = 4 Partikel. Die Abbildung zeigt links das berechnete Oberflächenbild der inneren Hülle der HBc149-GFP-4Gly-H₆ Variante (links) im Vergleich zur C-terminal verkürzten Variante HBc149-H₆ (rechts). Die Darstellung erfolgt als Aufsicht auf die zweifache Symmetrieachse. Es kommt zu einer massiven Umordnung der verschiedenen Dimer-Typen im Partikel, welche durch die farbigen Pfeile verdeutlicht wird. Zur genaueren Beschreibung der Umordnung siehe Text.

Zur Berechnung exakterer Rekonstruktionen wäre es zum Einen hilfreich, die vorhandene Partikelmischung vor der Analyse biochemisch in T = 3 bzw. T = 4 Partikel zu trennen. Dies wurde über die Durchführung eines zweiten, sehr flachen Sucrosegradienten (Zlotnick *et al.*, 1999), eine Auftrennung der Partikelprobe in einem 1 - 2,5 % Agarose-Gradientengel oder durch eine Gel-Chromatographie in der FPLC versucht. Mit keiner dieser Methoden war eine ausreichende Trennung der Partikel möglich. Weiterhin wurde vermutet, dass die gewählten Linkersequenzen

aus je vier Glycinresten immer noch eine weitgehend flexible Verbindung der GFP-Einheiten mit dem Core darstellten. Daher sollten die Linker weiter verkürzt werden.

Beim zweiten ausführlich untersuchten Konstrukt pETamp2-HBc149-ce/1- Δ 79/80-1Gly/1Gly-H₆ (Tabelle 29, Nr. 6) handelte es sich um eine Variante mit einem extrem verkürzten Linker. Dieser bestand nur noch aus je einem Glycinrest, als Insertionsort für GFP wurde wiederum die Aminosäurereste AS P79/ A80 gewählt. Das Konstrukt wird im folgenden zur Vereinfachung mit HBc149-GFP-1Gly-H₆ bezeichnet. Die gewählte Linkersequenz sollte die GFP-Einheiten in unmittelbarer Nähe zur Coreoberfläche auf den Spikes fixieren, eine Flexibilität schien nahezu ausgeschlossen. Diese geringe Flexibilität könnte im Extremfall aber auch verhindern, dass sich beide Protein-Einheiten ungehindert voneinander falten können, bzw. durch ihre räumliche Nähe die Assemblierung stark beeinflussen könnten. Die gute Expression, die nachfolgende Reinigung und die Analyse des Sedimentationsverhaltens im Sucrosegradienten zeigten aber, dass diese Probleme nicht aufgetreten waren. Die mittleren Sucrosegradientfraktionen 7 - 9 (vergleiche auch Abbildung 5-5) wurden entzuckert und auf eine Endkonzentration von ca. 4 mg/ml eingestellt. Nach einer ersten Begutachtung im EM nach negativ Kontrastierung (hier nicht gezeigt) wurde die Probe am EMBL weiter analysiert.

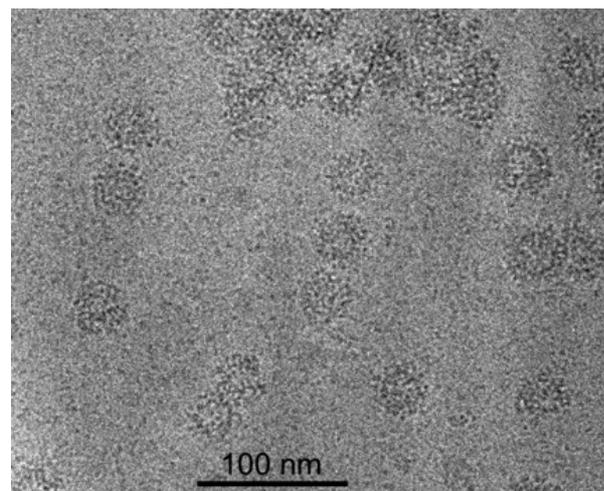


Abbildung 5-19: Kryo-elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme. Die durch Sucrosegradient gereinigte Probe pET28-amp2-HBc149-c/e1- Δ 79/80-GFP-1Gly/1Gly-H₆ wurde entzuckert, konzentriert und schockgefroren. In der Aufnahme sind wahrscheinlich hauptsächlich T = 3 Partikel, die kleinere Aggregate bilden, zu sehen. Der eingezeichnete Balken in der Aufnahme entspricht 100 nm.

Die kryo-elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der Probe in Abbildung 5-19 zeigt, dass es sich fast ausschließlich um $T = 3$ Partikel handelt, die aber ein leichtes Aggregationsverhalten aufweisen. Bei dieser Probe war es entsprechend einfacher als bei den vorherigen Proben, viele identische Partikel auszuwählen und in die Berechnungen einzubeziehen.

Die zugehörige Elektronendichteverteilung ist in Abbildung 5-20 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Coreprotein Variante HBc149-GFP-1Gly-H₆ im Vergleich zur Variante mit langem Linker HBc149-GFP-4Gly-H₆ einen sehr ähnlichen Dichteverlauf mit einem Hauptmaximum bei ca. 120 Å aufweist, d.h. dass sich die Partikelgrößen dieser beiden Coreprotein Varianten kaum unterscheiden. Die durchschnittlichen Partikeldurchmesser beider Varianten liegen bei ca. 34 - 38 nm. Die Insertionsvariante HBc149-GFP-1Gly-H₆ weist ebenfalls zwei zusätzliche elektronendichte Bereiche im Inneren der Partikel auf, die aber gegenüber denen der HBc149-GFP-4Gly-H₆ Variante verschoben sind. Die relative Dichte außerhalb der Hülle bei 155 - 190 Å hingegen liegt bei HBc149-GFP-1Gly-H₆ gegenüber der von HBc149-GFP-4Gly-H₆ etwas höher.

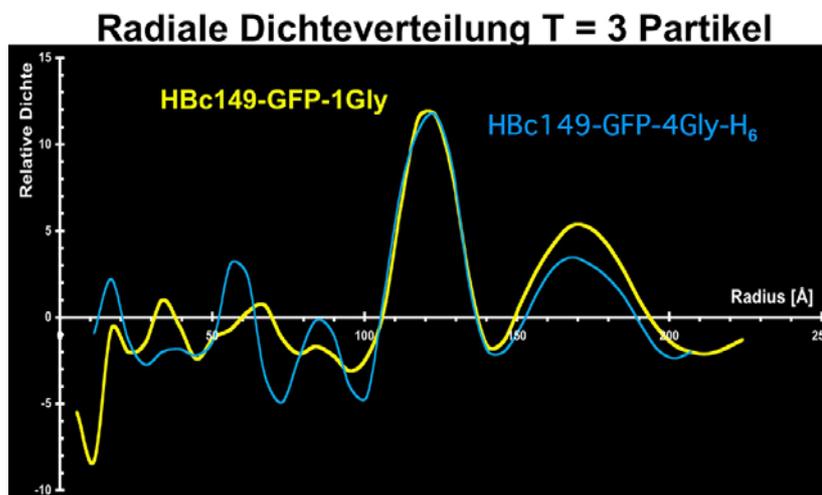
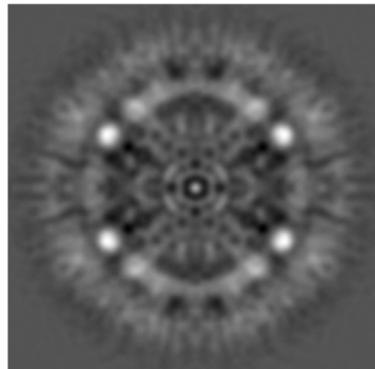


Abbildung 5-20: Auftragung der relativen Elektronendichte im Abhängigkeit vom Radius der Partikel mit Triangulationszahl $T = 3$. Aufgetragen wurden die Werte für die Core-GFP Insertionsvariante HBc149-GFP-1Gly-H₆ (gelb) im direkten Vergleich zum Konstrukt HBc149-GFP-4Gly-H₆ (blau). Die Abbildung zeigt, dass sich die Partikelgrößen beider Coreprotein Varianten und die zusätzlichen elektronendichte Bereiche im Inneren der Partikel, kaum unterscheiden. Der äußere Dichtering ist jedoch beim 1 Gly-Konstrukt stärker ausgeprägt.

Ein entsprechender äquatorialer Schnitt ist in Abbildung 5-21 dargestellt. Die Corehülle entspricht kaum noch der zu erwartenden Dichte und scheint umgeordnet zu sein. Auffallend ist aber, dass die äußere (GFP)-Dichte erstmals fast gleich hell wie der innere Bereich erscheint, d.h. hier konnte eine bessere Auflösung der GFP-Einheiten erzielt werden. Diese scheint aber zu Lasten der Struktur der Corepartikel vonstatten zu gehen.

Äquatorialer Schnitt T = 3 Partikel

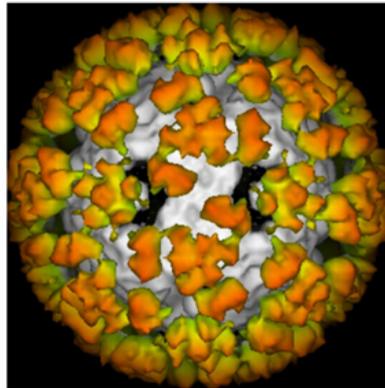


HBc149-GFP-1Gly-His₆

Abbildung 5-21: Die äquatoriale Dichteverteilung der HBc149-GFP-1Gly-His₆ Partikel zeigt **massive Veränderungen der Partikelstruktur an**. Der äußere elektronendichte Bereich der GFP Einheiten erscheint erstmalig sehr hell und weist auf eine gute Auflösung hin. Der innere Ring der Core-Schale und das Innere der Partikel weist Umstrukturierungen auf.

Die Verteilung der GFP-Einheiten auf der Partikeloberfläche kann nun plausibel auf die Anordnung der unterschiedlichen Dimere in einem T = 3 Partikeln bezogen werden, d.h. die Aufenthaltswahrscheinlichkeit ist so, wie man sie für einen normalen Corepartikel erwarten würde. Wie in Abbildung 5-22 gezeigt, scheinen an der fünffachen Symmetrieachse fünf, an der dreifachen Symmetrieachse drei GFP-Moleküle gruppiert vorzuliegen.

GFP Verteilung T= 3 Partikel



HBc149-GFP-1Gly

Abbildung 5-22: Rekonstruktion der GFP-Verteilung auf der Oberfläche der T = 3 Corepartikel bei Insertion mit einem sehr kurzen Linker. Die radiale Farbcodierung weist der Masse der GFP-Einheiten die Farbe Orange zu. Eine weitgehend geordnete Verteilung von GFP über den Dimeren des Corepartikel (grau) ist sichtbar.

Diese relative gute Auflösung der GFP-Moleküle führt aber zu massiven Veränderungen der Corestruktur, wahrscheinlich verursacht durch die stark verkürzte Linkersequenzen der GFP-Insertion. Keiner der normalerweise in einem T = 3 Partikel vorkommenden Dimer-Typen kann in der in Abbildung 5-23 gezeigten Rekonstruktion der inneren Corehülle gefunden werden. Die Umstrukturierung der Trägeroberfläche lässt sich zum heutigen Zeitpunkt nicht hinreichend erklären. Die augenscheinliche Dynamik der Corestruktur hatte sich schon bei der zuvor untersuchten HBc149-GFP-4Gly-H₆ Variante angedeutet, aber mit deutlich schwächerer Ausprägung.

Oberfläche der inneren Hülle T = 3 Partikel

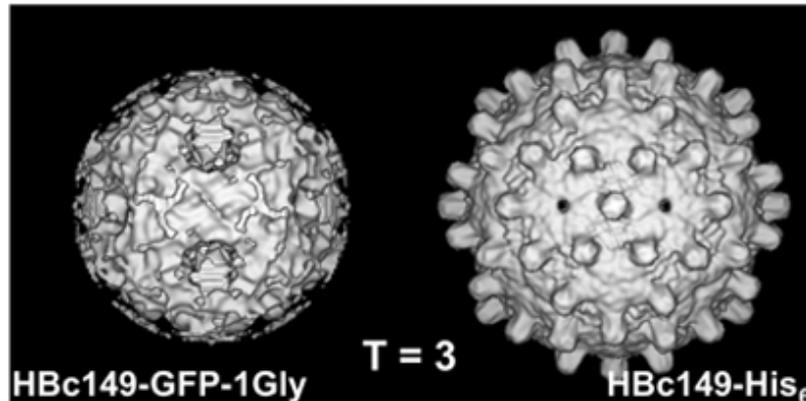


Abbildung 5-23: Rekonstruktion der Oberfläche der inneren Hülle der T = 3 Partikel. Die Abbildung zeigt die Corehülle des Wildtyps HBc149-H₆ (rechts) und der HBc149-GFP-1Gly-H₆ Variante (links). Die Darstellung erfolgt als Aufsicht auf die zweifache Symmetrieachse. Die Anordnung der Dimere in der Partikelhülle der 1Gly-Insertionsvariante ist kaum noch erkennbar.

Die relative gute Auflösung der GFP-Einheiten in diesem Konstrukt ließ für die nachgewiesenen Masse auf dem Partikel ein weit besseres „Fitting“ zu.



Abbildung 5-24: Die elektronendichte Masse über der T = 3 Partikelhülle lässt sich gut zu **GFP-Molekülen fitten**. Die Darstellung links zeigt die äußere Elektronendichte der GFP-Einheiten als gelbes Netzwerk in das ein farbig eingefärbtes GFP-Molekül ist zur Veranschaulichung eingepasst ist. Eine zweifache Symmetrieachse ist durch eine Zahl markiert. Die seitliche Darstellung rechts zeigt, dass die gemessene Elektronendichte sich relativ genau auf ein gekipptes GFP-Molekül fitten lässt.

In Abbildung 5-24 ist ein GFP-Molekül über der Partikeloberfläche in der genauen Anordnung über dem Spike an der zweifachen Symmetrieachse der T = 3 Teilchen dargestellt. Interessanterweise konnte die Masse bei einer horizontalen anstatt einer vertikalen Ausrichtung von GFP relativ exakt eingepasst werden.

Tabelle 30 fasst die gesamten Ergebnisse der Strukturuntersuchungen hinsichtlich Auflösung der GFP-Moleküle und Änderung der Corestruktur in Abhängigkeit der Linkersequenz zusammen.

Tabelle 30: Übersicht über die Ergebnisse der Strukturanalyse mit HBc-abgeleiteten CLPs als Trägerstruktur für Fremd-Epitope. Eine Verkürzung der Linkersequenz ermöglicht auf Kosten der Corestruktur eine bessere Auflösung der Fremdproteinstruktur.

Linkersequenz	Erzielte Auflösung für die inserierten GFP-Moleküle	Auswirkungen auf die Corestruktur
A-(G) ₄ -S-(G) ₄ -GFP-(G) ₄ -S-(G) ₄ -S	Gering (---)	keine
(G) ₄ -GFP-(G) ₄ T = 3 Partikel	Geringfügig besser (--)	Dimere an der zweifachen Symmetrieachse verändert
(G) ₄ -GFP-(G) ₄ T = 4 Partikel	Geringfügig besser (-)	Dimere an der zweifachen und fünffachen Symmetrieachse verändert
(G)-GFP-(G) T = 3 Partikel	Deutlich besser (+)	Totale Umordnung der Core-Schale

Somit musste abschließend festgestellt werden, dass sich keine Core-GFP Fusionsproteinvarianten finden ließen, die optimal für eine Strukturanalyse geeignet waren.

5.1.4. Andere HBV Corefusionsproteine

5.1.4.1. HBV Core-RFP Fusionsproteine

Als weiteres Modellprotein sollte das rot fluoreszierende Protein dsRed2 (Clontech), ein entferntes Homolog des bisher verwendeten eGFP, in das c/e1 Epitop von HBV Core eingefügt werden. DsRed ist eine Variante des ursprünglich aus der Koralle *Discosoma* isolierten Chromoproteins RFP (Matz *et al.*, 1999). RFP wie auch dsRed zeigen aber durch ihr natürliches Vorkommen als Tetramer ein ausgeprägtes Aggregationsverhalten in Zellkultur und bei Expression in *E. coli*. Durch weitere Mutationen (Baird *et al.*, 2000), (Bevis und Glick, 2002) besitzt die Variante DsRed2 insgesamt 6 Aminosäuresubstitutionen V105A, I161T und S197A, die für eine schnellere Reifung des Chromophors und eine gesteigerte Rot-Emission

verantwortlich sind, sowie die Mutationen R2A, K5E und K9T, die eine stark verminderte Tendenz zur Aggregation, und somit die erhöhte Löslichkeit des Proteins vermitteln sollen. DsRed2 wurde sowohl als Fusionsprotein der verkürzten Coreprotein Variante HBc1-149-H₆ (pET28amp2-HBc149-c/e1-Δ79/80-dsRed2-4Gly/4Gly-H₆) und als Vollängen Fusionsprotein mit HBc1-183 (pET28-HBc183-c/e1-Δ79/80-dsRed2-4Gly/4Gly) in verschiedenen BL21-Expressionsstämmen exprimiert. Sowohl die Expression der verkürzten als auch der Vollängen Fusionsproteine zeigte aber, dass die Proteine, entgegen der Erwartung, ein sehr ausgeprägtes Aggregationsverhalten aufwiesen. Die Bakterienkulturen wurden wie in 4.4.2 beschrieben aufgeschlossen, wobei das entstandene Bakterienpellet den Hauptanteil an Fusionsprotein enthielt und nur ein Bruchteil der Proteine in löslicher Form vorlag. Eine Auftrennung der nativ aufgearbeiteten Fusionsproteine im Sucrosegradienten war daher in dieser Form nicht möglich. Daher wurde versucht, das Protein mit der C-terminale Fusion des His₆-Peptids unter denaturierenden Bedingungen aus dem Bakterienpellet zu isolieren, an eine Nickelsäule zu binden und in löslicher Form wieder zu eluieren (siehe 4.5.2). Auch unter sehr hohen Harnstoffkonzentrationen war es nicht möglich, die Proteine in Lösung zu bekommen. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch schon von anderen Arbeitsgruppen gemacht werden, die versucht hatten, ein unlösliches HBV Corefusionsprotein durch Denaturierung mit Harnstoff im löslichen Überstand zu erhalten (Wizemann *et al.*, 2000). In einem weiteren Versuch wurde zudem versucht, dsRed2 zusammen mit HBV Coreprotein als Mosaikpartikel durch *in vitro* Assemblierung an Ni-NTA Säulen darzustellen (vergleiche 4.5.3). Beide Ansätze scheiterten wiederum am Aggregationsverhalten von dsRed2.

5.1.4.2. HBV Core-CFP/ YFP Fusionsproteine

Um zu verdeutlichen, dass ein ausgeprägtes Aggregationsverhalten, wie das von dsRed, eine effiziente Partikelbildung der Fusionsproteine verhindert, wurden in einem weiteren Versuch die GFP-Mutanten eCFP und eYFP verwendet. Diese GFP-Varianten zeigen eine nach Cyanblau bzw. Gelb verschobene Fluoreszenz und weisen bei hohen Konzentrationen eine ausgeprägte Tendenz zur Dimerisierung auf (Zacharias *et al.*, 2002). Bei zentraler Insertion der ursprünglichen eCFP und eYFP Konstrukte in das c/e1 Epitop konnte, wie schon für dsRed in 5.1.4.1 gezeigt, keine effiziente Partikelbildung gefunden werden. Wahrscheinlich verursachte eben dieses

Dimerisierungs- bzw. Multimerisierungsverhalten bei den Corefusionsproteinen wiederum eine starke Tendenz zur Aggregatbildung, wodurch die Assemblierung gestört wurde. Durch die Mutationen A206K, L221K oder F223R an den Dimer-Dimer Verbindungspunkten ließ sich die Dimerisierung bei beiden mutierten fluoreszierenden Proteine stark vermindern, wobei die A206K Mutanten die geringste Tendenz zur Dimerisierung aufwiesen (Zacharias *et al.*, 2002). Auch bei höheren Konzentrationen sollten diese Mutanten als Monomere (m) vorliegen. Die A206K-Varianten von mCFP und mYFP wurden daher für eine zentrale Insertion in das c/e1 Epitop verwendet. Die Reinigung der Corefusionsproteine HBc149-mCFP-H₆ und HBc-mYFP-H₆ erfolgte wie in 4.4.2 beschrieben unter nativen Bedingungen, gefolgt von einer Sedimentationsanalyse der Proteine im Sucroседichtegradienten (siehe 4.4.3.1).

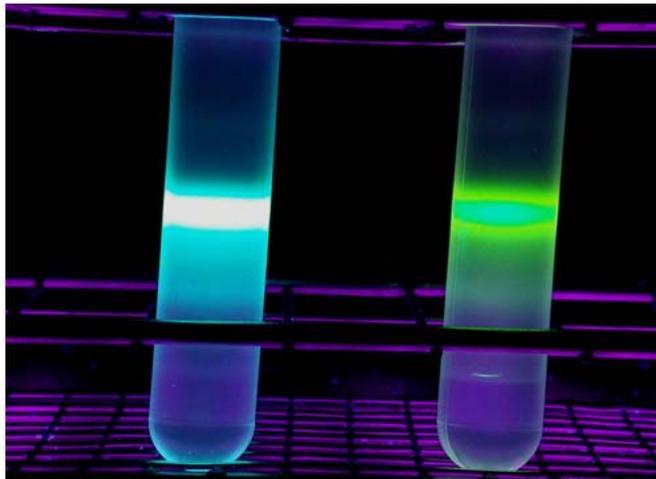


Abbildung 5-25: Die Corefusionsproteine HBc149-mCFP-H₆ und HBc149-mYFP-H₆ weisen eine gute Partikelbildungsfähigkeit auf. Auf den Sucrosegradienten wurden die Bakterienlysate der exprimierten Konstrukte aufgetragen und wie beschrieben zentrifugiert. Die assemblierten Proteine konnten fast vollständig in einer cyan fluoreszierenden (HBc149-mCFP-H₆; links) bzw. gelb-grün fluoreszierenden Bande (HBc149-mYFP-H₆, rechts) angereichert werden. Es konnten keine hochmolekularen Aggregate am Boden der Gradienten festgestellt werden.

Abbildung 5-25 zeigt eine Aufnahme der Sucrosegradienten nach Zentrifugation, bei indirekter Beleuchtung mit UV-Licht. Sie zeigt eindrücklich, dass sich diese Corefusionsprotein Varianten fast vollständig zu Partikeln assembliert hatten, da je nur eine hell-fluoreszierende Bande in der Mitte des Gradienten zu sehen war und kaum unassemblierte Core Dimere nachweisbar waren. Aggregate, wie bei eCFP/ eYFP oder dsRed konnten nicht festgestellt werden, die Auftrennung des

Lysates wies keine Anreicherung von unlöslichen Bestandteilen am Boden des Gradienten auf. Eine weitere Analyse dieser Fusionsproteine wurde noch nicht durchgeführt.

Die Übertragung der beschriebenen Methode von GFP auf Fremdproteine wie dsRed2 wie auch mCFP und mYFP zeigt, dass diese Proteine trotz ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit mit GFP sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Assemblierung des Fusionsproteins haben. Das Dimerisierungs- bzw. Multimerisierungsverhalten der Fusionspartner übt einen beträchtlichen negativen Einfluss auf die Partikelbildung aus. Die als Monomer vorliegenden Proteine stellten besser geeignete Core-Fusionspartner dar als die entsprechenden dimeren Proteine. Obwohl die mCFP und mYFP Derivate erfolgreich assembliert werden konnten, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass HBc-abgeleitete CLPs als hochgeordnetes Trägergerüst für Fremdproteine, insbesondere solche mit unbekanntem Struktureigenschaften, zur hochauflösenden Strukturanalyse nur unter sehr speziellen, schwierig zu generalisierenden Bedingungen geeignet sind.

5.2. Herstellung von HBc-abgeleiteten Mosaikpartikeln mittels Ni-NTA Säulenchromatographie

In den bisher gezeigten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die Insertion eines Proteins in das c/e1 Epitop negativ auf die Assemblierungsfähigkeit des entstandenen Corefusionsprotein auswirken kann. Aber auch eine C-terminale Fusion kann die Assemblierung beträchtlich beeinflussen. Die Fusion der 17 kDa (167 aa) *Staphylococcus aureus* Nuklease (SN) am C-Terminus des HBV Coreproteins (Core-SN) führte zu sehr labilen Partikeln (Beterams *et al.*, 2000). Dies ist mindestens zum Teil bedingt durch die Geometrie der Kapside, die im Inneren der Partikel ein noch begrenzteres Raumangebot aufweisen als auf der Partikeloberfläche. Die Verwendung von noch größeren Fremdproteinen würde voraussichtlich zu einer weiter erhöhten Instabilität der Partikel führen oder die Assemblierung generell verhindern. Um dennoch größere Proteine erfolgreich präsentieren zu können, wurde in dieser Arbeit versucht, eine Möglichkeit zu schaffen, das Platzangebot auf der Oberfläche bzw. im Partikelinneren für Fremdproteine zu erhöhen. Dazu sollte ein Teil der Corefusionsprotein-

Untereinheiten im Partikel gezielt durch die sterisch weniger anspruchsvollen Wildtyp Coreprotein-Untereinheiten ersetzt werden.

Der hier vorgestellte Versuchsansatz der *in vitro* Assemblierung bedient sich der selektiven Affinität von Oligo-Histidin an Agarose immobilisierte Ni²⁺-Ionen (Ni-NTA). Wildtyp Coreprotein und das Corefusionsprotein, die jeweils eine C-terminale Peptidsequenz von sechs Histidinresten (His₆-Peptid) enthielten, wurden separat in *E. coli* exprimiert und getrennt aufgearbeitet (siehe 4.5.3). Beide Proteinuntereinheiten wurden im Verhältnis 1 : 1 auf eine Ni-NTA Säule aufgetragen, nachdem durch Dissoziation der Corepartikel in semi-denaturierende Bedingungen das C-terminale His₆-Peptid zugänglich gemacht wurde. In einem simultanen Arbeitsschritt wurden beide Proteine renaturiert und zusammen von der Säule eluiert.

Am Beispiel der *per se* assemblierungsfähigen Coreprotein Varianten pET28-amp2-HBc1-149-H₆ (HBc1-149-H₆) und pET28-amp2-HBc149-c/e1-Δ79/80-4Gly/4Gly-H₆ (HBc149-GFP-4Gly-H₆) wurde zunächst nachgewiesen, dass sich neue Partikel formen, die aus beiden Proteinuntereinheiten zusammengesetzt sind und somit Mosaikpartikel darstellen. Das Protokoll der *in vitro* Assemblierung wurde dann auf ein Corefusionsprotein übertragen, das allein nicht oder höchstens sehr ineffizient assembliert. Durch Verdünnung mit unmodifiziertem Coreprotein gelang es jedoch auch hier, stabile Mosaikpartikel herzustellen.

Abbildung 5-26 stellt ein typisches Reinigungsschema zur Herstellung der Mosaikpartikel dar.

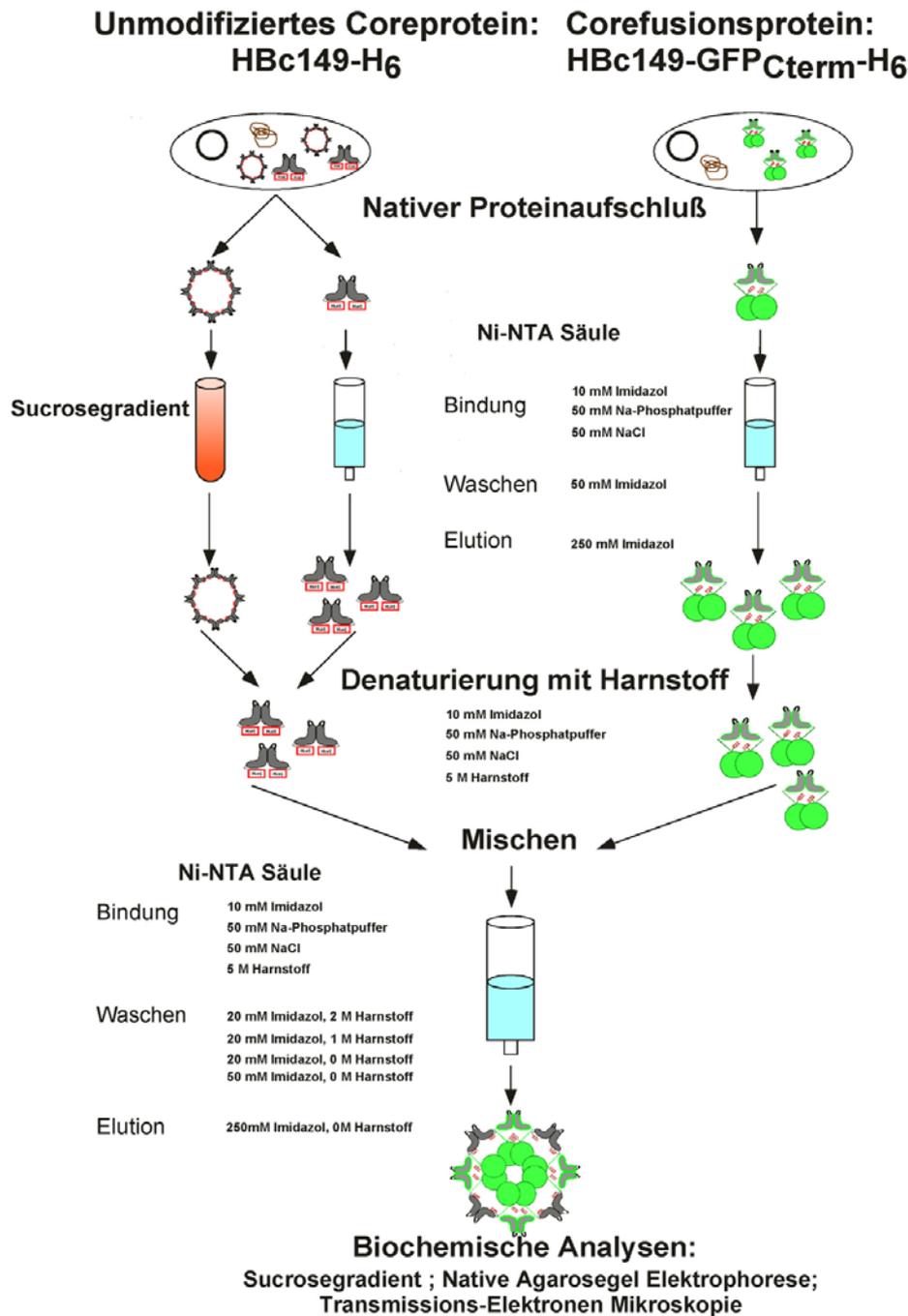


Abbildung 5-26: Arbeitsschema der *in vitro* Assemblierung von Mosaikpartikeln. Nach nativem Aufschluss der Bakterienzellen wurden die Lysate der einzelnen Proteinuntereinheiten getrennt voneinander gereinigt: Unmodifiziertes Wildtyp Coreprotein konnte entweder in Form von CLPs über einen Sucrosegradienten oder als Dimer über eine native Nickel-Affinitätssäulen-Chromatographie gewonnen werden. Die Corefusionsprotein-Untereinheiten wurden über Nickel-Affinitätssäulen-Chromatographie gereinigt. Beide Proteine wurden getrennt auf eine Harnstoffkonzentration von 5 M - 5,5 M eingestellt, gemischt und gemeinsam auf eine mit Harnstoff zuvor äquilibrierte Ni-NTA Säule aufgebracht. Nach Absenkung der Harnstoffkonzentration wurden beide Proteine gemeinsam von der Säule eluiert und die Partikelbildung weiter untersucht.

5.2.1. Über Ni-NTA Technik hergestellte Partikel enthalten beide Proteinuntereinheiten HBc1-149-H₆ und HBc1-149-GFP-4Gly-H₆

Die benötigten Proteinuntereinheiten HBc1-149-H₆ und HBc1-149-GFP-4Gly-H₆ wurden über einen Sucrosegradienten bzw. über eine native Nickelsäulenreinigung wie in 4.4.3 und 4.5.1 beschrieben aufgearbeitet. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden in einer 12,5 % SDS-PAGE miteinander verglichen. Ungefähr 1 mg jedes Proteins wurde miteinander vermischt und auf eine Harnstoff-Endkonzentration von 5,5 M gebracht. Nach Bindung beider Proteine an die mit Harnstoff zuvor äquilibrierten Nickelsäule bei einer niedrigen Salzkonzentration von 50 mM NaCl, welche die Dissoziation der Partikel unterstützten sollte, wurden die Proteine wie in 4.5.3 beschrieben nach schrittweiser Absenkung der Harnstoffkonzentration von 5 M auf 0 M abschließend unter nativen Bedingungen und bei 300 mM NaCl von der Säule gemeinsam eluiert.

Wie in Abbildung 5-27 gezeigt, enthalten die Fraktionen mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM beide Proteinuntereinheiten in vergleichbaren Konzentrationen.

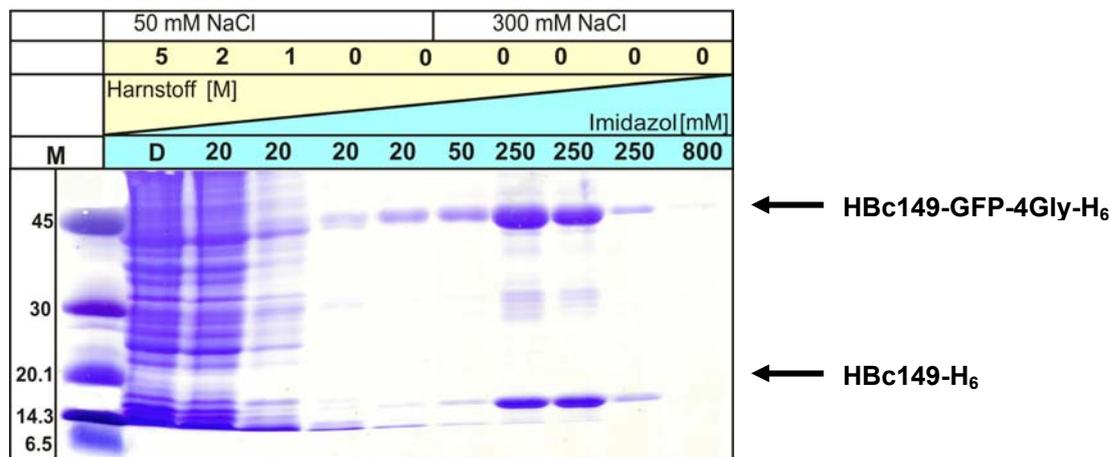


Abbildung 5-27: Die Coreprotein Varianten HBc149-H₆ und HBc149-GFP-4Gly-H₆ eluieren gemeinsam von der Ni-NTA Säule. Beide Proteinuntereinheiten wurden auf die Ni-NTA Säule aufgetragen, der Durchfluss aufgefangen, die Säule mit gleichzeitig absteigenden Harnstoffkonzentrationen und ansteigenden Salz- und Imidazolkonzentration gewaschen und die Proteine anschließend eluiert. Von jeder Säulenfraktion wurde ein Aliquot auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blaufärbung detektiert. Bei 0 M Harnstoff, 300 mM NaCl und 250 mM Imidazol wurden HBc149-H₆ (ca. 16 kDa) und HBc149-GFP-4Gly-H₆ (ca. 44 kDa) gemeinsam eluiert. M = Proteinmarker low.

Diese Fraktionen wurden vereinigt und gegen Hochsalzpuffer (TN-300) dialysiert, bevor das konzentrierte Dialysat auf einem 10 % - 60 % Sucrosegradienten aufgetrennt wurde. Nach der Zentrifugation hatte sich wie erwartet eine grün-fluoreszierende Bande in der Mitte des Gradienten gebildet. Die Analyse der einzelnen Sucrosefraktionen im SDS-PAGE in Abbildung 5-28 zeigte, dass sich in den mittleren Fraktionen 7 - 9, gemäß einer für Partikel erwarteten Verteilung im Gradienten, beide Proteinuntereinheiten in vergleichbaren Konzentrationen befanden. Ein nicht-assemblierter Anteil beider Proteintypen lag zudem in den Fraktionen 1 - 4 verteilt vor.

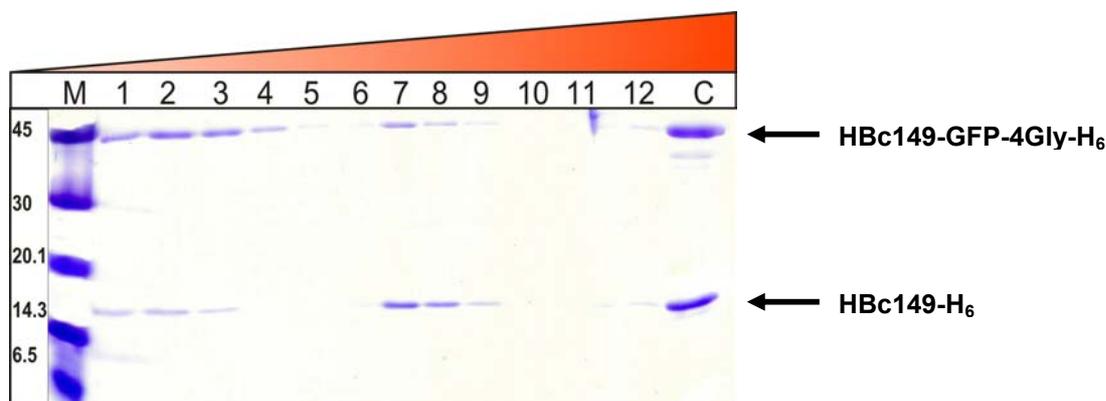


Abbildung 5-28: Die Coreproteine HBc149-H₆ und HBc149-GFP-4Gly-H₆ sedimentieren gemeinsam in einem Sucroседichtegradienten. Die dialysierten und konzentrierte Eluate der Nickelsäule wurde durch einen analytischen Sucrosegradienten zentrifugiert und in 14 Fraktionen geerntet. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde auf einem 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blaufärbung detektiert. Die von oben nach unten zunehmende Sucrosekonzentration im Gradienten ist wie in Abbildung 2-1 durch den Farbverlauf von hell-orange nach dunkel-orange veranschaulicht. Ein nicht-assemblierter Anteil jeder Proteinuntereinheit liegt in den Fraktionen 1 - 4 verteilt vor. Eine Anreicherung der partikulären Core-GFP Fusionsproteine und der unmodifizierten Coreproteine ist in den Fraktionen 7 - 9 mit vergleichbarer Konzentration nachweisbar. Als Kontrolle (C) wurde eine Mischung der beiden im Versuch eingesetzten Proteinuntereinheiten mit auf das Gel aufgetragen. M = Proteinmarker low.

Die Fraktion 7 wurde mit 2 % Uranylazetat negativ kontrastiert und im Transmissions-Elektronenmikroskop ausgewertet.

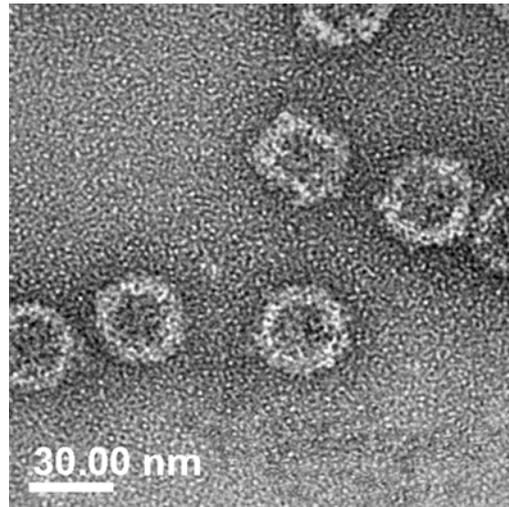


Abbildung 5-29: Die aus HBc149-GFP-4Gly-H₆ und HBc149-H₆ *in vitro* assemblierten Partikel zeigen im Elektronenmikroskop verschiedene Partikelformen. Die durch Sucrosegradient gereinigte Probe wurde mit 2 % Uranylazetat negativ kontrastiert und bei einer Vergrößerung von 105000x aufgenommen. Der eingezeichnete Balken in der Aufnahme entspricht 30 nm.

Es zeigte sich, dass sich Partikel gebildet hatten, deren innere Core-Schale ein ähnliches Erscheinungsbild wie das der Wildtyp Partikel aufwies, der äußere Rand aber vereinzelt Ausbuchtungen zeigt. Diese könnten durch die nach außen gerichteten GFP-Einheiten verursacht werden. Der Durchmesser dieser negativ kontrastierten Mischpartikel lag durchschnittlich zwischen 32 und 34 nm. Da es aber weiterhin möglich schien, dass sich im Sucrosegradienten zwei getrennte Partikelbanden, eine aus reinem HBc149-H₆ und eine aus HBc149-GFP-4Gly-H₆ gebildet hatten und gleich schnell sedimentiert waren, sollte unabhängig nachgewiesen werden, dass die entstandenen Partikel tatsächlich beide Proteinuntereinheiten enthielten. Daher wurden die Proben von zweier unabhängig durchgeführten Versuche der *in vitro* Assemblierung (in Abbildung 5-30 Mosaik 1 bzw. Mosaik 2 genannt) zusammen mit reinen HBc1-149-H₆ Partikeln bzw. HBc149-GFP-4Gly-H₆ Partikeln auf einem nativen Agarosegel aufgetrennt und per Kapillartransfer auf eine PVDF Membran geblottet.

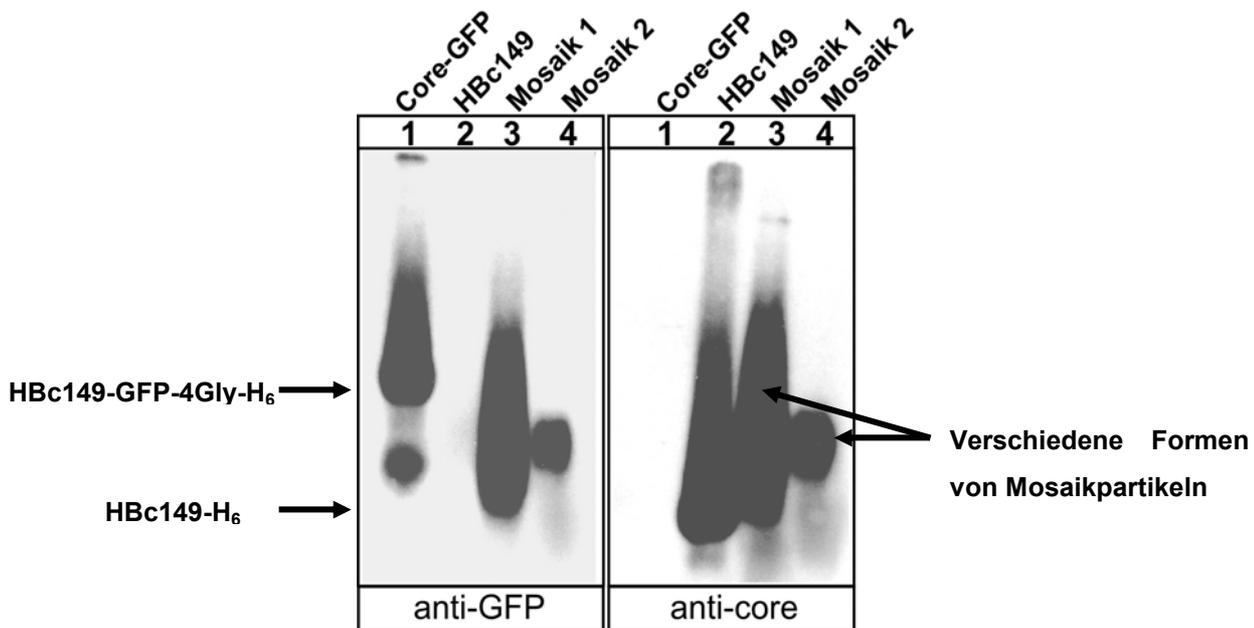


Abbildung 5-30: Western Blot Analyse der Mosaikpartikel. Mit einem spezifischen Antikörper gegen GFP (anti-GFP, 1:7000; linke Abbildung) können das Core-GFP Fusionsprotein (HBc149-GFP-H₆, Spur 1) und die Fusionsproteinanteile der HBc149/ HBc149-GFP Mosaikpartikel in Spur 3 und 4 spezifisch nachgewiesen werden, nicht aber das unmodifizierte HBc1-149-H₆ Protein in Spur 2. Mit dem für das c/e1 Epitop spezifischen Antikörper gegen Coreprotein (mc312; 1:1000; rechte Abbildung) können die unmodifizierten Coreproteine der Mosaikpartikel (Spur 3 und 4) und die HBc1-149-H₆ Partikel detektiert werden, nicht aber das Core-GFP Fusionsprotein HBc149-GFP-H₆ (Spur 1), da das vom Antikörper erkannte c/e1 Epitop durch die GFP-Insertion nicht mehr existierte.

Durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen das lineare HBc-Epitop aa 76 - 84 (mc312) konnte in den Mosaikpartikeln das unmodifizierte Coreprotein spezifisch detektiert werden. Dieser Antikörper konnte, wie Abbildung 5-30 zudem verdeutlicht, (Spur 1, rechter Blot) durch die Insertion von GFP in das zentrale c/e1 Epitop nicht mehr mit den Core-GFP Fusionsprotein reagieren. Diese Anteile waren mit einem spezifischen Antikörper gegen GFP in den Mosaikpartikeln nachweisbar (Spuren 3 und 4, linker Blot). Die Western Blot Analyse zeigte, dass die neu geformten Partikel beide Proteinuntereinheiten enthielten. Die Laufgeschwindigkeit der Mosaikpartikel im Agarosegel lag bei beiden Proben ungefähr in der Mitte zwischen den reinen Partikelproben, wobei das Laufverhalten innerhalb der Mosaikformen 1 und 2 verschieden war. Besonders die Mosaikform 1 zeigte eine eher breite Verteilung innerhalb der Spur und nicht wie Mosaikform 2 eine eher distinkte Partikelbande. Dies kann durch Unterschiede in der genauen Zusammensetzung aus den einzelnen Proteinuntereinheiten bedingt sein, wobei ein höherer Anteil an Core-GFP Fusionsprotein auch zu einer deutlicheren Veränderung

der Oberflächenladung der Partikel führen würde. Die Oberflächenladung ihrerseits führt zu einer Veränderung der Mobilität im Gel. Dementsprechend würde ein höherer Anteil an unmodifizierten Coreproteinen im Partikel die Laufgeschwindigkeit der Mischpartikel an die der reinen Partikelform angleichen. Eine Abschätzung der genauen Anteile der Untereinheiten im Mosaikpartikel mit der vorliegenden Western Blot Analyse ist aber auf Grund des für die Detektion verwendeten ECL Plus Reagenz schlecht möglich. ECL Plus arbeitet mit einer Signalverstärkung, wodurch eine Aussage von der Stärke des Signals zur tatsächlichen Menge des detektierten Proteins nur begrenzt möglich ist.

5.2.2. HBc149-GFPct-H₆ allein bildet keine stabilen Partikel

Die oben beschriebene Methode wurde nachfolgend auf eine Coreprotein Variante übertragen, die keine oder nur eine geringe Assemblierungsfähigkeit besitzt. Das Protein HBc149-GFPct-H₆ (Konstrukt pET28-amp2-HBc149-GFPct-H₆), eine C-terminale Fusion des 238 aa GFP an das verkürzte Coreprotein, wurde wie in 4.4.2 beschrieben aufgearbeitet.

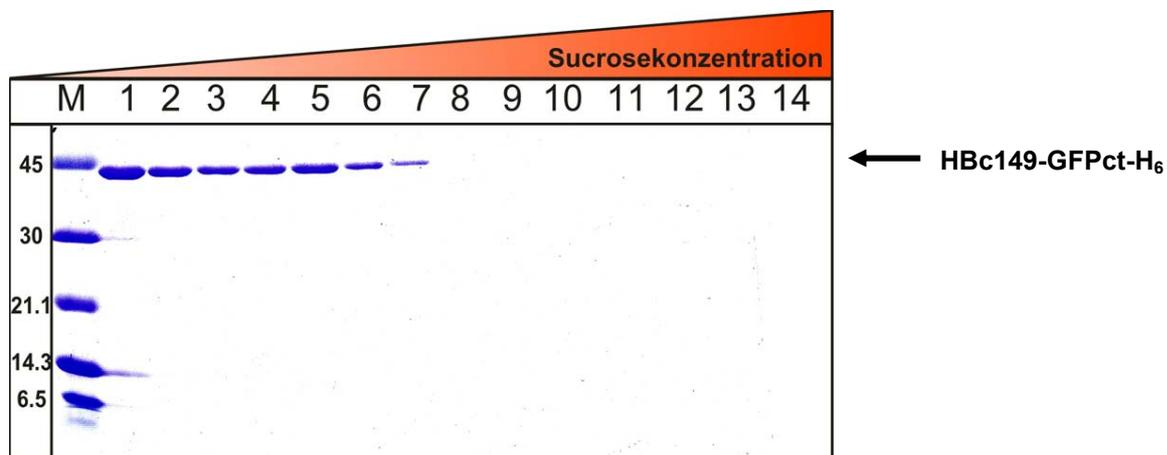


Abbildung 5-31: Analyse der Partikelbildungsfähigkeit des chimären C-terminalen Core-GFP-Fusionsproteins durch das Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten. Auf den Sucrosegradienten wurde das Bakterienlysat des Konstruktes pETamp2-HBc149-GFPct-H₆ (HBc149-GFPct-H₆) aufgetragen und nach Zentrifugation in 14 gleich große Fraktionen aliquotiert. Je 5 µl jeder Fraktionen wurde auf einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Blaufärbung detektiert. Die von oben nach unten zunehmende Sucrosekonzentration im Gradienten ist wie in Abbildung 2-1 durch den Farbverlauf von hell-orange nach dunkel-orange veranschaulicht. Eine selektive Anreicherung der Core-GFPct Fusionsproteine mit einer Größe von ca. 44 kDa in der Mitte des Gradienten ist nicht nachweisbar. M = Proteinmarker low.

Die Partikelbildungsfähigkeit des Konstruktes wurde durch das Sedimentationsverhalten in einem analytischen Sucrosegradienten bestimmt. Dabei zeigen die im SDS-PAGE aufgetrennten Sucrosegradientfraktionen in Abbildung 5-31, dass das Protein im wesentlichen in den oberen Fraktionen des Gradienten verteilt vorliegt. Dies verdeutlicht, dass HBc149-GFPct-H₆ keine Partikel, oder wenn überhaupt, nur sehr instabile Kapside bilden kann. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass 240 GFP-Untereinheiten im Inneren der Partikel das vorhandene Raumangebot überschreiten würden.

Dies konnte durch eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit 2 % Uranylazetat negativ kontrastierten Probe von HBc149-GFPct-H₆ wie in Abbildung 5-32 gezeigt, weiter bestätigt werden.

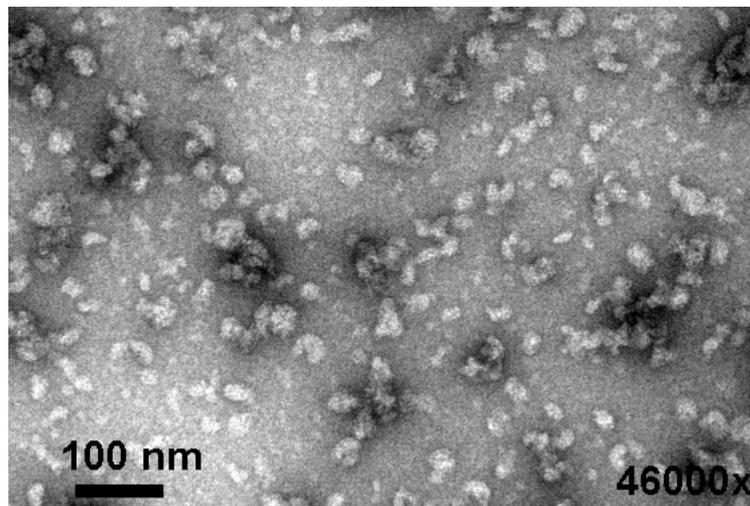


Abbildung 5-32: In der elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der Coreprotein Variante HBc149-GFPct-H₆ sind keine vollständigen Partikel nachweisbar. Die Sucrosegradientfraktionen 6 und 7 wurden vereinigt, konzentriert und mit 2 % Uranylazetat negativ kontrastiert. Die Übersichtsaufnahme zeigt bei einer Vergrößerung von 46000x keine assemblierten Partikel, sondern nur einzelne Proteinuntereinheiten oder aus Coreprotein gebildete Aggregate. Der eingezeichnete Balken in der Aufnahme entspricht 100 nm.

5.2.3. HBc1-149-H₆ und HBc149-GFPct-H₆ können über Ni-NTA Technik gemeinsam eluiert werden

Die zur Versuchsdurchführung benötigten Proteinuntereinheiten HBc1-149-H₆ und HBc149-GFPct-H₆ wurden über einen Sucrosegradienten bzw. über eine native Nickelsäulenreinigung wie in 4.4.3 und 4.5.1 beschrieben aufgearbeitet. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden in einer 12,5 % SDS-PAGE abgeschätzt.

Die Durchführung der *in vitro* Assemblierung erfolgte wie in 4.5.3 beschrieben. Die Betrachtung der einzelnen Fraktionen unter UV-Licht im Teil A der Abbildung 5-33 zeigte, dass der Hauptanteil der Fluoreszenz, die von den HBc149-GFPct-H₆ Coreproteinen resultierte, bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM von der Säule eluiert worden war. Die Auftrennung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine in einer SDS-PAGE (Teil B der Abbildung 5-33) zeigte, dass auch die unmodifizierten HBc149-H₆ Proteine bei dieser Imidazolkonzentration eluiert wurden, und zudem in vergleichbaren Mengen zum Fusionsprotein vorlagen. Daher wurden alle drei Fraktionen mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM vereinigt, gegen TN-300 dialysiert und eingeeengt.

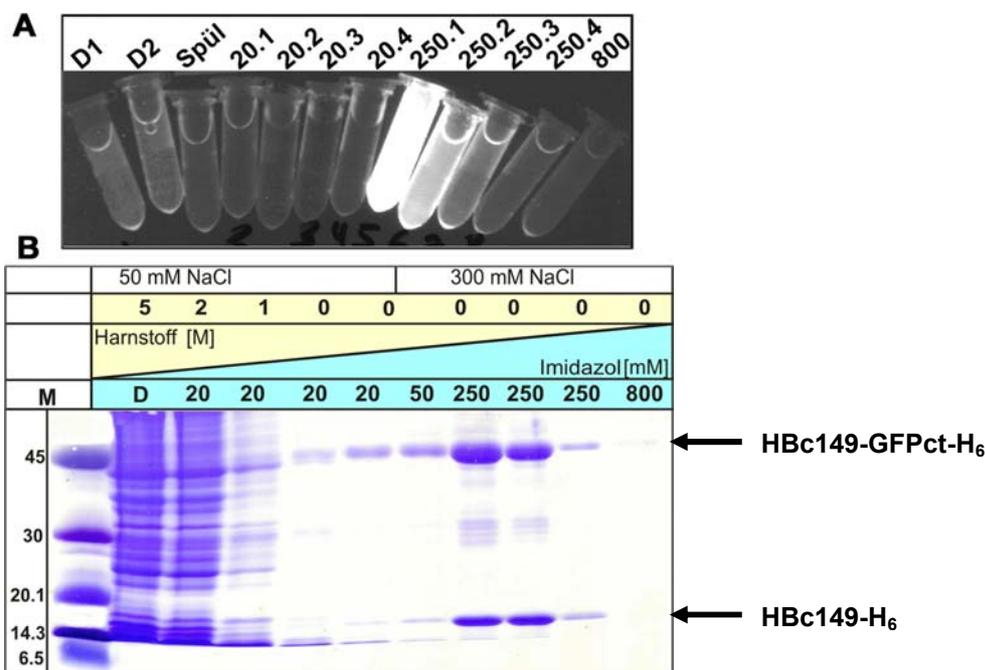


Abbildung 5-33: Die Coreprotein Varianten HBc149-H₆ und HBc149-GFPct-H₆ eluieren gemeinsam von der Ni-NTA Säule. Die beiden Proteinuntereinheiten wurden gemeinsam auf eine Ni-NTA Säule aufgetragen, mit absteigenden Harnstoffkonzentrationen gewaschen und bei ansteigender NaCl- und Imidazolkonzentration von der Säule eluiert. A Betrachtung der Säulenfraktionen unter UV-Licht: die grün fluoreszierenden Coreproteine werden bei 250 mM Imidazol, 0 M Harnstoff und 300 mM NaCl von der Säule eluiert. Je ein Aliquot jeder Fraktion wurde auf einem 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blaufärbung detektiert. B Beide Proteinuntereinheiten werden bei 250 mM Imidazol in vergleichbaren Mengen gemeinsam eluiert. M = Proteinmarker low.

5.2.4. Die gemeinsam eluierten HBc1-149-H₆ und HBc149-GFPct-H₆ Proteine sedimentieren auch zusammen im Sucrosegradienten

Zur Abtrennung der partikulären von den nicht-partikulären Formen wurde das konzentrierte Dialysat auf einem Sucrosegradienten aufgetrennt. Abbildung 5-34 zeigt, dass im Vergleich zum Fusionsprotein HBc149-GFPct-H₆ allein, welches keine deutliche Partikelbande im Sucrosegradienten geliefert hatte (siehe Abbildung 5-31), HBc1-149-H₆ und HBc149-GFPct-H₆ jetzt eine gemeinsame Sedimentation aufweisen. Da es zur Ausbildung einer grün fluoreszierenden Bande im Gradienten gekommen war, musste es theoretisch auch zur Ausbildung von "gemischten" Partikeln gekommen sein. Nach Fraktionierung des Gradienten und nachfolgender Auftrennung der Proteine in einer 15 % SDS-PAGE konnte bestätigt werden, dass sich in den Fraktionen Nr. 5 - 8 beide Proteinuntereinheiten in vergleichbarer Konzentration befanden. Ein Anteil an nicht-assemblierten Dimeren des Corefusionsproteins war weiterhin in den oberen Fraktionen des Gradienten nachweisbar. Trotzdem gab der Sucrosegradient einen ersten Hinweis darauf, dass sich beide Proteinuntereinheiten zu ähnlichen Anteilen in neuen Mischpartikeln zusammengesetzt hatten. Die Fraktionen Nr. 5 - 8 wurden für die weiteren Versuche vereinigt.

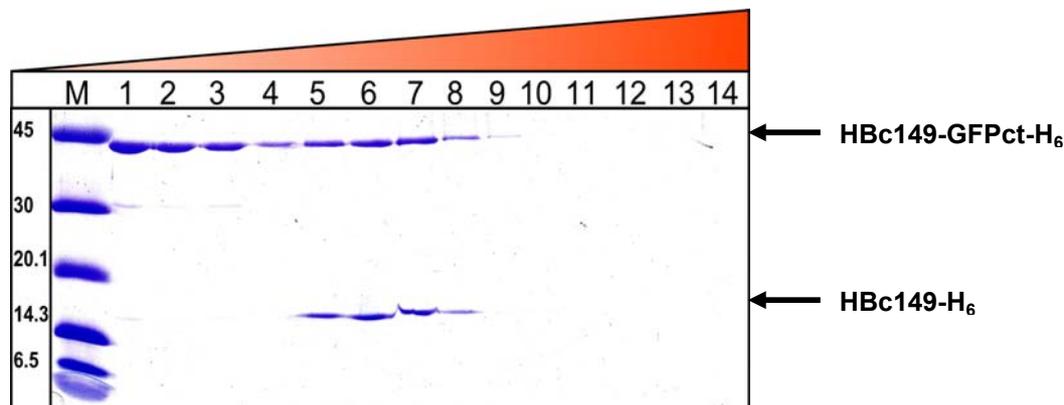


Abbildung 5-34: Die Coreproteine HBc149-GFPct-H₆ und HBc149-H₆ sedimentieren zusammen in einem Sucrosedichtegradienten. Das dialysierte und konzentrierte Eluat der Ni-NTA Säule wurde durch einen Sucrosedichtegradienten zentrifugiert und in 14 Fraktionen geerntet. Die Coreproteine wurden auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blaufärbung detektiert. Ein wesentlicher Anteil der Core-GFP Fusionsproteine liegt nach wie vor in den oberen Fraktionen des Gradienten vor. Eine Anreicherung der Core-GFP Fusionsproteine und der unmodifizierten Coreproteine ist in den Fraktionen 5 - 8 mit vergleichbarer Konzentration nachweisbar. M = Proteinmarker low.

5.2.5. Mischpartikel enthalten beide Proteinuntereinheiten in unterschiedlicher Zusammensetzung

Zur weiteren Charakterisierung wurden die vereinigten Sucrosefraktionen 5 - 8 aus Abbildung 5-34 durch Elektrophorese im nativen Agarosegel untersucht. Als Kontrollen wurden auch HBc149-H₆ und HBc149-GFPct-H₆ mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese zeigte, wie Teil A ohne Zusatz von Ethidiumbromid in Abbildung 5-35 verdeutlicht, bei genauerer Betrachtung zwei abgegrenzte, leuchtend grüne Banden, die von einem helleren, etwas diffus leuchtenden Bereich umgeben waren.

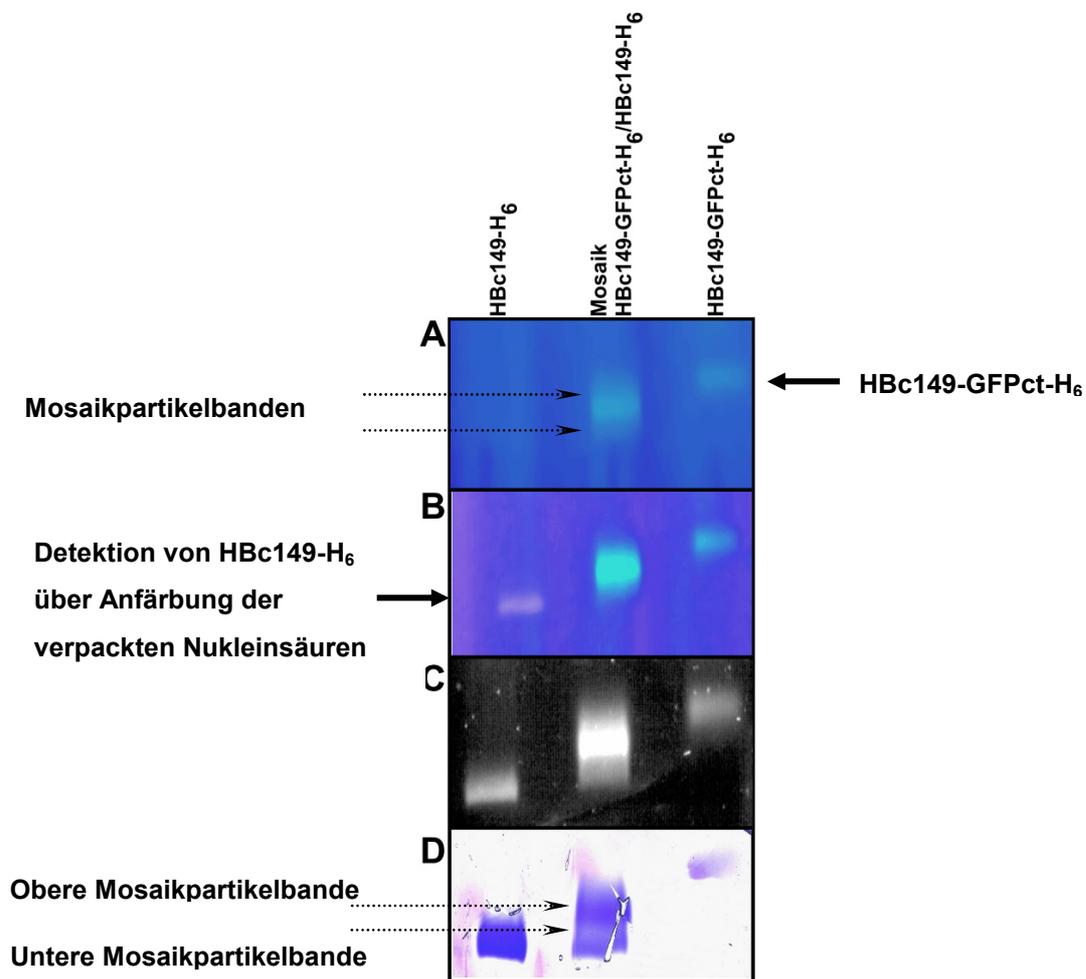


Abbildung 5-35: Laufverhalten der Mosaikpartikel im nativen Agarosegel. Von links nach rechts wurden die Proben von HBc149-H₆, die vereinigten Sucrosegradientfraktionen 5 - 8, welche sowohl HBc149-H₆ als auch HBc149-GFPct-H₆ enthalten, sowie HBc149-GFPct-H₆ auf ein natives Agarosegel aufgetragen. A: Das Fusionsprotein wurde über seine Fluoreszenz im UV-Licht nachgewiesen. B: zeigt die verpackten Nukleinsäuren der HBc149-H₆ Partikel im gleichen Gel nach Färbung mit Ethidiumbromid. C: Schwarzweiß Aufnahme der Gesamtemission. D: Färbung aller aufgetrennten Coreproteine durch Coomassie Blau. Die erhöhte Mobilität der GFP-Fusionsproteine verdeutlicht die Bildung von Mosaikpartikeln.

Das Laufverhalten der Mosaikpartikel unterschied sich sehr deutlich sowohl vom Laufverhalten des HBc149-GFPct-H₆ Konstrukts als auch vom unmodifizierten Coreprotein HBc149-H₆. Durch die mangelnde Partikelstabilität der HBc149-GFPct-H₆ Variante wanderten diese Coreproteine nicht als distinkte Partikelbande, sondern in einer diffusen breiten, hellgrünen Zone durch das Gel. Durch nachträgliche Färbung des Gels mit Ethidiumbromid (Teil B der Abbildung 5-35) ließ sich die mit aufgetrennte HBc1-149-H₆ Probe detektieren. Diese lief weit abgetrennt von den Mosaikpartikeln als schnellere distinkte Bande im Gel. Diese reine Form war in der mittleren Spur auch nach Ethidiumbromidfärbung nicht nachweisbar. Der dennoch enthaltene Anteil an unmodifiziertem Coreprotein hatte aber die Mobilität der Mischpartikel erhöht und somit der HBc1-149-H₆ Probe angeglichen. Nachfolgend wurden alle Coreproteine durch Färbung mit Coomassie Blau detektiert (Teil D). Diese brachte die zwei distinkten Banden der Mosaikpartikel noch deutlicher zum Vorschein.

Eine differenzielle Analyse der Proteinzusammensetzung der erhaltenen Mosaikpartikel wie in 5.2.1 gezeigt durch Western Blot mit dem c/e1 Epitop-spezifischen Antikörper mc312 (vergleiche Abbildung 5-30) konnte nicht durchgeführt werden, da es sich um eine C-terminale Fusion von GFP an das Coreprotein handelte, und der Antikörper auch mit diesem Fusionsprotein reagieren würde. Proben aller Proteine wurden auf einem zweiten Agarosegel erneut aufgetrennt. Die beiden distinkten Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und wie in 4.5.4 beschrieben nach Schmelzen der Agarosestückchen getrennt voneinander auf ihre Proteinzusammensetzung in einer SDS-PAGE untersucht. Das Ergebnis in Abbildung 5-36 zeigt deutlich, dass sowohl die obere als auch die untere, schneller laufende Bande beide Proteinuntereinheiten enthielten, aber in unterschiedlichem Verhältnis zueinander. Die untere Bande enthielt einen deutlich höheren Anteil an unmodifizierten HBc149-H₆ Proteinen. Wahrscheinlich konnten sich diese Mischpartikel zu einer sehr kompakten Partikelform zusammen lagern, die der Form und der Oberflächenladung der reinen HBc149-H₆ sehr nahe kommt. Die Partikel der langsameren, oberen Bande hingegen wurde hauptsächlich aus HBc149-GFPct-H₆ Fusionsproteinen aufgebaut. Der Anteil an unmodifizierten Coreproteinen war wahrscheinlich gerade so groß, dass gerade noch eine Partikelbildung ermöglicht wurde. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich während der *in vitro* Assemblierung die Proteineinheiten beliebig miteinander

kombinieren können. Das Ergebnis weist auch darauf hin, dass schon sehr wenige unmodifizierten HBc1-149-H₆ Einheiten zu einer stabilen Mosaikpartikelform führen können (obere Bande), aber auch Partikel mit einem geringen Anteil an Corefusionsprotein bilden eine eigene Mosaikpartikelform. Der auftretende grüne "Schmier", der beide distinkte Banden umgibt, deutet auf weitere, weniger häufig vertretene Partikelformen hin.

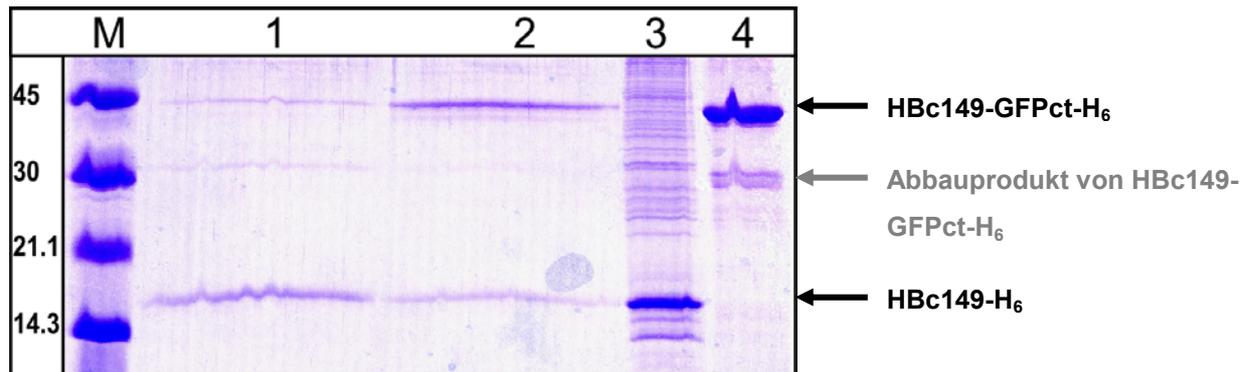


Abbildung 5-36: Die Zusammensetzung der Mosaikpartikel ist variabel. Die untere (Spur 1) und oberer Bande (Spur 2) der im nativen Agarosegel aufgetrennten Mischpartikel wurden aus Gel ausgeschnitten und getrennt in 4x SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Beide Proben (Spur 1 und 2) wurden auf einem 15 % SDS-PAGE neben einem Aliquot der Probe HBc149-H₆ (Spur 3) und HBc149-GFPct-H₆ (Spur 4) aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Blau detektiert. Beide Proteinuntereinheiten (siehe Pfeile), sowie Abbauprodukte von HBc149-GFPct-H₆ waren in den Mosaikpartikeln nachweisbar. M = Proteinmarker low.

5.2.6. Mosaikpartikel zeigen ein mit HBc1-149-H₆ vergleichbares Erscheinungsbild bei Betrachtung im EM

Die vereinigten Proben aus den Sucrosegradientfraktionen 5 - 8 wurde zur Betrachtung im EM weiter konzentriert. Vom Konzentrat wurden wie in 4.4.7 beschrieben ca. 5 µl für eine negativ Kontrastierung mit 2 % Phosphorwolframsäure verwendet. Die Abbildung 5-37 zeigt deutlich, dass es sich um regelmäßige Corepartikel handelt, die zudem einen Außendurchmesser von ca. 31 nm aufweisen, der nur leicht von dem der Wildtyp Partikel HBc1-149 abweicht.

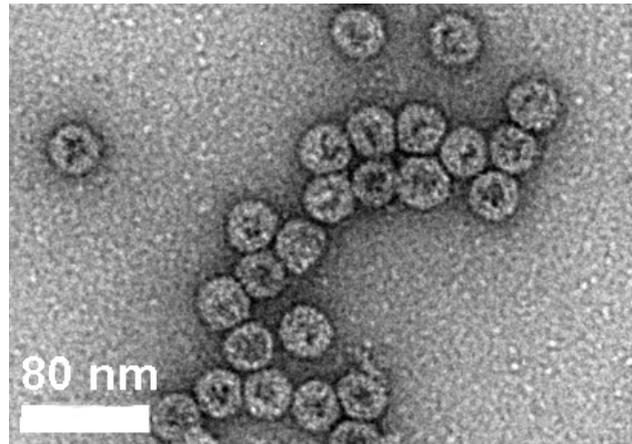


Abbildung 5-37: Die aus HBC149-GFPct-H₆ und HBC149-H₆ *in vitro* assemblierten Mosaikpartikel zeigen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme eine gleichmäßige Struktur. Auffällig ist aber ein deutlich dunkler kontrastierter Bereich im Inneren einiger Partikel. Die durch Sucrosegradient gereinigte Probe wurde mit 2 % Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert und bei einer Vergrößerung von 37000x aufgenommen. Der eingezeichnete Balken in der Aufnahme entspricht 80 nm.

Ein Teil der Kapside zeigt einen dunkel kontrastierten Bereich im Inneren der Partikel. Dieser entspricht „leerem“ Partikelinnenraum, der nicht mit Proteinen gefüllt ist und in den sich daher, bei den vorherrschenden Versuchsbedingungen, das Kontrastmittel einlagern konnte. Negativ kontrastierte Partikel aus unmodifiziertem Coreprotein (hier nicht gezeigt) zeigen im Vergleich dazu einen größeren nicht gefüllten, d.h. kontrastierbaren Innenraum bzw. eine dünnere unkontrastierte Core-Schale. Dieses Ergebnis könnte bestätigen, dass die GFP-Fusionsproteine vollständig in den Innenraum der Partikel verpackt werden, es also nicht zu einer grundlegenden Veränderung der Partikelarchitektur gekommen war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier vorgestellte Methode es erlaubt, Mosaikpartikel aus verschiedenen Coreprotein Varianten *in vitro* zu assemblieren. Am Beispiel von GFP als C-terminales Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von unmodifizierten HBC149-H₆ Coreproteinen auch von einem an sich assemblierungsunfähigen Fusionsprotein stabile partikuläre Formen erhalten werden können.

5.3. Verpackung von Nukleinsäuren in HBV Partikel

Durch die Möglichkeit, C-terminal verkürzte Coreproteine, die eine Fusion des His₆-Peptids enthielten, unter semi-denaturierenden Bedingungen spezifisch an eine Nickelsäule zu binden und die gereinigten Proteine unter nativen Bedingungen wieder zu reassoziieren, ergab sich die Frage, ob diese Methode auch für die Verpackung von Nukleinsäure genutzt werden kann. Die C-terminalen 33 aa des Volllängen HBV Coreproteins HBc183 enthalten vier Blöcke (I - IV) mit zahlreichen Argininresten, welche *in vivo* neben der Polymerase an der Bindung der viralen Nukleinsäuren beteiligt sind.

Die Übertragung auf die gezielte *in vitro* Verpackung von heterologen Nukleinsäuren gestaltet sich aber denkbar schwierig. In bisher verwendeten Expressionssystemen, wie dem auch in dieser Arbeit anfangs verwendeten pPL-System, ließ sich das Volllängen Protein nur mit sehr geringer Ausbeute herstellen. Hier durchgeführte Vorversuche (Daten hier nicht gezeigt) zeigten aber, dass sich dieses effizient im pET-System exprimieren und mit hoher Ausbeute nativ reinigen lässt. Das zweite wesentliche Problem ist die hohe Stabilität dieser Partikel, die eine reversible Dissoziation erschwert. Bei Expression in *E. coli* kommt es zum einen in den Partikeln zur Interaktion der mit verpackten bakteriellen RNA mit den innen liegenden Argininblöcken. Zweitens besteht die Möglichkeit einer Cys183-Cys183 Quervernetzung zwischen den einzelnen Coreprotein Dimeren. Die daraus resultierende extrem stabile Partikelstruktur erfordert drastische Bedingungen für eine Dissoziation. Durch den Einsatz von hohen pH-Werten oder SDS wird aber die native Faltung der Coreprotein zerstört, wodurch keine Reassoziierung mehr möglich ist. Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht, durch den Einsatz von 5 - 6 M Harnstoff und dem Zusatz von reduzierenden Agenzien wie β -Mercaptoethanol und/oder DTT, eine sehr frische Präparation der Variante HBc183-H₆, welche das C-terminal fusionierte His₆-Peptid enthält, vor einer vollständigen Quervernetzung der Dimere im Partikel, an eine mit 6 M Harnstoff zuvor äquilibrierte Nickelsäule zu binden. Dies gelang nur mit begrenztem Erfolg. Nur ein sehr geringer Anteil der Proteine zeigte durch obige Behandlung einen exponierten C-terminalen His₆-Peptid, was dazu führte, dass der Großteil aller Proteine nicht an die Säule gebunden wurde, sondern im Durchfluss nachweisbar war. Auch bei einer Harnstoffkonzentration von über 6 M im Elutionspuffer (siehe 4.5.2), bildeten die eluierten Core Dimere innerhalb

kürzester Zeit wieder vollständige Partikel. Der Anteil an gebundener unspezifischer bakterieller Nukleinsäure, wurde durch diese Prozedur nicht beeinflusst. Auch durch einen massiven enzymatischen Verdau mit verschiedenen Nukleasen wurden die gebunden Nukleinsäuren nicht entfernt. Nach diesen Beobachtungen wurde davon abgesehen, HBc183 für eine *in vitro* Verpackung von Nukleinsäure weiter zu testen. Auch Versuche, eine Variante des Volllängen Coreproteins, bei der zur Verhinderung der Quervernetzung das C-terminale Cys183 zu Serin mutiert ist, zu dissoziieren und für eine Verpackung von Nukleinsäure einzusetzen, wurden vorerst eingestellt.

Die Argininblöcke im C-Terminus des Coreproteins sind in der üblicherweise für HBc-CLPs verwendeten Variante HBc1-149 nicht vorhanden, da sie für eine effektive Assemblierung nicht benötigt werden (Nassal, 1992a; Nassal, 1992b). Zudem bedingt der fehlende C-terminale Bereich eine verminderte Gesamtstabilität der Partikel, die *in vitro* für eine vereinfachte Assoziation und Reassoziaton der CLPs ausgenutzt werden kann.

Der erste Teil des hier beschriebenen Projektes umfasste daher die Herstellung neuer Coreprotein Varianten. Alle Klonierungsschritte wurden freundlicherweise von Michael Nassal durchgeführt. Für die spezifische Bindung von RNA wurde das Konstrukt pET28-amp2-HBc156-H₆ (HBc156-H₆) hergestellt, welches den ersten der vier Argininblöcke der Nukleinsäure-Bindungsdomäne im C-Terminus besitzt und somit die minimale RNA Verpackungssequenz **R₁₅₀RRDRGRS** aufweist. Die Coreprotein Variante pET28-amp2-HBc161-H₆ (HBc161-H₆) enthält einen zusätzlichen zweiten Argininblock (I + II; **R₁₅₀RRDRGRSPRR₁₆₀RT**), welchem die DNA-Bindung zugeschrieben wird (Hatton *et al.*, 1992).

Die schematische Darstellung in Abbildung 5-38 zeigt die Primärsequenzen der Konstrukte HBc156-H₆ und HBc161-H₆ mit den jeweiligen Anteilen der authentischen C-terminalen Nukleinsäurebindungsdomäne, sowie die Lage des fusionierten His₆-Peptids für eine Reinigung der rekombinanten Proteine über Ni-NTA Affinitätschromatographie.

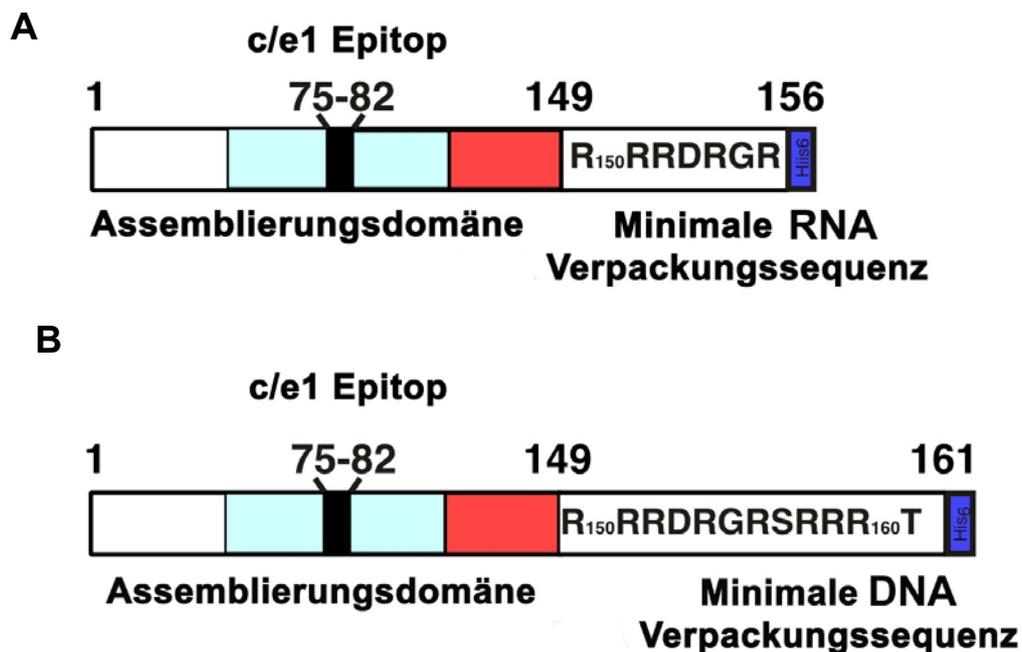


Abbildung 5-38: Konstruktion der Coreprotein Varianten HBc156-H₆ und HBc161-H₆ zur *in vitro* Verpackung von heterologer RNA bzw. DNA. A: HBc156-H₆ enthält eine minimale RNA Verpackungssequenz sowie ein C-terminales His₆-Peptid. B: HBc161-H₆ enthält eine minimale DNA Verpackungssequenz sowie ein C-terminales His₆-Peptid. Vergleiche auch Abbildung 5-51 zur Darstellung der Lage der Argininblöcke im C-Terminus.

Die Proteine wurden wie in 4.5.2 beschrieben über eine semi-denaturierende Ni-NTA Säule aufgearbeitet und die Proteinkonzentration über einen Bradford Assay bestimmt. Die Reinheit der Proteinvarianten wurde über eine SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie Blaufärbung beurteilt. Um sicherzustellen, dass es sich um assemblierungsfähige Coreprotein Varianten handelte, wurde ein Teil der Proteine gegen TN-300 Puffer dialysiert und das Sedimentationsverhalten in einem analytischen Sucrosegradienten beurteilt. Beide Varianten waren voll assemblierungsfähig, zeigten aber wie erhofft eine verminderte Gesamtstabilität: Die gereinigten Partikel konnten durch Zugabe von Harnstoff mit einer Endkonzentration von ca. 4 - 5 M wieder dissoziiert werden, und schienen daher für den Einsatz zur Verpackung von Nukleinsäure in einem *in vitro* Re-Assemblierungssystem im Gegensatz zu HBc183-H₆ gut geeignet zu sein.

5.3.1. Die Verpackung von nicht markierter Nukleinsäure in HBV Partikel ist schwer detektierbar

Für eine erste Abschätzung der Verpackungsfähigkeit der Konstrukte wurde nicht markierte DNA bzw. RNA entsprechend dem Protokoll für markierte DNA (vergleiche 4.6.4) verwendet. Zur Verpackung von DNA wurden 83 µg pAD TriAmpRFPmycSV (10274 bp) und 49 µg pBSII SK(-) (2959 bp) Plasmid DNA in einem molaren Verhältnis von 1 : 0,5 bzw. 1 : 1 mit ca. 400µg HBc161-H₆ Protein in Elutionspuffer A (DLS) (Reinigung über denaturierende Nickelsäule, siehe 4.5.2) gemischt. Zur Verpackung von RNA wurden 285 µg HBc156-H₆ mit 10 µg RNA-Ladder high (200 - 6000 bp) gemischt. Beide Ansätze wurden durch stufenweise Dialyse wieder zu Partikeln assoziiert. Die Dialysate wurden halbiert und je eine Hälfte mit 2 U Micrococcus Nuklease verdaut. Zur Abtrennung der nicht-partikulären Formen wurden beide Proben über einen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die Partikel enthaltenden Fraktionen wurden nebeneinander auf einem nativen 1 % TAE-Agarosegel (+ 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) auf ihren Nukleinsäuregehalt und in einer SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt hin analysiert. Die stark nukleinsäurehaltigen Corepartikel-Fractionen wurden vereinigt, mit Proteinase K verdaut und die verpackte Nukleinsäure mit Phenol extrahiert und danach gefällt. Die extrahierten Nukleinsäuren wurden auf einem TAE-Agarosegel aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung detektiert.

Für die RNA Verpackungsansätze wurden nur sehr schwache Signale erhalten. Die nachfolgende RNA-Extraktion aus den Ethidiumbromid-gefärbten Partikeln erbrachte dann wie erwartet keinerlei nachweisbare RNA. Hier muss zukünftig ein sensitiveres Nachweisverfahren gefunden werden.

Die Analyse der DNA-Verpackungsansätze hingegen zeigte, dass die Verteilung der Nukleinsäure im Sucrosegradienten der Verteilung der Corepartikel entsprach. Die Ethidiumbromidfärbung der nicht mit Nuklease behandelten Proben zeigte, dass nach Auftrennung im Sucrosegradient ein Teil der exogen zugegebene DNA mit den Kapsiden assoziiert vorlag, ein weit größerer Anteil lag hingegen als freie DNA vor. Die mit Nuklease verdauten Proben hingegen wiesen im Vergleich dazu nur eine einzelne distinkte mit Ethidiumbromid anfärbbare Bande und keine freie DNA im Agarosegel auf. Die Nachfärbung des Gels mit Coomassie Blau zeigte, dass die Ethidiumbromid anfärbbaren Banden exakt auf der gleichen Höhe wie die

angefärbten Corepartikel liefen. Die dann aus diesen Partikeln extrahierte DNA zeigte auf einem weiteren Agarosegel ein interessantes Bandenmuster, welches nicht der DNA entsprach, die ursprünglich zur Verpackungsreaktion zugesetzt worden war. Die zirkuläre Plasmid-DNA zeigte nach der Verpackung in HBc161-H₆ wahrscheinlich einen Abbau in kleinere DNA-Fragmente, die mit regelmäßigen Abständen zueinander auftraten. Nach einer Abschätzung betragen diese Abstände ca. 58 bp. Das größte detektierbare Fragment hatte eine Länge von ca. 700 - 800 bp. Eine definitive Aussage über die Entstehung der Fragmente mit relativ definierter Länge ist bisher nicht möglich. Es ist aber wahrscheinlich, dass die DNA in regelmäßigen Abständen mit Coreprotein Dimeren verbunden war, sodass diese Bereiche geschützt waren und die Nuklease nur zwischen den Dimeren schneiden konnte. Es bleibt zu klären, ob heterologe DNA in ein fast vollständiges Kapsid verpackt wird, oder der DNA-Strang wie eine Perlenkette fortlaufend mit Dimeren besetzt wird, die dann zu Kapsiden assemblieren. Die Fragmentierung in sehr kleine DNA-Stücke konnte auch in einem unabhängigen Experiment, in dem mit EcoR I linearisierte Plasmid-DNA für die Verpackung eingesetzt worden war, in abgeschwächter Form beobachtet werden. Zusätzlich musste abgeklärt werden, ob es sich bei den Fragmenten um die ursprünglich zugesetzte DNA oder RNA handelte. Da die Coreprotein Variante HBc161-H₆ sowohl den ersten als auch den zweiten Argininblock enthält, wäre eine Verschleppung von bakterieller RNA nach Zellaufschluss möglich. Die Nukleinsäureproben wurden halbiert und entweder mit DNase I oder mit RNase A behandelt. Nur in der mit RNase A behandelten Probe blieb eine anfärbbare Nukleinsäurebande erhalten, womit geklärt war, dass es sich um verpackte DNA und nicht um RNA handeln musste.

Insgesamt machten aber auch die DNA Verpackungsversuche deutlich, dass die Sensitivität einer Ethidiumbromidfärbung nicht ausreichend war, die Art und Größe der im Kapsid verpackten Nukleinsäure hinreichend aufzuklären. Daher wurde für weitere Versuche die Nukleinsäure vor der Verpackung mit γ -³²P-ATP radioaktiv markiert.

5.3.2. Die Verpackung von radioaktiv markierter RNA

In Vorversuchen wurde deutlich, dass bei der Verpackung von radioaktiv markierter RNA in HBc-156-H₆ ein von der Verpackung von DNA abweichendes Versuchsprotokoll entwickelt werden musste, um die Nuklease-Sensitivität und die

Labilität der RNA zu berücksichtigen. Ohne Zusatz von RNase-hemmenden Substanzen wie DEPC oder ausreichenden Mengen RNasin kam es bei dem Versuch der Verpackung von 5 µg einer markierter peqGold High Range RNA Leiter (200 - 6000 bp) in 370 µg HBc156-H₆ zu einem nahezu vollständigen Abbau der eingesetzten Nukleinsäure. Dies zeigte sich deutlich beim gemeinsamen Auftrag der im Zuge der Reinigung teilweise mit Nuklease behandelten Partikel Proben (vergleiche 4.6.2), mit einem Aliquot des ursprünglichen markierten RNA-Größenmarkers auf einem horizontalen 1,2 % TAE-Agarosegel. Zusätzlich war in diesem Gel ein Aliquot unmarkierter HBc1-149 Partikel mit aufgetragen worden. Nach dem Lauf wurde diese Spur abgeschnitten und das Gelstück mit Coomassie gefärbt. Das restliche Gel wurde nach dem Trocknen im Phospho-Imager analysiert.

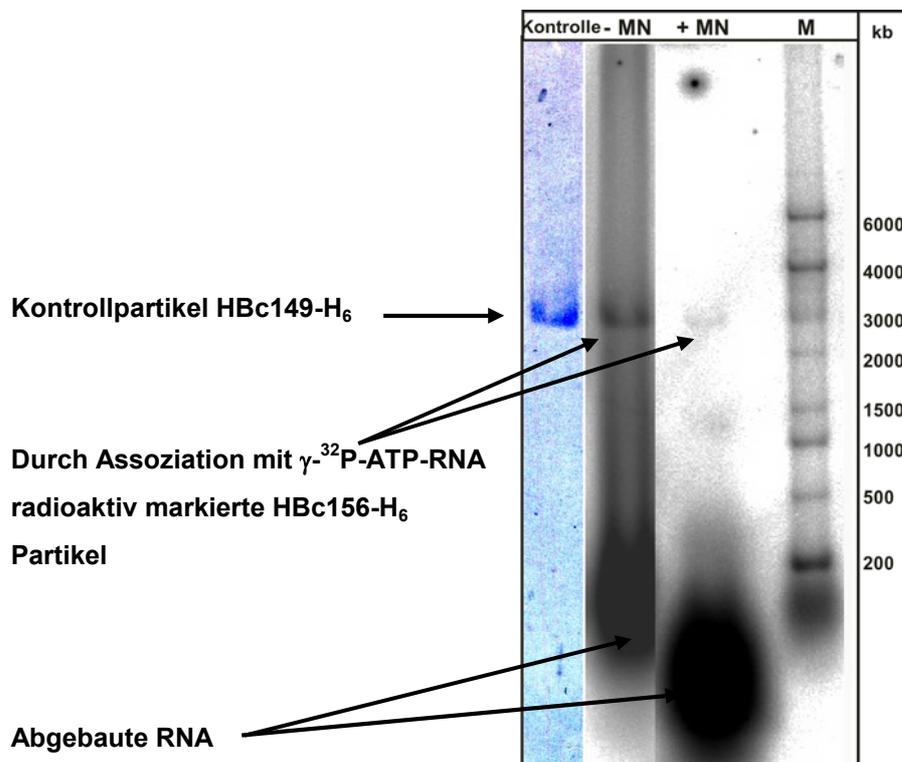


Abbildung 5-39: γ -³²P-ATP markierte RNA kann mit HBc156-H₆ Partikeln *in vitro* assoziiert werden. Sowohl vor (-MN) als auch nach Verdau freier Nukleinsäuren mit Microcococcus Nuklease (+MN) ist markierte RNA detektierbar. Die Kontrolle (links) besteht aus einer mit auf das Gel aufgetragen Probe von HBc149 Partikeln, die nach dem Gellauf mit Coomassie Blau angefärbt wurden. Der Vergleich des Laufverhaltens der HBc149 Partikel mit den radioaktiven Signalen der (-MN)- bzw. (+MN)-Proben zeigt, dass in beiden Proben durch Assoziation mit γ -³²P-ATP-RNA eine distinkte Bande in einer HBc149 Partikel-ähnlichen Höhe erkennbar ist. Der Vergleich mit dem RNA Größenmarker (M) rechts zeigt, dass in (-MN) ein sehr hoher Anteil an abgebauter RNA < 200 bp detektierbar ist, der durch den Einsatz von MN (+MN) in noch kleinere RNA Fragmente verdaut wird.

Abbildung 5-39 veranschaulicht, dass die ursprüngliche RNA-Probe vor der Verpackung noch intakt vorlag (Spur M). Im Gegensatz dazu enthielt die Verpackungsprobe ohne Nukleaseverdau in der (-MN)-Spur einen hohen Anteil an sehr kleinen RNA-Fragmenten, sowie einen „Schmier“. Auf der Höhe der Vergleichsprobe mit den HBc149 Partikeln, etwa in Höhe der 3000 bp Markerbande, fand sich eine distinkte markierte Bande, bei der es sich wahrscheinlich um Partikel-assoziierte γ -³²P-ATP RNA handelte.

Obwohl davon auszugehen ist, dass durch die hohen Harnstoffkonzentration in der Probe keine mit dem Marker vergleichbare Auftrennung der RNA in diesem Gel zu erwarten ist, handelt es sich bei dem „Schmier“ wahrscheinlich um freie, zum Teil abgebaute RNA. Diese freie RNA wird durch die Behandlung der Verpackungsprobe mit Nuklease in der Spur (+MN) weiter verdaut, da die Fragmentgrößen weiter abnehmen. Ein sehr geringer Anteil der distinkten Bande blieb auch nach Nukleasebehandlung erhalten. Die Ausbeute an CLPs, die verpackte, also Nuklease-geschützte RNA enthielten war insgesamt aber sehr gering. Bei der weiteren Analyse der Partikel bzw. der Extraktion der tatsächlich verpackten RNA wurde in einem weiteren analytischen Gel die Vermutung bestätigt, dass nahezu die gesamte markierte RNA während des Versuches abgebaut worden war, da dort auch die ursprünglich eingesetzte RNA kein Bandenmuster, sondern nur noch „Schmier“ über die gesamte Gellänge erkennen ließ.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Nuklease geschützte Verpackung von RNA in HBc-abgeleitete Kapside sehr wahrscheinlich möglich ist. Durch den insgesamt etwas schwierigeren Umgang mit RNA müssen aber andere Versuchsbedingungen gefunden werden, welche die RNA vor einem vorzeitigen Abbau schützen. Von einem weiteren Versuch der *in vitro* Verpackung von RNA in HBc-CLPs während dieser Arbeit wurde abgesehen und die Versuche mit DNA weitergeführt.

5.3.3. Die minimal benötigte Menge an Micrococcus Nuklease für den Verdau von freier DNA ist sehr gering

Da die Verpackung von Nukleinsäuren in intakte Kapside einen vollständigen Schutz vor Nuklease bieten sollte, wurde zunächst getestet, unter welchen Bedingungen ein vollständiger Verdau von freier, nicht-verpackter DNA möglich ist. Eine Überprüfung der eingesetzten Mengen an Micrococcus Nuklease in den durchgeführten

enzymatischen Verdau von nicht-verpackter, freier Nukleinsäuren wurde wie folgt durchgeführt. Eine sehr große Menge γ - ^{32}P -ATP markierter DNA (966990 cpm), entnommen aus der Bodenfraktion eines CsCl Dichtegradienten, die hauptsächlich freie DNA enthielt, wurde auf 9 Proben verteilt, d.h. jeder Ansatz enthielt je ca. 100000 cpm. Durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen und/oder für unterschiedlich lange Zeiten wurde die freie DNA mit Micrococcus Nuklease (MN) bzw. zum Vergleich mit DNase I verdaut.

Die durchgeführten Abwandlungen der Standardversuchsbedingung, 4 Einheiten MN (Units = U) für 30 min bei 37°C (M1), sind in Tabelle 31 aufgeführt. Zur Überprüfung der Bedingungen wurde entweder die Inkubationsdauer auf 60 min ausgedehnt (M2) oder eine deutlich höheren Menge an Nuklease, nämlich 24 U MN für 30 min eingesetzt (M3). Bei Verwendung von DNase I wurden 10 U für 30 min (D1) bzw. 60 min (D2) oder 100 U für 30 min (D3) eingesetzt. Die zugehörigen Kontrollansätze (C1 - C3) enthielten nur die jeweiligen Puffersubstanzen und wurden entsprechend zusammen mit den Reaktionsansätzen inkubiert.

Tabelle 31: Versuchsbedingungen zur Überprüfung des Nukleaseverdaus bei der *in vitro* Verpackung von heterologer DNA in HBc-abgeleitete CLPs.

Ansatz	C1	C2	C3	M1	M2	M3	D1	D2	D3
Zeit [min]	30	30	60	30	30	60	30	30	60
MN [2 U/ μl]	--	--	--	4 U	24 U	4 U	--	--	--
DNase I [100 U/ μl]	--	--	--	--	--	--	10 U	100 U	10 U

Die Proben wurden auf einem SDS-Agarosegel aufgetrennt und die radioaktiven Signale des getrockneten Gels im Phospho-Imager analysiert. Das Ergebnis in Abbildung 5-40 zeigt eindeutig, dass die in den Vorversuchen verwendeten 4 Einheiten Micrococcus Nuklease für einen vollständigen Verdau einer 100000 cpm äquivalenten Menge an freier DNA ausreichte. Der Verdau war zudem nach 30 min vollständig. Beim Einsatz von 10 U DNase I hingegen zeigte sich nach längerer Exposition (hier nicht gezeigt), dass für einen vollständigen Verdau mindestens 60 min bei 37°C verdaut oder mit 100 U Enzym gearbeitet werden musste. Auf den weiteren Gebrauch von DNase I wurde daher verzichtet.

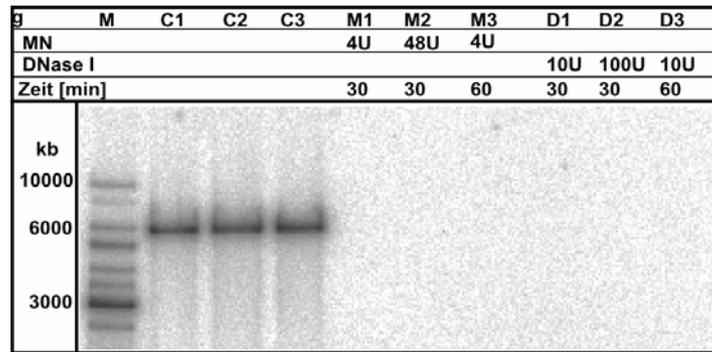


Abbildung 5-40: Die Standardversuchsbedingungen sind hinreichend für einen vollständigen Nukleaseverdau mit *Micrococcus Nuklease*. Alle gezeigten Versuchsbedingungen sind für den Verdau einer 100000 cpm äquivalenten Menge an freier DNA ausreichend. Durch 4 U *Micrococcus Nuklease* für 30 min bei 37°C (vergleiche Spur M1), was den Standardversuchsbedingungen entspricht, konnte die freie DNA restlos verdaut werden.

Im anschließenden Experiment wurde zusätzlich die erforderliche Minimalmenge an *Micrococcus Nuklease* für den vollständigen Verdau einer mit ca. 3800 cpm markierten DNA, welche einer durchschnittlichen DNA-Probe im Verpackungsversuch entsprach, ermittelt. Dafür wurde die DNA mit absteigenden Mengen an Nuklease verdaut. Es wurden eingesetzt: 4 U für 30 min (M1), 0,4 U für 30 min (M2), 0,2 U für 30 min, (M3) 0,2 U für 15 min (M4) und 0,02 U für 30 min (M5). Die Proben wurden wie beschrieben aufgetrennt und detektiert. Das Resultat in Abbildung 5-41 zeigt, dass minimal 0,2 U MN ausreichten, um die eingesetzte Menge an DNA in 15 min vollständig zu verdauen. Lediglich 0,02 U waren für einen vollständigen Verdau nicht mehr ausreichend.

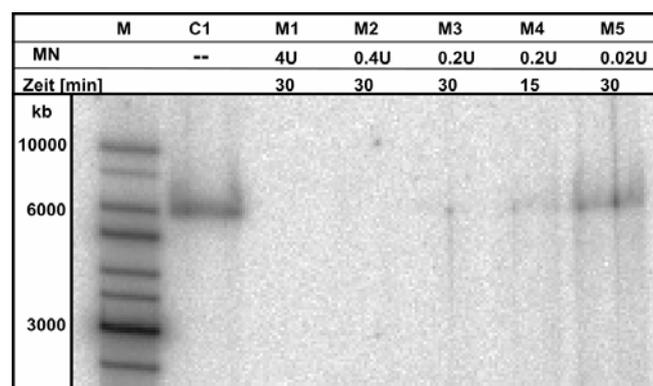


Abbildung 5-41: Zum Nachweis von geschützt verpackter DNA ist 1/20 der eingesetzten Menge an *Micrococcus Nuklease* (MN) hinreichend für einen vollständigen Verdau freier DNA. Bei gleich bleibender Inkubationszeit genügen 0,2 Einheiten MN um eine 3800 cpm äquivalente Menge an freier DNA restlos zu verdauen. Bei kürzerer Inkubationszeiten oder bei einer weiteren Verringerung der MN Menge, sind Spuren freier DNA nachweisbar.

5.3.4. Kleine DNA-Fragmente werden bevorzugt in HBV Partikel verpackt

Da die Vorversuche in 5.3.1 gezeigt hatten, dass eine Verpackung von DNA in HBV Kapside prinzipiell möglich war, sollte die maximale DNA-Fragmentgröße bestimmt werden, die *in vitro* in HBc-abgeleitete CLPs verpackt werden konnte. Zudem hatten die Verpackungsversuche von sowohl zirkulärer als auch linearer Plasmid DNA das bisher ungeklärte Resultat geliefert, dass die aus den Kapsiden isolierte DNA nicht mehr der Ursprungs-DNA entsprachen hatte, sondern in sehr kleine DNA-Fragmente "zerkleinert" worden war. Durch den Einsatz einer Mischung von DNA-Fragmenten verschiedener Längen sollte es möglich sein zu klären, ob kleinere DNA-Stücke bevorzugt verpackt werden bzw. ob große Fragmente nicht oder nur nach Fragmentierung verpackt werden können. Weiterhin sollte geklärt werden, welches die maximale Fragmentgröße für eine erfolgreiche Verpackung ist. Die zur Verpackung eingesetzten 5 µg peqGold 1 kb DNA Leiter (250 - 10000 bp) wurde wie in 4.6.2 beschrieben markiert, im Szintillationszähler gemessen und mit 372 µg HBc161-H₆ zur Verpackung eingesetzt (vergleiche 4.6.4). Das abgezogene Dialysat (ca. 400 µl) wurde auf zwei identischen CsCl Dichtegradienten (1,1 g/cm³ - 1,5 g/cm³; je 400 µl pro Stufe) und für 19 h mit 31000 rpm bei 4°C aufgetrennt. Die Gradienten wurden in je 7 Fraktionen à 312 µl (D1 - D7) abgenommen und gleiche Fraktionen wurden vereinigt. Zur Begutachtung der radioaktiven Verteilung wurden 1/30 Vol. jeder Fraktion für ein natives Agarosegel verwendet.

Die Phospho-Imager Analyse des exponierten Gels ergab folgendes Bild (Abbildung 5-42).

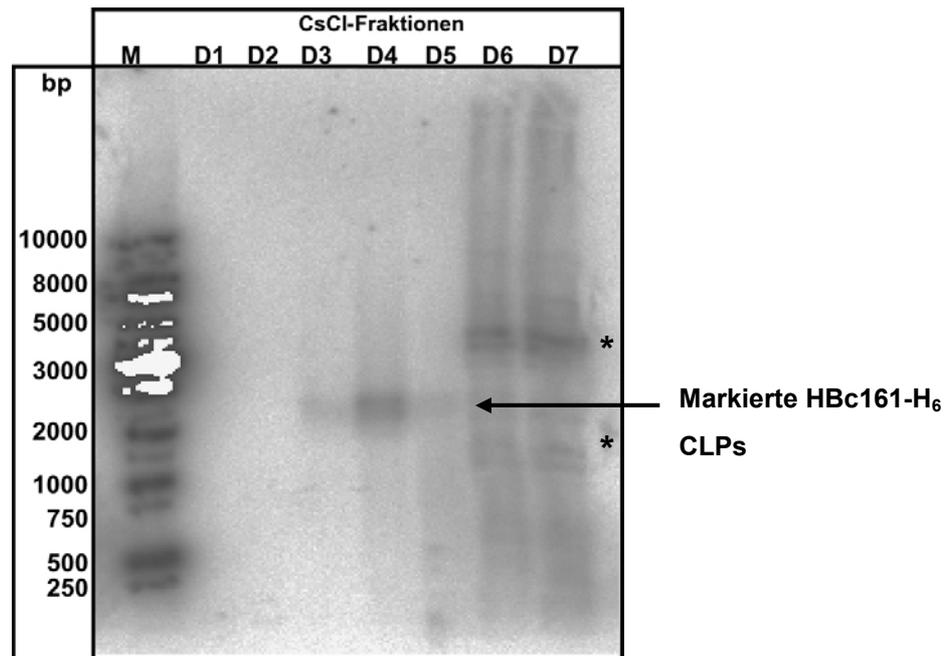


Abbildung 5-42: Durch *in vitro* Assoziation und eventuelle Verpackung von γ - 32 P-ATP DNA-Fragmenten lassen sich radioaktiv markierte Hbc161-H₆ CLPs im CsCl Dichtegradienten anreichern. Die etwas diffusen Banden in den Fraktionen D3 - D5, etwa in Höhe zwischen 2000 und 3000 bp (siehe Pfeil und vergleiche mit DNA Größenmarker M) entspricht markierter DNA, die wahrscheinlich mit den assemblierten CLPs assoziiert ist. Freie DNA (*) wurde fast vollständig in die unteren Fraktionen D6 und D7 abgetrennt. Auf dem nativen Agarosegel wurde je 1/30 Vol. jeder Fraktion aufgetragen.

Der größte Teil der Radioaktivität fand sich in den dichteren Fraktionen D6 und D7, die der Schwimmdichte von freier DNA ungefähr entsprechen. Zusätzlich fand sich eine distinkte Bande in den weniger dichten Fraktionen D3 und D4 und sehr schwach auch in Fraktion D5. Diese Bande entsprach in ihrem Laufverhalten im Agarosegel keiner der Markerbanden, war aber mit den Laufverhalten nativer Partikel vergleichbar.

Zur weiteren Bestätigung wurde 1/40 Vol. der Gradientenfraktionen mittels Western Blot auf die Verteilung an Coreprotein im Gradienten analysiert. Wie in Abbildung 5-43 ersichtlich, befand sich der Hauptanteil des Coreproteins ebenfalls in den Fraktionen D3 und D4; das diffuse Laufverhalten ist wahrscheinlich auf den hohen CsCl-Gehalt der Proben zurückzuführen, da diese ohne vorherige Dialyse auf das Gel aufgetragen worden waren. Für eine ungefähre Abschätzung der Mengen an Coreprotein wurde auf demselben Gel eine Verdünnungsreihe von gereinigten Hbc149-H6 Partikeln mit analysiert. Aus dem Vergleich der erhaltenen Signalstärken lässt sich abschätzen, dass in den Fraktionen D3 und D4 ungefähr 300 μ g Hbc161-

H₆ Coreprotein angereichert wurden. Das Laufverhalten der Banden in Abbildung 5-42 und der Nachweis der Coreproteine in Abbildung 5-43, lässt unter der Annahme, dass es sich den Fraktionen D3 und D4 um assemblierte Partikel handelt, den Schluss zu, dass ca. 80 % der eingesetzten Coreproteine zu CLPs assembliert wurden und zudem mit radioaktiv markierter DNA assoziiert sind.

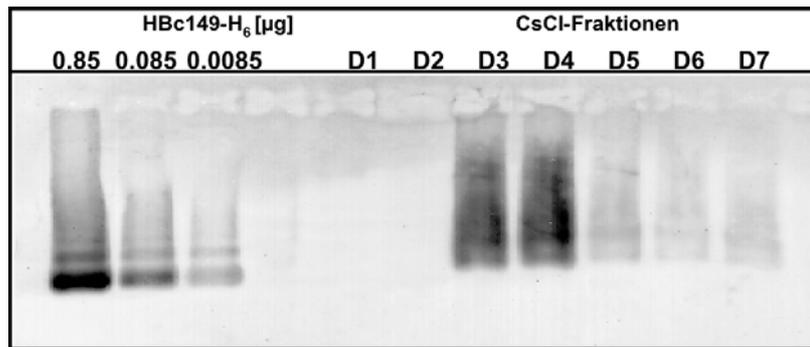


Abbildung 5-43: Der Hauptanteil an Coreprotein HbC161-H₆ reichert sich in den Fraktionen mittlerer Dichte an. Der Gehalt an Coreprotein der CsCl Fraktionen D1 - D7 (1/40 Vol.) wurde durch Vergleich mit 0,85 µg, 0,085 µg und 0,0085 µg gereinigten HbC149-H₆ Partikeln auf einem nativen Agarosegel abgeschätzt. Der Nachweis von Coreprotein erfolgte mit dem Antikörper m-312 und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper über eine Färbung mit BCIP/NBT. In D3 und D4 angereichertes HbC161-H₆ Protein, bei dem es sich um Partikel handeln könnte, läuft durch die hohen CsCl Konzentrationen nicht als distinkte Bande.

Um alle mit markierter DNA assoziierten Partikel mit in die Auswertung einzubeziehen, wurden die Fraktionen D3 - D5 für eine DNA Extraktion vereinigt und dialysiert. Das Dialysat (ca. 1400 µl) wurde halbiert und eine Hälfte mit 2 U *Micrococcus* Nuklease verdaut. Nach Inhibition der Nuklease mit EDTA wurden beide Proben mit Proteinase K verdaut, mit Phenol extrahiert und die DNA aus den Ansätzen gefällt. Die Aktivität der Proben mit und ohne Nukleaseverdau wurde gemessen, wobei die Nuklease-verdauten Proben eine deutlich niedrigere Aktivität aufwiesen. Dieser Aktivitätsverlust wurde durch den enzymatischen Abbau der freien DNA verursacht, die anschließend durch die Fällung aus dem Ansatz entfernt werden konnte. Die extrahierten DNA Proben wurden neben einem markierten DNA Größenmarker und einem Aliquot des ursprünglich eingesetzten Materials, dem Input, bestehend aus den eingesetzten DNA-Mischung und sowie HbC161-H₆ Coreprotein, auf einem 1,5 % SDS-Agarosegel aufgetrennt.

In Abbildung 5-44 werden die DNA Extraktionen zweier unabhängiger Versuche (A und B) gezeigt. Beide Versuchsansätze wurden parallel ohne Nuklease (-MN) bzw. mit Nuklease (+MN) behandelt, wobei Versuchsansatz A etwas länger als Versuchsansatz B mit der Nuklease inkubiert wurde. Die Auswertung der Phospho-Imagersignale zeigt in beiden Versuchsansätzen (A und B) einen deutlichen Unterschied zwischen der (-MN)-Probe und der (+MN)-Probe.

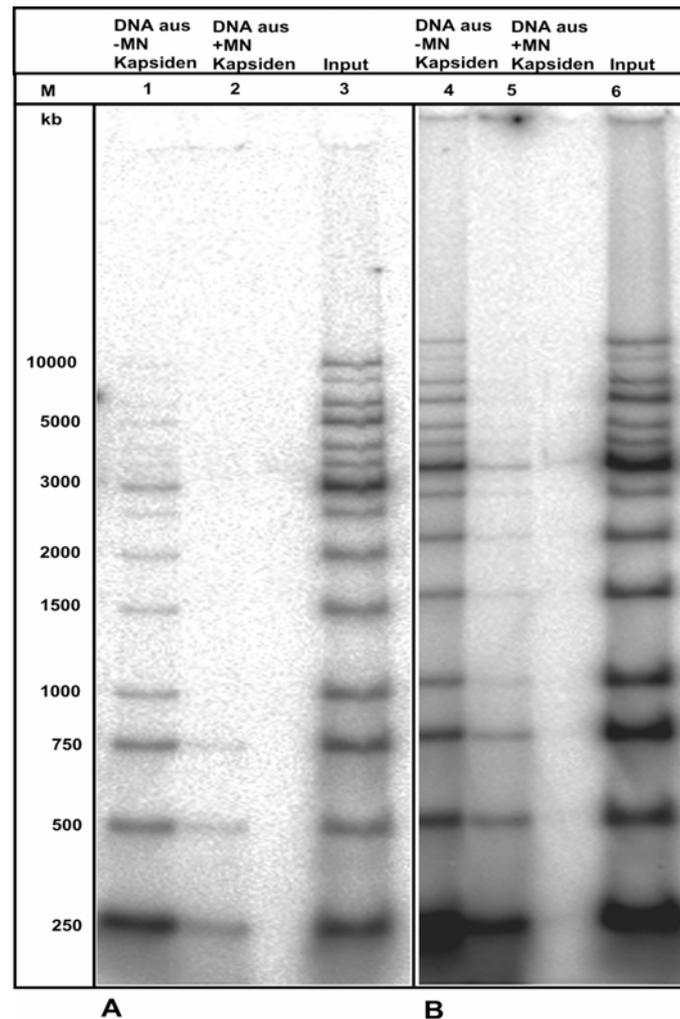


Abbildung 5-44: Verschieden lange DNA-Fragmente können in *in vitro* assemblierte HBc161-H₆ CLPs vor Nuklease geschützt verpackt werden. A und B: In der extrahierte DNA aus CsCl gereinigten, nicht Nuklease (-MN) verdauten CLPs (Spur 1 und Spur 4) können alle eingesetzten DNA-Fragmente des Gesamtansatzes (Input; Spur 3 und Spur 6) wiedergefunden werden. A: Spur 2 zeigt die extrahierte DNA, die auch nach einem Nukleaseverdau, durch die Verpackung in den Kapsiden geschützt vorliegt. Die maximale DNA Länge beträgt unter den angewandten Versuchsbedingungen 750 bp. B: Bei kürzerem Nukleaseverdau können bei einem höheren DNA Einsatz auch längere DNA-Fragmente bis ca. 3 kb (Spur 5) gefunden werden.

Aus den nicht mit Nuklease behandelten Proben lassen sich alle DNA-Fragmente des Gesamtansatzes wieder finden (Spur 1 bzw. Spur 4). Auffallend starke Signale sind für die kleinen Fragmente von 250 bp - 750 bp zu finden. Der enzymatische Verdau im Versuchsansatz A scheint vollständiger zu sein als im Versuchsansatz B. Im Versuchsansatz A können in Spur 2 nur die drei kleinsten Fragmente (250 bp, 500 bp und 750 bp) der DNA Leiter nachgewiesen werden. Im Versuchsansatz B hingegen lassen sich in Spur 5 Fragmente bis zu einer Größe von mindestens 3 kb nachweisen. Im Versuchsansatz B war wahrscheinlich mehr markierte DNA zur Verpackung eingesetzt worden als im Versuchsansatz A, da in allen aufgetragenen Proben eine deutlich höhere Gesamtaktivität nachweisbar war.

Der direkte Vergleich der beiden unabhängigen Versuche macht die Wichtigkeit des Nukleaseverdaues deutlich. Da für die DNA Extraktion möglichst viel Material eingesetzt werden sollte, waren die CsCl Fraktionen D3 - D5 vereinigt worden. Wie Abbildung 5-42 aber verdeutlicht, enthält die Fraktion D5 nur sehr wenig Coreprotein, zeigt aber ein schwaches DNA Signal in Partikelhöhe zwischen ca. 2000 - 3000 bp. Bei genauerer Betrachtung fällt aber auf, dass diese Fraktion einen deutlichen Anteil an nicht-abgetrennter freier DNA kleiner 2000 bp birgt. Es scheint möglich, dass es unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht nur zu einer Verpackung der DNA im Inneren der Partikel kommen kann, sondern darüber hinaus auch zu einer Assoziation der DNA-Fragmente mit der Partikeloberfläche der Cores. Die so assoziierten Nukleinsäuren bleiben dann auch während der Auftrennung im CsCl Gradienten mit den Partikeln verbunden und werden erst durch die Behandlung mit Proteinase K zusammen mit den tatsächlich verpackten Nukleinsäuren freigegeben und verändern so die Zusammenstellung der nachweisbaren Fragmente. Durch die eingesetzte Menge an Nuklease und die gewählte Inkubationsdauer kann aber, wie in 5.3.3 gezeigt, ein unvollständiger Verdau freier DNA ausgeschlossen werden.

Für eine Beurteilung der Größenpräferenz muss berücksichtigt werden, dass die Fragmente im verwendeten Marker nicht in äquimolaren Mengen vorliegen. Überrepräsentierte Fragmente werden bei einer Endmarkierung mit γ -³²P-ATP stärker markiert. Dieses Ungleichgewicht wird bei der logarithmische Auftragung der einzelnen Bandenintensitäten deutlich. Die Aktivitätsverteilung des Gesamtansatzes in Abbildung 5-45 zeigt, dass sowohl die 3 kb Bande als auch die kleineren Fragmente in der DNA Mischung angereichert vorliegen und somit auch eine höhere Aktivität aufweisen.

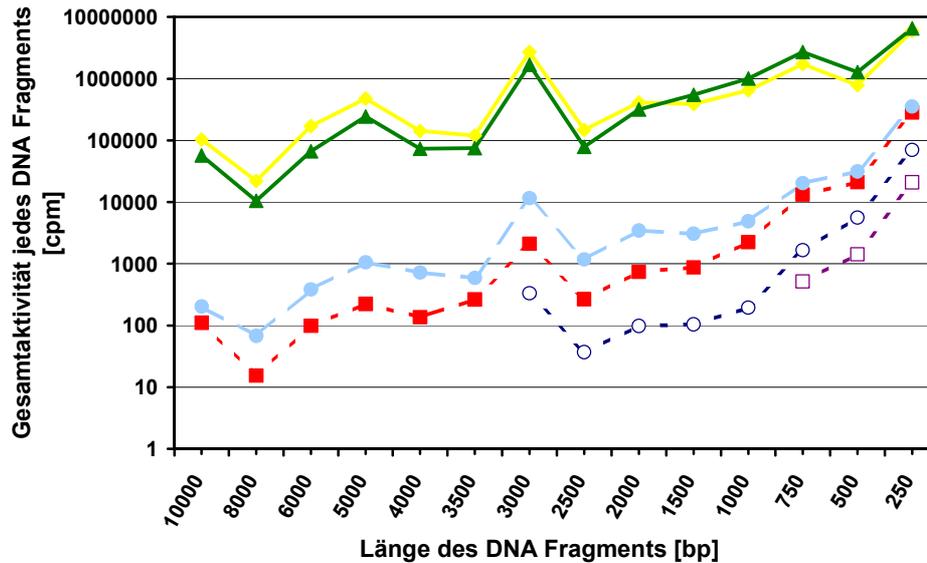


Abbildung 5-45: Bestimmung der Aktivität jeder Bande im Marker. Die Aktivitätsverteilung [cpm] in Abhängigkeit zur Fragmentgröße [bp] zeigt bei den aus CLPs extrahierten DNA Banden eine ähnliche Verteilung wie die der beiden Gesamtansätze, dargestellt durch die gelbe durchgezogene Kurve (-◆-) (Verpackungsansatz A: HBc161-H₆ + DNA mit längerer MN-Inkubation) und grüne durchgezogene Kurve (-▲-) (Verpackungsansatz B: HBc161-H₆ + DNA mit kürzerer MN-Inkubation). Dabei entspricht die rote gestrichelte Kurve (-■-) den Werten der isolierten DNA Fragmente aus CLPs ohne (-MN) Behandlung im Versuchsansatz A bzw. die hellblaue gestrichelte Kurve (-●-) den Werten der isolierten DNA Fragmente aus CLPs ohne (-MN) Behandlung im Versuchsansatz B. Die korrespondierenden Werte der isolierten DNA Fragmente aus CLPs nach (+MN) Behandlung im Versuchsansatz A bzw. B sind durch die lila gepunktete (-□-) bzw. dunkelblaue gepunktete Kurve (-○-) dargestellt.

Die Aktivitätsverteilung der Verpackungsansätze A und B ist der des Gesamtansatzes ähnlich, wobei sich aber eine leichte Tendenz zur Anreicherung von kleinen DNA Fragmenten andeutet. Um dies zu veranschaulichen, wurde jeweils der Quotient der gemessenen Aktivitäten der (-MN)- bzw. (+MN)-Proben zu den korrespondierenden des Gesamtansatzes (A und B) gebildet. Abbildung 5-46 verdeutlicht, dass ohne eine vorangegangene Nukleasebehandlung ((-MN)-Werte im Versuchsansatz A = rote Kurve bzw. (-MN)-Werte im Versuchsansatz B = hellblaue Kurve) DNA Fragmente < 1000 bp mit den HBc161-H₆ Partikeln bevorzugt assoziieren. Aber auch für eine Nuklease-geschützte DNA Verpackung in die Kapside ((+MN)-Werte im Versuchsansatz A = lila Kurve bzw. (+MN)-Werte im Versuchsansatz B = dunkelblaue Kurve) zeichnet sich diese Größenpräferenz ab, die einen Einfluss der Dauer der Nukleasebehandlung erkennen lässt. Abbildung

5-46 verdeutlicht somit, dass in diesem Versuch bevorzugt DNA-Fragmente mit einer Länge von 250 bp bis 750 bp mit HBc161-H₆ assoziiert vorliegen.

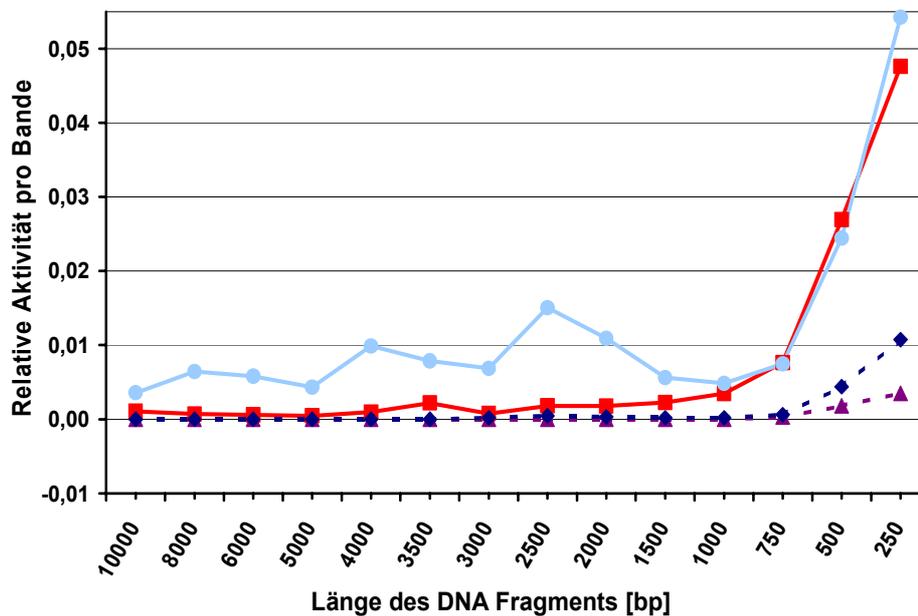


Abbildung 5-46: DNA-Fragmente < 1000 bp assoziieren bevorzugt mit Coreprotein HBc161-H₆. Aus dem Verhältnis der Aktivität der aus CLPs isolierten DNA-Fragmente zur Aktivität der korrespondierenden Fragmente des Gesamtansatzes, lässt sich eine Größenpräferenz für kleinere DNA Fragmente für die Assoziation wie auch für die Nuklease-geschützte Verpackung erkennen. Rote durchgezogene Kurve (-■-): Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs ohne (-MN)-Behandlung geteilt durch die Aktivität des Gesamtansatzes im Versuchsansatz A; Hellblaue durchgezogene Kurve (-●-): Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs ohne (-MN)-Behandlung geteilt durch die Aktivität des Gesamtansatzes im Versuchsansatz B; Lila gepunktete Kurve (-▲-): Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs mit (+MN)-Behandlung geteilt durch die Aktivität des Gesamtansatzes im Versuchsansatz A; Dunkelblaue gepunktete Kurve (-◆-): Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs mit (+MN)-Behandlung geteilt durch die Aktivität des Gesamtansatzes im Versuchsansatz B.

Um eine Aussage über die tatsächlich Nuklease geschützten Fragmentgrößen, abhängig von der Dauer der Nukleasebehandlung geben zu können, wurde das Verhältnis jeder gemessenen Aktivität der gegen Nukleaseverdau geschützten Fragmente zu den korrespondierenden Signalen der Fragmente aus den nicht Nuklease behandelten Partikeln gebildet. Abbildung 5-47 zeigt anschaulich, dass die kleinen Fragmente von 250 bp bis 750 bp nicht nur bevorzugt mit den Coreproteine assoziiert vorliegen, sondern zudem auch favorisiert in den CLPs verpackt werden.

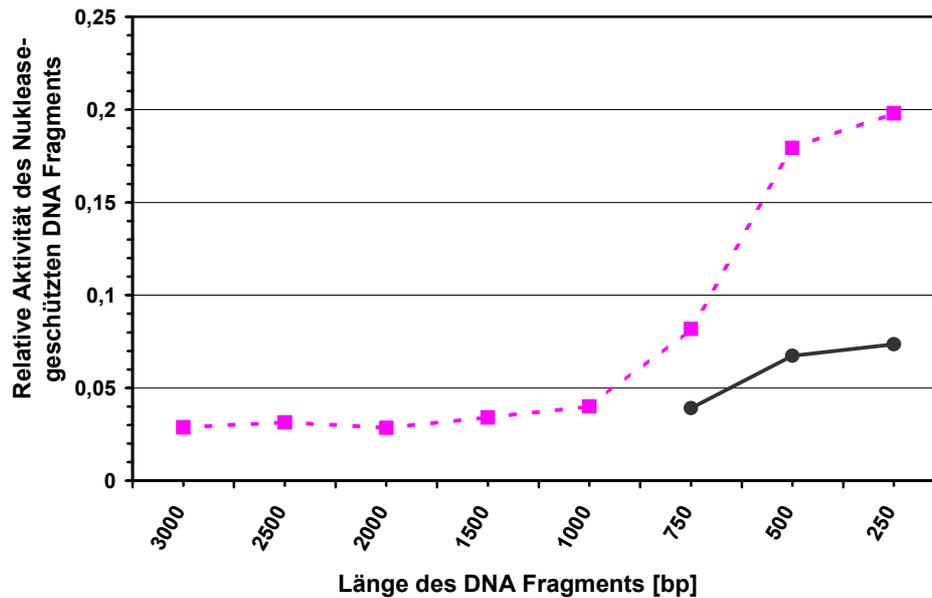


Abbildung 5-47: Die Normalisierung der gemessene Aktivitäten isolierter DNA Fragmente aus HBc161-H₆ CLPs verdeutlicht eine Präferenz zur Verpackung von kleineren DNA-Fragmenten unter 1000 bp. Die rosa gepunktete Kurve (-■-) stellt den Quotienten aus der Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs nach kürzerer (+MN)-Behandlung und der Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs ohne (-MN)-Behandlung im Versuchsansatz A dar. Die graue durchgezogene Kurve (-●-) stellt den Quotienten aus der Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs nach längerer (+MN)-Behandlung und der Aktivität der isolierten DNA Fragmente aus CLPs ohne (-MN)-Behandlung im Versuchsansatz B dar.

Anhand der gemessenen Aktivitäten lassen sich folgende Berechnungen aufstellen. 5 µg einer durchschnittlich 3000 bp langen DNA (hier als Durchschnitt für die DNA Mischung gesetzt) entsprechen 5 pmol 5'-Enden. Bei einer spezifischen Aktivität des zur Markierung verwendeten γ -³²P-ATP von 3 µCi/pmol und einer 100%-igen Markierungseffizienz können maximal 15,81 µCi oder ca. $1,5 \times 10^7$ cpm für den gesamten DNA-Ansatz erzielt werden. Die nach der Markierung gemessene Aktivität der gesamten DNA-Mischung betrug aber nur 3×10^6 cpm, also konnte nur von einer tatsächlichen spezifischen Aktivität von 0,6 µCi/pmol ausgegangen werden. Die nach der Extraktion isolierten und gemessenen Aktivitäten entsprechen demzufolge 0,22 pmol DNA aus nicht (-MN)-behandelten Partikeln und 0,1 pmol DNA aus den mit (+MN)-behandelten Partikeln. Geht man zudem davon aus, dass sich in den verwendeten CsCl Fraktionen assemblierte Partikel befinden, so können von 372 µg eingesetzten Coreprotein Dimeren 294 µg, oder 73,5 pmol Kapsid wiedergefunden werden. Daraus lässt sich schließlich folgern, dass von ca. 700 Kapsiden 1 Kapsid mit DNA, die vor einem Nukleaseverdau geschützt ist, beladen wurden. Tabelle 32

fasst die gemessenen Aktivitäten und die daraus abgeschätzten Ergebnisse der DNA-Verpackung zusammen.

Tabelle 32: Gemessene Aktivität [cpm] und geschätzte Verluste [%] und markierte DNA Enden [pmol] bei der Verpackung von γ -³²P-ATP DNA in HBc-CLPs.

Probe	Gemessene Aktivität [cpm]	Verbliebene Aktivität [%]	DNA Enden [pmol]
Gesamtansatz γ - ³² P-ATP markierte DNA	3.000.000	100	3,0
Isolierte DNA aus Partikeln ohne MN-Behandlung = (-MN)-Probe	254.260	17	0,22
Isolierte DNA aus Partikeln mit MN-Behandlung = (+MN)-Probe	123.000	8,2	0,1

5.3.5. Lineare 5,5 kb DNA Fragmente werden von der Verpackung ausgeschlossen

Wie in 5.3.3 gezeigt, schien es möglich, dass DNA-Fragmente bis maximal 3 kb, also bis zu einer ungefähren HBV-Genomgröße in HBV Kapside *in vitro* verpackt werden können. Um die Ausschlussgröße weiter abzuklären und um auszuschließen, dass die ungleichen molaren Verhältnisse der DNA-Fragmente im Leiter-Mix die fehlende Verpackung von Fragmenten ≥ 3 kb vortäuschten, wurden in einem neuen Ansatz ein DNA-Fragment < 3 kb, das erwiesenermaßen in das HBV Kapsid verpackt wurde und ein zweites DNA-Fragment > 3 kb in äquimolaren Mengen zur Verpackung angeboten. Dafür wurde wie in 4.6.3 beschrieben durch Linearisierung von 5 μ g des Plasmids pCD16+ mit EcoR I ein lineares DNA-Fragment mit einer Größe von 6 kb hergestellt. Die 5'-Enden der DNA wurden mit Phosphatase (SAP) dephosphoryliert und die 5'-Enden durch T4-Phosphonukleotid Kinase und γ -P³²-ATP markiert. Die markierte DNA enthält eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Sal I, wodurch nach Restriktionsverdau mit diesem Enzym zwei DNA-Fragmente mit 5500 bp bzw. 500 bp entstanden. Beide Fragmente weisen durch diese Vorgehensweise jeweils ein γ -³²P-ATP markiertes Ende auf und liegen in äquimolaren Mengen vor. Für die Verpackung wurden 207 μ g HBc161-H₆ eingesetzt. Nach Dialyse des Versuchsansatzes wurde die Probe auf zwei identischen CsCl Gradienten (vergleiche 4.6.4) für 19 h mit 31000 rpm bei 4°C aufgetrennt. Es wurden sieben Fraktionen D1 - D7 abgenommen und je 1/30 Vol. für die Analyse der Verteilung der markierten DNA und der assemblierten und DNA-haltigen Kapside eingesetzt.

Die Abtrennung der freien DNA in Abbildung 5-48 zeigte, dass sich die 5,5 kb Fragmente relativ gut in die darunter liegenden Fraktionen abgetrennt hatten, die 500 bp Fragmente sind hingegen vom Boden nach oben bis in Fraktion D3 verteilt.

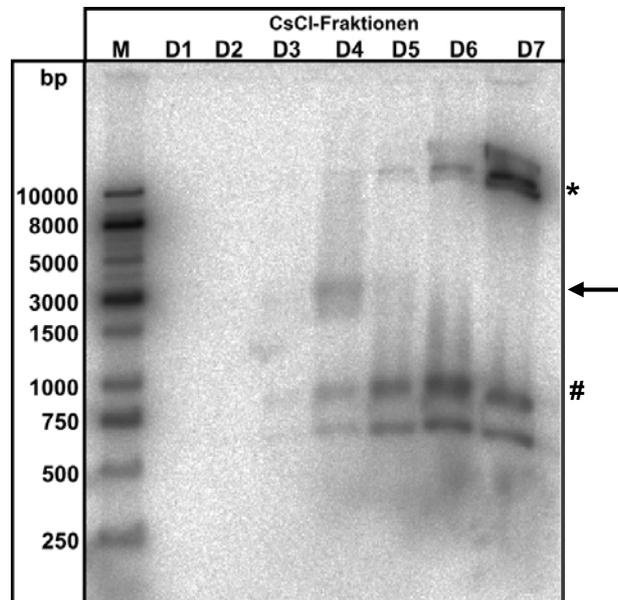


Abbildung 5-48: *In vitro* Verpackung einer Mischung aus 500 bp und 5,5 kb γ - 32 P-ATP DNA-Fragmenten in HBc161-H₆ CLPs. Die markierte, etwas diffuse Bande der Fraktion D4 (sowie teilweise in D3 + D5) etwa in Höhe der 3000 bp Bande (DNA Größenmarker M) entspricht den assemblierten, DNA enthaltenden CLPs (Pfeil). Nur große DNA-Fragmente (*) wurden erfolgreich in die unteren Fraktionen D6 und D7 abgetrennt. Die Partikelfractionen D3 - D5 sind mit freier DNA von 500 bp (#) kontaminiert. Die DNA zeigt durch die hohe Konzentration an CsCl in den Fraktionen ein vom Marker abweichendes Laufverhalten.

Der Kapillartransfer der Proteine und die Detektion mit dem Core-spezifischen Antikörper mc312 konnte diese Verteilung bestätigen. Abbildung 5-49 zeigt, dass sich der Hauptanteil der Coreproteine, und somit wahrscheinlich auch der Kapside mit verpackter DNA in Fraktion D4 befindet. Ein kleiner Anteil ist in den angrenzenden Fraktionen D3 und D5 zu vermuten, das diffuse Laufverhalten ist wahrscheinlich auf den hohen CsCl-Gehalt der Proben zurückzuführen. Die Abschätzung der Proteinmenge ergab, dass sich ca. 95 % der eingesetzten Coreproteine in Fraktion D4 befanden und wahrscheinlich zu DNA-haltigen CLPs assembliert wurden. Daher wurde nur die Fraktion D4 für eine Isolierung der verpackten DNA verwendet.

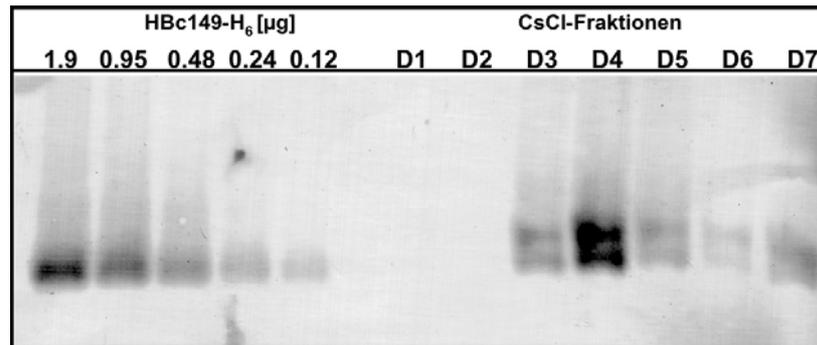


Abbildung 5-49: Effizienz der HBc161-H₆ Anreicherung nach *in vitro* Assemblierung in Gegenwart von markierter DNA. Der Gehalt an Coreprotein in den CsCl Fraktionen D1 - D7 (1/50 Vol.) wurde durch Vergleich mit 1,9 µg, 0,95 µg, 0,48 µg, 0,24 µg und 0,12 µg gereinigten HBc149-H₆ Partikeln auf einem nativen Agarosegel abschätzt. Der Nachweis des Coreproteins erfolgte mit dem Antikörper mc312 und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper über eine Färbung mit BCIP/ NBT. Die in der Fraktion D4 angereicherten HBc161-H₆ Proteine bzw. Partikel laufen durch die hohen CsCl Konzentrationen als Doppelbande.

Ein halber Reaktionsansatz wurde nach Dialyse gegen TN-300 mit einem Überschuss an *Micrococcus* Nuklease (40 U) verdaut. Die Vollständigkeit des Verdau wurde vor dem Aufschluss der Partikel durch Auftrennung eines Aliquots jeder Probe auf einem horizontalen 1,5 % SDS-Agarosegel überprüft (hier nicht gezeigt). Dieses ließ darauf schließen, dass alle kontaminierende freie DNA verdaut worden war. Nach Aufschluss und Extraktion der CLPs mit Phenol zeigte sich nach der Ethanolfällung ein deutliches, radioaktiv markiertes DNA Pellet im Reaktionsgefäß. Der ethanolische Überstand der (+MN)-Probe enthielt einen hohen Anteil an "nicht-fällbarer" DNA, bei dem es sich um kleine, durch den MN-Verdau entstandene DNA Bruchstücke handelte.

Teil A in Abbildung 5-50 zeigt die Analyse der isolierten DNA. Die gefällten DNA Proben (-MN) in Spur 3 und (+MN) in Spur 4 wurden zusammen mit dem Gesamtansatz (HBc161-H₆ Coreprotein plus DNA) vor Dialyse (Spur 1) und dem Gesamtansatz nach Dialyse (Spur 2) neben einem markierten DNA Größenmarker (M) in einem 1,5 % SDS-Agarosegel aufgetrennt. Wie schon in 5.3.3 beschrieben, zeigte sich auch in diesem Versuch, dass ohne einen Nukleaseverdau DNA mit den Partikeln assoziiert bleibt. Dabei kann das 5,5 kb große Fragment mit sehr viel geringerer Intensität als im Gesamtansatz der (-MN)-Probe nachgewiesen werden, das kleine Fragment liegt in sehr viel höherer Konzentration mit den Kapsiden assoziiert vor. Nach Behandlung durch Nuklease verschwindet die assoziierte DNA vollständig und hinterlässt nur das kleine DNA Stück, bei dem es sich um verpackte,

und damit geschützte DNA handeln muss. Um sicherzustellen, dass auch nach sehr langer Exposition keine Signale auftraten, die für die Verpackung des großen DNA Stückes sprechen könnten, wurde zusätzlich zur Phospho-Imager Analyse eine 1-wöchige Exposition des Gels gegen einen Röntgenfilm vorgenommen. Dieses Ergebnis bestätigte, dass keine große DNA stabil verpackt werden konnte.

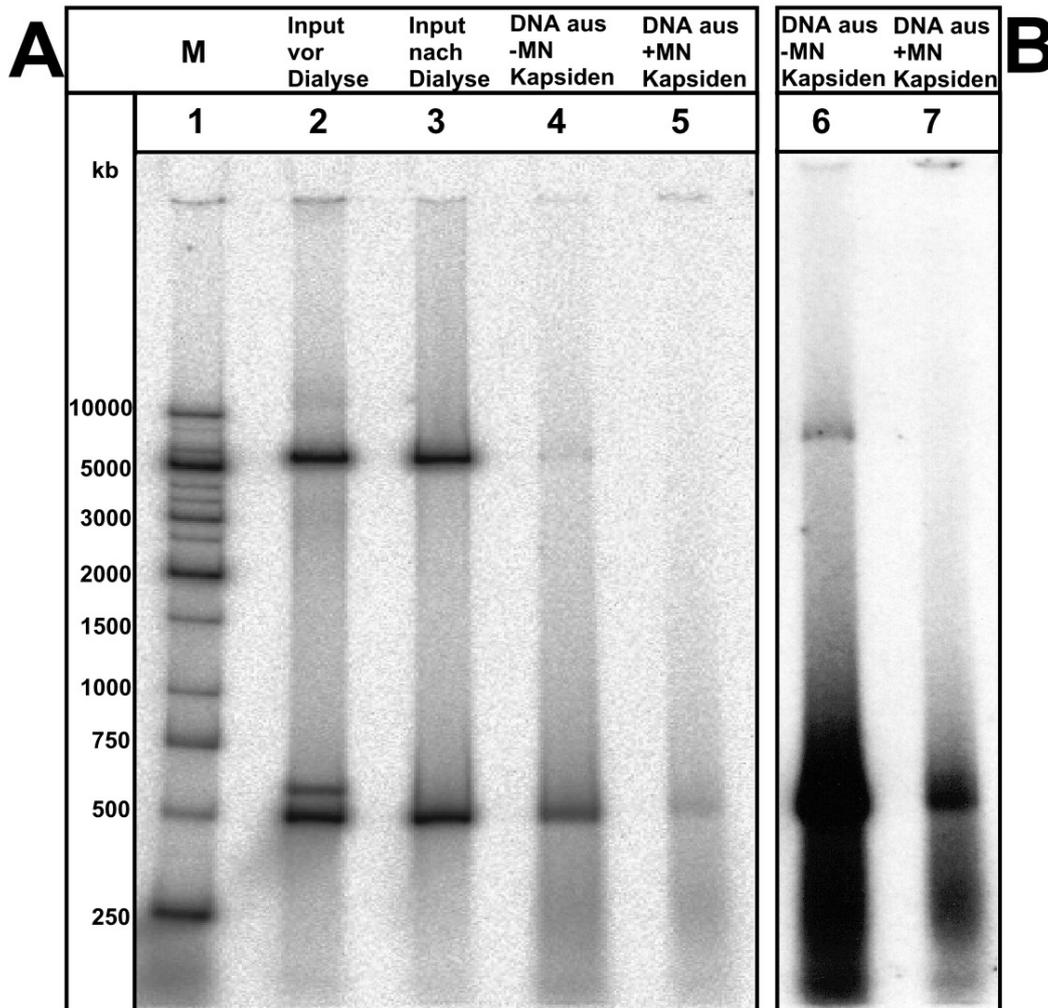


Abbildung 5-50: Ein 5,5 kb DNA-Fragment kann *in vitro* nicht in HBc161-H₆ CLPs verpackt werden. Von links nach rechts A: M = DNA Größenmarker; Im Gesamtansatz vor der Dialyse (Spur 1) ist zusätzlich zu dem 5,5 Kb und 500 bp Fragment eine ca. 550 bp Bande erkennbar, die aber nach Dialyse gegen TN-300 verschwindet (Spur 2). Aus den CsCl gereinigten, nicht Nuklease (-MN) verdauten CLPs (Spur 3) können beide DNA-Fragmente extrahiert werden, Nuklease geschützt ist aber nur das 550 bp Fragment verpackt worden (Spur 4) B: Auch bei längerer Exposition der letzten beiden Spuren, ist kein Signal einer 5,5 kb Bande in der DNA Extraktion der MN behandelten CLPs detektierbar.

Wurden also ein sehr großes DNA-Fragment, dessen Größe die des gesamten HBV Genom deutlich übersteigt und ein kleines DNA-Fragment für die Verpackung in HBc161-H₆ Partikel angeboten, so konnten ausschließlich die kleinen DNA Stücke mit 500 bp verpackt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Volllänge Coreprotein HBc183 für eine spezifische Verpackung von heterogener Nukleinsäure bisher nicht verwendet werden kann, da die Partikel nicht reversibel dissoziiert werden können. Durch die Verwendung von Coreproteinen wie HBc161-H₆, die nur einen Teil der authentischen Nukleinsäurebindungsdomäne enthalten, konnte gezeigt werden, dass die erhaltenen CLPs nicht nur reversibel dissoziiert, sondern in einer *in vitro* Assemblierung auch mit Nukleinsäure bepackt werden können. Für die Verpackung von DNA konnte ein Größenlimit von kleiner 3 kb festgelegt werden. Obwohl eine deutliche Präferenz für kleine DNA-Fragmente nachgewiesen werden konnte, war die berechnete Effizienz der durchgeführten Verpackungsversuche, mit nur einem DNA-enthaltenden Kapsid aus 700 nicht sehr hoch. Das hier beschriebene Verpackungsprotokoll bedarf daher einer Optimierung. Auch die Verpackung von RNA scheint prinzipiell möglich, verlangt aber für die Zukunft die Ausarbeitung eines RNA-spezifischen Protokolls.

5.4. Phosphorylierung von HBV Partikeln

Der Einfluss der Coreprotein Phosphorylierung auf die Nukleinsäurebindung und den Transport des reifen HBV DNA Genoms zum Zellkern ist noch weitgehend unverstanden. Auch die Identität der beteiligten Kinase bzw. Kinasen sind nicht wirklich klar. Um die Phosphorylierung des Coreproteins *in vitro* untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit die kürzlich beschriebene Serin-Arginin-Protein-spezifische-Kinase 1 (SRPK 1) als aussichtsreicher Kandidat einer HBV Coreprotein-spezifischen Kinase (Daub *et al.*, 2002) weiter untersucht. Nach erfolgreicher Expression und Reinigung der Kinase sollte die prinzipielle Fähigkeit von SRPK 1 zur Phosphorylierung unterschiedlicher Coreprotein Varianten überprüft werden. Dies sollte auch Aufschluss über die Zugänglichkeit der C-terminal und somit primär im Inneren der Partikel liegenden Phosphorylierungsstellen geben können.

Durch Verwendung von Coreprotein Varianten, die sich in der Länge des C-Terminus und somit in der Anzahl der potenziellen Phosphorylierungsstellen, unterscheiden,

sollten sich die für eine Phosphorylierung potenziell zugänglichen C-terminale Coresequenzen genauer eingrenzen lassen. Die drei potenziellen Phosphorylierungsstellen sind in Abbildung 5-51 zusammen mit den zuvor beschriebenen Argininblöcken I - IV und der Kernlokalisationssequenz (NLS) schematisch dargestellt. Weiterhin könnte aufbauend auf die Versuche der Nukleinsäureverpackung in HBc-CLPs in Kapitel 5.1, durch ein *in vitro* Phosphorylierungsverfahren der Einfluss auf die spezifische und unspezifische Nukleinsäurebindung an das Coreprotein untersucht werden.

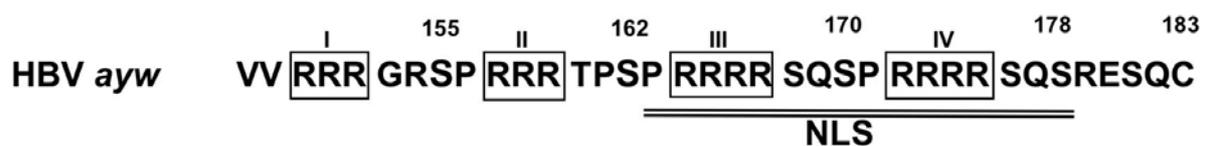


Abbildung 5-51: Das HBV Coreprotein besitzt drei potenzielle Phosphorylierungsstellen im C-Terminus. Durch Variation der Länge des C-Terminus, unterscheiden sich die verwendeten Coreprotein Varianten in der Verfügbarkeit der Serinreste S155, S162 und S170, die hier leicht vergrößert dargestellt wurden, für eine *in vitro* Phosphorylierung.

5.4.1. Native Reinigung der Serin-Arginin-Protein-Spezifischen-Kinase 1 (SRPK 1)

Das in dieser Arbeit für eine *in vitro* Phosphorylierung von HBV und DHBV Coreproteinen verwendete Gen für die SRPK 1 Kinase, wurde von J. P. Kreivi, Uppsala (Schweden) zur Verfügung gestellt. Das von ihm mitgelieferte Protokoll zur nativen Reinigung der Kinase SRPK 1 wurde an die in 2.4.2 beschriebene Methode der Ultraschallreinigung angepasst, da das Konstrukt in BL21*cp Zellen exprimiert wurde. Die Kinase enthielt durch die Klonierung in den Expressionsvektor pRSET-B (Invitrogen) sowohl ein N-terminales His₆-Peptid als auch das Xpress-Epitop. Die native Reinigung erfolgte wie in 4.7.1 beschrieben durch Chromatographie über eine Ni-NTA Säule unter zusätzlicher Verwendung von Protein-stabilisierenden Zusätzen wie 10 % Glycerin und Proteaseinhibitor Cocktail Incomplete. Alle erhaltenen Nickelsäulenfraktionen wurden auf einem 15 % SDS-PAGE auf den Gehalt an SRPK 1 analysiert. Das Gel zeigte, dass die Hauptmenge des Volllängen Proteins von ≥ 92 kDa in den Fraktionen mit 50 mM bzw. 250 mM Imidazol zu finden war, sich aber Anteile schon in den Waschfraktionen mit einer Imidazolkonzentration von 20 mM von der Nickel-Agarose ablösten. Zusätzlich zum Volllängen Protein wurden

noch weitere kleinere Proteinbanden in den Fraktionen offensichtlich. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um Abbauprodukte der Kinase handelte, wurden die Proteine in einem Western Blot über das N-terminale His₆-Peptid mit einem anti-His Antikörper (1:10000) detektiert.

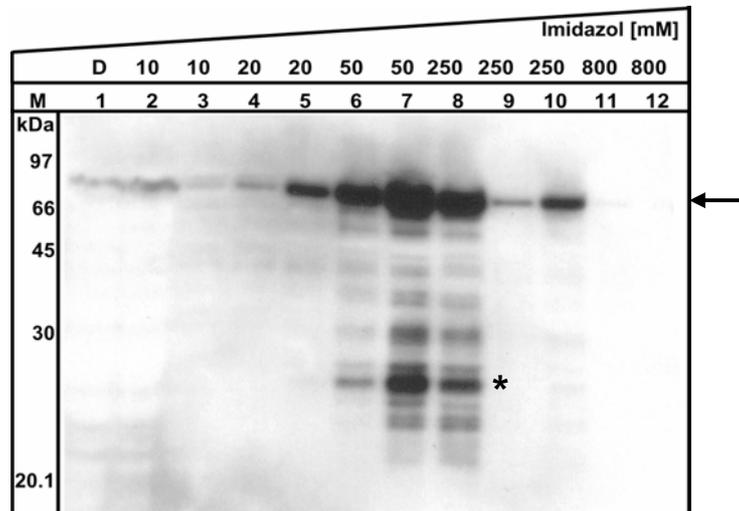


Abbildung 5-52: Native Reinigung der Serin-Arginin-Protein-Spezifischen-Kinase 1 (SRPK 1) über Ni-NTA Säulenchromatographie. Das die SRPK 1 enthaltene Bakterienlysat wurde auf eine Nickelsäule aufgetragen und mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen gewaschen. Alle Fraktionen wurden auf einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membrane geblottet. Die Detektion der Kinase mit einer molekularen Masse von ca. 92 kDa (Pfeil) in den Spuren 5 - 10 erfolgte über Western Blot Analyse mit einem anti-His Antikörper. Der Stern * kennzeichnet das Hauptabbauprodukt des Vollängen Proteins. M = Marker high.

Der Blot bestätigte, dass in den Fraktionen 50.1 - 250.1 Abbauprodukte nachweisbar waren, ein prominentes Nebenprodukt war bei ca. 27 kDa zu finden. Nach Rücksprache mit J. P. Kreivi, der diese Abbauprodukte auch beobachtet hatte, in seinen Versuchen aber keine entscheidende Beeinträchtigung der Kinaseaktivität feststellen konnte, wurden die Fraktionen ab 50 mM bis 250 mM Imidazol (Spuren 5 - 10) vereinigt und für die Aufbewahrung bei -20°C wie in 4.7.1 beschrieben weiter behandelt.

Die Proteinkonzentration der in dieser Arbeit für alle Versuche verwendeten Kinase betrug $0,17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (in SRPK 1-Lagerpuffer: 50 % Glycerin; 20 mM HEPES pH 7,6; 100 mM KCl; 10 mM β -ME).

5.4.2. Zur Phosphorylierung von HBV Partikeln ist keine „Permeabilisierung“ notwendig

Die Aktivität der gereinigten Kinase wurde in einem Vorversuch analysiert. Als Positivkontrolle diente das Konstrukt GFP-Cterm183-H₆, welches den vollständigen C-Terminus des Volllänge HBV Coreproteins inklusive aller Phosphorylierungsstellen (vergleiche Abbildung 5-51) an GFP fusioniert enthält und somit in löslicher und für die Kinase frei zugänglicher Form vorliegt. Als Negativkontrolle wurden Sucrosegradient gereinigte HBc1-149-H₆ Partikel verwendet, bei denen durch die Verkürzung des C-Terminus keine Phosphorylierung möglich sein sollte. Getestet wurde das System mit ebenfalls über Sucrosegradient gereinigten HBc183-H₆ Partikeln. Für den C-Terminus des HBV Coreproteins existieren bisher keine gesicherten Topologiedaten, d.h. es ist nicht bekannt, ob der C-Terminus vollständig im Inneren der Partikel verborgen liegt, oder ob eine, eventuell auch zeitlich veränderliche, Exposition an der Oberfläche der Partikel möglich ist. Daher wurde in einem Teil der Partikel die Corestruktur zeitweilig durch ein drastisches Absenken der Salzkonzentration geschwächt, was zu einer Art „Permeabilisierung“ der Kapside führen soll, wodurch die C-Termini für die Kinase zugänglich werden. Die „Schwächungsreaktion“ (vergleiche 4.7.2) wurde in Anlehnung an M. Kann *et al.* (Kann und Gerlich, 1994), (Kann *et al.*, 1999) durchgeführt, wobei die Reaktionstemperatur nach Verdünnung auf 30 mM NaCl von 42°C auf 37°C gesenkt wurde, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass eine höhere Temperatur zu einem hohen Anteil an zerfallenen Partikeln führte, die sich auch durch Rückführung in Hochsalzbedingungen nicht mehr reassoziieren ließen.

Die Phospho-Imager Analyse zeigte nach Kinasierungsreaktion, dass sich GFP-Cterm183-H₆ wie erwartet *in vitro* mit SRPK 1 phosphorylieren ließ. Für die Standard Phosphorylierungsreaktion (vergleiche 4.7.3) wurden 2 µg Protein mit 0,17 µg Kinase und γ -³²P-ATP für 30 min bei 30°C inkubiert. Durch weitere Erhöhung der Kinasemenge kam es zu einer Abschwächung der Signale, wahrscheinlich bedingt durch den hohen Anteil an Glycerin im Lagerungspuffer, der sich hemmend auf das Enzym auswirkt. Assemblierte HBc183-H₆ Partikel konnten ebenfalls mit 0,17 µg SRPK 1 *in vitro* phosphoryliert werden. Entscheidendes Resultat in diesem Vorversuch war, dass für die erfolgreiche Phosphorylierung eine „Permeabilisierung“ der Partikel nicht notwendig scheint. Um die Effizienz der Phosphorylierung von „permeabilisierten“ versus „nicht-permeabilisierten“ Partikeln weiter zu vergleichen,

wurde der Versuch wiederholt. Zusätzlich wurden auch HBc161-H₆ und HBc171-H₆ Partikel auf ihre Phosphorylierbarkeit hin untersucht. Da der C-Terminus dieser Konstrukte das erste bzw. auch das zweite der drei SPRRR-Motive enthält (siehe auch Abbildung 5-38 bzw. Abbildung 5-51), wäre bei beiden Varianten eine Phosphorylierung prinzipiell denkbar. Um zu zeigen, dass die Phosphorylierungsreaktion reversibel ist, wurde zudem eine Dephosphorylierung mit einer Phosphatase durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die "Calf Intestinal Alkaline Phosphatase" (CIAP) gewählt, die bei Kann *et. al.* zur Entfernung der durch PKC angefügten Phosphatreste verwendet worden war (Kann *et al.*, 1999).

Das Resultat in Abbildung 5-53 verdeutlicht zum Einen, dass es bei der Phosphorylierung von „permeabilisierten“ (Spur 7) und „nicht-permeabilisierten“ (Spur 5) HBc183-H₆ Partikeln zu keinem erkennbaren Unterschied in der Effizienz kommt.

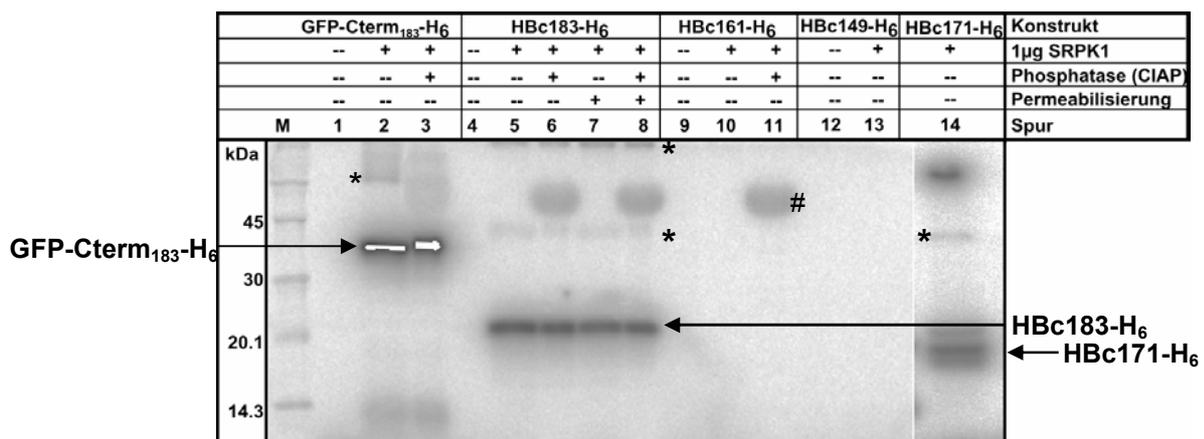


Abbildung 5-53: Eine „Permeabilisierung“ der Partikel hat keinen Einfluss auf die Effektivität der Phosphorylierung. GFP-Cterm183-H₆ mit einem frei zugänglichen C-Terminus (Spur 2) dient als Positivkontrolle, HBc1-149-H₆ als Negativkontrolle der *in vitro* Phosphorylierung durch SRPK 1. HBc183-H₆ Partikel können vor (Spur 5) und nach „Permeabilisierung“ (Spur 7) effektiv phosphoryliert werden. Durch Verlängerung der C-terminalen Domäne kann die Coreprotein Variante HBc171-H₆ (Spur 14) im Gegensatz zu HBc161-H₆ (Spur 10) phosphoryliert werden. Die Phosphatase CIAP ist unter den verwendeten Versuchsbedingungen zur Dephosphorylierung nicht geeignet. Banden mit * sind von unbekannter Herkunft, die nur bei erfolgreicher Phosphorylierung durch SRPK 1 auftreten. # entspricht einem markierten Nebenprodukt, das nur bei Zugabe der Phosphatase auftritt.

Weiterhin kann in Spur 10 für HBc161-H₆ Partikel keine Phosphorylierung festgestellt werden. Ob bei diesem Konstrukt bei vorheriger „Permeabilisierung“ der Partikel die Phosphorylierung möglich gewesen wäre, wurde nicht getestet. Hingegen lassen sich die HBc171-H₆ Partikel (Spur 14), welche die zusätzliche zweite

Phosphorylierungs-Kassette enthalten, effektiv phosphorylieren. Wie erwartet, können HBc1-149-H₆ Partikel (Spur 13) nicht phosphoryliert werden, die Positivkontrolle GFP-Cterm183-H₆ in Spur 2 hingegen zeigt im Vergleich zu den Partikeln deutlich stärkere Signale. Bei keiner der eingesetzten Proben, auch nicht am frei zugänglichen C-Terminus der Positivkontrolle GFP-Cterm183-H₆, konnte unter diesen Versuchsbedingungen eine Dephosphorylierung durch das Enzym CIAP festgestellt werden. Bei Zugabe der Phosphatase waren im Gel dunkle, wolkenartige Banden unbekannter Herkunft, mit einer Größe von > 40 kDa erkennbar (vergleiche Spur 3, 6, 8 und 11). Für eine endgültige Abklärung der Eignung von CIAP zur Dephosphorylierung müsste eventuell der pH-Wert angepasst werden und/oder die Kinase nach der Reaktion aus dem Versuchsansatz entfernt werden.

5.4.3. GFP-Cterm183-H₆ kann durch Koexpression mit SRPK 1 reversibel phosphoryliert werden

Yue *et al.* hatten gezeigt, dass bei Koexpression von SRPK 1 in *E. coli* das mit exprimierte Protein ASF/ SF2 phosphoryliert wird (Yue *et al.*, 2000). Daher war es denkbar, dass auch andere Proteine durch Koexpression mit SRPK 1 in *E. coli* phosphoryliert werden können. Aus diesem Grund wurde GFP-Cterm183-H₆ zusammen mit SRPK 1 (Klon a2) in *E. coli* koexprimiert. Zur Expression von SRPK 1 existierten zwei identische Schwester-Klone des Plasmids pRosetta-SRPK 1-H₆ (Klon a2 und Klon a5), wobei die Intaktheit der jeweiligen Kinase zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt war. An Hand von GFP-Cterm183-H₆ x a2 wurde getestet, ob die aus den Bakterienzellen isolierten Proteine bereits vollständig phosphoryliert waren und somit eine weitere Phosphorylierung durch exogene SRPK 1 verhindert wurde. Die Reversibilität der Kinasereaktion wurde erneut durch den Einsatz einer Phosphatase untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine alkalische Phosphatase aus *E. coli* der Firma Sigma (# P4252) getestet. Um nachzuweisen, dass es sich in den durchgeführten Versuchen um eine Phosphorylierung assemblierter Kapside handelte, wurden die phosphorylierten Proben zusätzlich zur SDS-PAGE auf einem nativen Agarosegel aufgetrennt.

Zusätzlich sollte in einem weiteren Versuchsansatz untersucht werden, ob HBc183-H₆ Partikel durch das angefügte His₆-Peptid eine artifizielle Veränderung der Topologie der Phosphorylierungsstellen aufweisen, welche die *in vitro*

Phosphorylierung, wie in Abbildung 5-53 gezeigt, ermöglichen konnte. Um diese Frage zu klären, wurden neben HBC183-H₆ auch HBC183 Partikel ohne His₆-Peptid *in vitro* phosphoryliert.

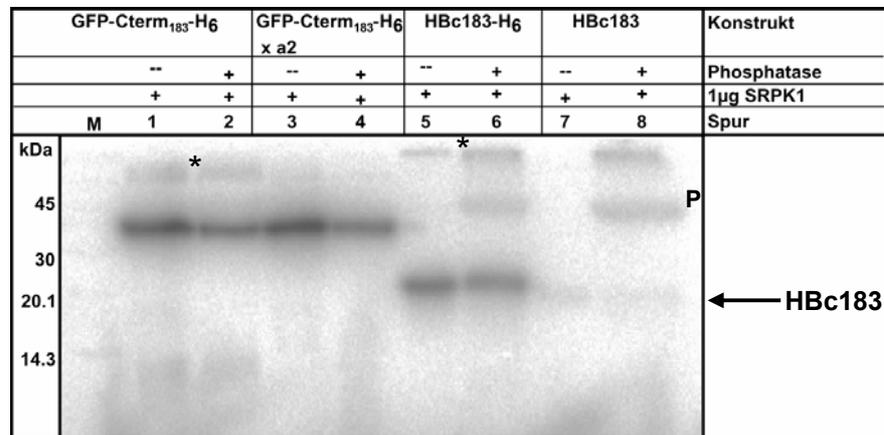


Abbildung 5-54: HBC183-H₆ Partikel werden durch das C-terminale His₆-Peptid besser durch SRPK 1 phosphoryliert. HBC183 Partikel können mit geringer Effektivität phosphoryliert werden (Spur 7; Pfeil). Eine vollständige Dephosphorylierung der phosphorylierten Proben GFP-Cterm183-H₆ (Spur 2), GFP-Cterm183-H₆ x a2 (Spur 4), HBC183-H₆ (Spur 6) und HBC183 (Spur 8), durch die *E. coli* Phosphatase #P4252 ist nicht möglich. Nur eine geringe Abnahme der Bandenintensität ist detektierbar. GFP-Cterm183-H₆ x a2 kann durch die exogene Kinase weiter phosphoryliert werden. Mit * sind unspezifische Banden gekennzeichnet; P entspricht einem markierten Nebenprodukt, das nur bei Zugabe der Phosphatase auftritt.

Die durch Koexpression mit SRPK 1 phosphorylierten Proteine GFP-Cterm183-H₆ x a2 verdeutlichen in Abbildung 5-54 im direkten Vergleich zu GFP-Cterm183-H₆, dass eine weitere Phosphorylierung durch die exogene zugegebene Kinase möglich ist. Dies lässt den Schluss zu, dass GFP-Cterm183-H₆ x a2 in *E. coli* nicht vollständig phosphoryliert wird, oder die Proteine bei Reinigung trotz Zugabe des Phosphatase-Inhibitors Phosphatreste verlieren können. In dieser Autoradiographie der SDS-PAGE kann eine vollständige Dephosphorylierung der phosphorylierten Proben GFP-Cterm183-H₆ (Spur 2), GFP-Cterm183-H₆ x a2 (Spur 4), HBC183-H₆ (Spur 6) und HBC183 (Spur 8), durch den Einsatz der *E. coli* Phosphatase #P4252 nicht festgestellt werden. Im Vergleich zum zuvor verwendeten CIAP (vergleiche Abbildung 5-53) kann nun aber eine geringe Abnahme der Bandenintensität detektiert werden.

Abbildung 5-55 zeigt dazu auch die Autoradiographie des nativen Agarosegels im Vergleich. Die Analyse beider Gele verdeutlicht, dass sich die HBC183 Partikel ohne

His₆-Peptid auch phosphorylieren lassen. Der Vergleich der Spur 7 mit Spur 5 in Abbildung 5-54 und von Spur 11 mit Spur 8 in Abbildung 5-55 veranschaulicht aber eine deutlich schlechtere Effizienz der Variante ohne His₆-Peptid.

GFP-Cterm ₁₈₃ -H ₆			GFP-Cterm ₁₈₃ -H ₆ x a2			HBc183-H ₆			HBc183			Konstrukt
--	--	+	--	--	+	--	--	+	--	--	+	Phosphatase
--	+	+	--	+	+	--	+	+	--	+	+	1µg SRPK1
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Spur

Abbildung 5-55: HBc183-H₆ Partikel werden deutlich besser phosphoryliert als HBc183 Partikel. Die *in vitro* phosphorylierten Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Die Phospho-Imager Analyse zeigt, dass GFP-Cterm183-H₆ (Spur 2 + 3) und GFP-Cterm183-H₆ x a2 (Spur 5 + 6) als relativ diffuse Wolken im Agarosegel laufen. Durch die Phosphorylierung wird bei GFP-Cterm183-H₆ und GFP-Cterm183-H₆ x a2 eine sichtbare Veränderung der Mobilität (M+) verursacht, der durch die Wirkung der Phosphatase wieder aufgehoben wird (M-). Eine Veränderung des Laufverhaltens der phosphorylierten Proben HBc183-H₆ (Spur 86) und HBc183 (Spur 11) gegenüber den dephosphorylierten Partikeln (Spur 9 bzw. Spur 12) ist kaum detektierbar.

Um Fehler bei der Beladung des Gels ausschliessen zu können, wurden die verwendeten Proteinmengen der HBc183 Partikel und HBc183-H₆ Partikel nachträglich durch Western Blot Analyse mit einem Antikörper (mc275) bestimmt, der spezifisch mit nativen Corepartikeln reagiert. Abbildung 5-56 bestätigt, dass vergleichbare Mengen der Partikelproben auf das Gel aufgetragen worden waren. Zudem sind im gezeigten Western Blot leichte Veränderungen der Mobilität der verschiedenen Partikel erkennbar. Durch Phosphorylierung mit SRPK 1 zeigen die HBc183-H₆ Partikel in Spur 2 und die HBc183 Partikel in Spur 5 ein geringfügig schnelleres Laufverhalten im Agarosegel. Durch den Einsatz der alkalischen Phosphatase wird die Veränderungen der Mobilität wieder aufgehoben. Die dephosphorylierten Proben (Spur 3 und Spur 6) weisen ein Laufverhalten auf, das identisch mit den ursprünglich nicht-phosphorylierten Proben ist. Bei direkter Exposition des nativen Agarosegels (vergleiche Abbildung 5-55) ist diese minimale Veränderung des Laufverhaltens weniger gut erkennbar. Bei Auftrennung der

Proben in der SDS-PAGE (vergleiche Abbildung 5-54) kann die Dephosphorylierung durch eine minimale Abnahme der Bandenstärke (in Spur 2, 4, 6 und 8) bestätigt werden.

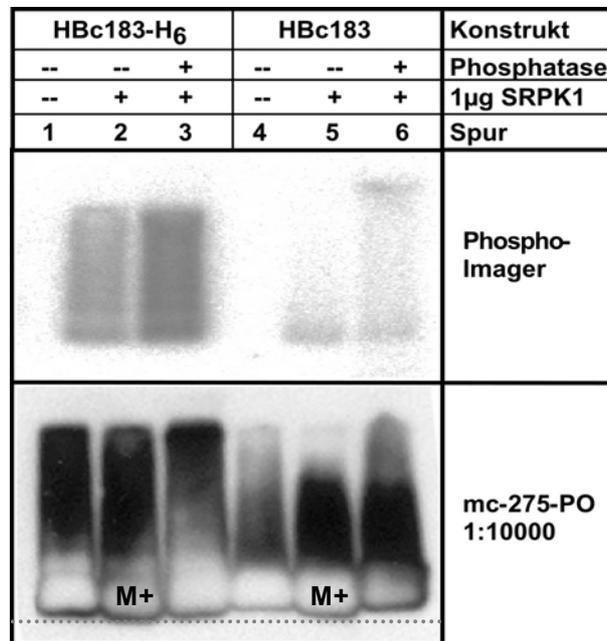


Abbildung 5-56. Die Phosphorylierung durch SRPK 1 verursacht eine minimale und umkehrbare Veränderung der Mobilität im nativen Agarosegel. Western Blot Analyse (unten) der nativen phosphorylierten bzw. dephosphorylierten HBc183-H₆ und HBc183 Partikel mit Partikel-spezifischem Antikörper mc275: Die Veränderungen der Mobilität (M+) ist in der Phospho-Imager Exposition (oben) nicht erkennbar.

5.4.4. Die mit Coreprotein HBc183 koexprimierte Kinase SRPK 1 zeigt *in vitro* weiterhin Phosphorylierungsaktivität.

Da laut Daub *et al.* SRPK 1 an den C-Terminus des HBV Coreproteins bindet (Daub *et al.*, 2002), war es möglich, dass bei Koexpression beider Proteine SRPK 1 zumindest teilweise mit den Partikeln assoziiert vorliegen würde und sich dadurch zusammen mit dem Coreprotein reinigen lässt. Es bliebe dann zu testen, ob die isolierte Kinase immer noch Enzymaktivität besitzt, d.h. dass durch exogene Zugabe von ATP eine weitere Phosphorylierung an den Coreproteinen möglich ist. Für diese Fragestellungen wurden die Plasmide pET28-HBc1-183 und pRosetta-SRPK 1-H₆ (Klon a2) gemeinsam in BL21* Zellen transformiert. Die Expression des HBV Wildtyp Coreproteins HBc183 und der Kinase SRPK 1 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Reinigung der Proteine erfolgte nach Standardprotokoll (siehe 4.4.2) unter ständiger Anwesenheit des Phosphatase-Inhibitors β -Glycerophosphat

weiterhin aktiv ist (Spur 5). Die Corepartikel müssen für die Phosphorylierung nicht „permeabilisiert“ werden, sondern zeigen danach im Gegenteil eine eher schlechtere Phosphorylierung (Spur 6). In keiner der Kontrollproben ist eine vergleichbare Aktivität nachweisbar. Um sicherzustellen, dass die im Versuch verwendeten Proteinmengen vergleichbar waren, wurde das SDS-Gel nach Phospho-Imager Analyse wieder vom Whatmanpapier abgelöst und mit Coomassie Blau nachgefärbt (unterer Teil). Beladungsunterschiede konnten dadurch ausgeschlossen werden.

Die Autoradiographie des entsprechenden nativen Agarosegels in Abbildung 5-58 zeigt prinzipiell ein vergleichbares Ergebnis (oberer Teil).

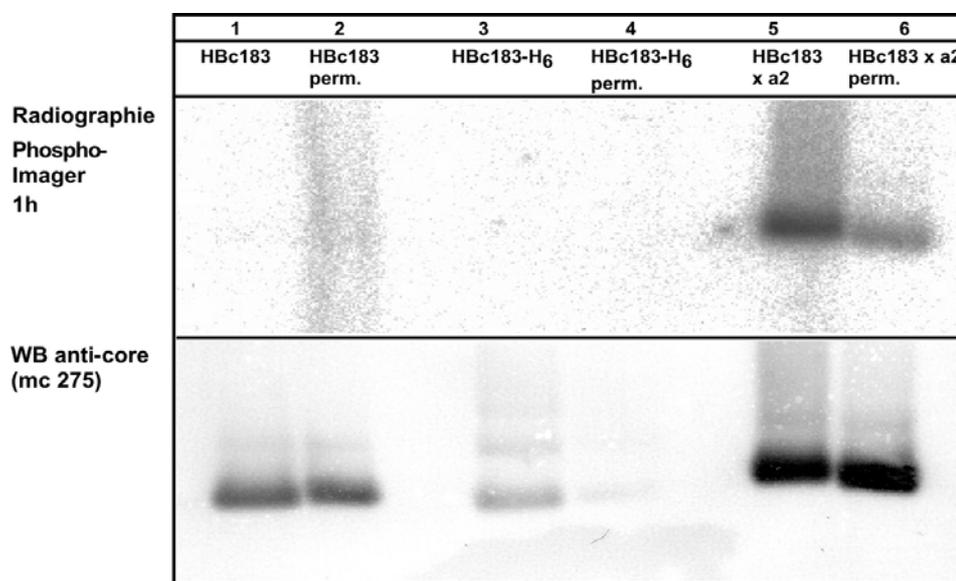


Abbildung 5-58: HBc183 x SRPK 1(a2) Partikel ohne vorherige „Permeabilisierung“ (Spur 5) können besser phosphoryliert werden als vergleichbare Mengen der „permeabilisierten“ Form (Spur 6). Nur bei Koexpression von SRPK 1 ist eine Phosphorylierungsaktivität nachweisbar, alle Kontrollproben sind negativ (Spur 1 - 4). Alle Proben wurden auf zwei identischen nativen Agarosegelen aufgetrennt. Ein getrocknetes Gel wurde im Phospho-Imager analysiert, das zweite durch Kapillartransfer geblottet. Die Proteinmengen wurden mit einem Partikel-spezifischen Antikörper (mc275) und einen AP-gekoppelten Sekundärantikörper und Färbung mit BCIP/ NBT bestimmt.

In den Kontrollansätzen kann keine Phosphorylierung gefunden werden. „Nicht-permeabilisierte“ HBc183 x SRPK 1(a2) Partikel sind deutlich besser phosphoryliert als die „permeabilisierten“ HBc183 x SRPK 1(a2) Partikel. Die nachfolgende Western Blot Analyse mit einem partikel-spezifischen Primärantikörper (mc275) belegte, dass die auf das Gel aufgetragenen Mengen beider Formen (Spur 5 und 6) vergleichbar gewesen waren (unterer Teil von Abbildung 5-58). Die aufgetragenen Mengen der

Kontrollproben (Spur 1 - 4) waren aber deutlich niedriger, besonders die „permeabilisierten“ HBc183-H₆ Cores in Spur 4 waren kaum noch detektierbar. Die nachgewiesene schlechtere Phosphorylierung der „permeabilisierten“ Partikel könnte darauf hindeuten, dass durch die durchgeführte Schwächung der Partikelstruktur, die Kinase inaktiviert oder aus der Proteinreinigung entfernt wurde.

5.4.5. Die koexprimierte Kinase ist mit dem HBV Coreprotein eng assoziiert

Die zuvor beschriebenen Experimente zeigten, dass nur nach Koexpression von SRPK 1 eine mit den Corepartikeln assoziierte Kinaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Für einen direkteren Nachweis der koexprimierten Kinase in der HBc183 x SRPK 1(a2) Probe wurde der in Abbildung 5-58 gezeigte Blot des nativen Agarosegels gestrippt (vergleiche 4.3.4.2) und die immunologische Detektion mit dem SRPK 1-spezifischen Antikörper anti-Xpress durchgeführt. Dabei konnten wie in Abbildung 5-59 gezeigt, zwei Banden in exakt der Höhe der beiden Corebanden von HBc183 x SRPK 1(a2) (Spur 5) bzw. der „permeabilisierten“ Form (Spur 6) nachgewiesen werden.

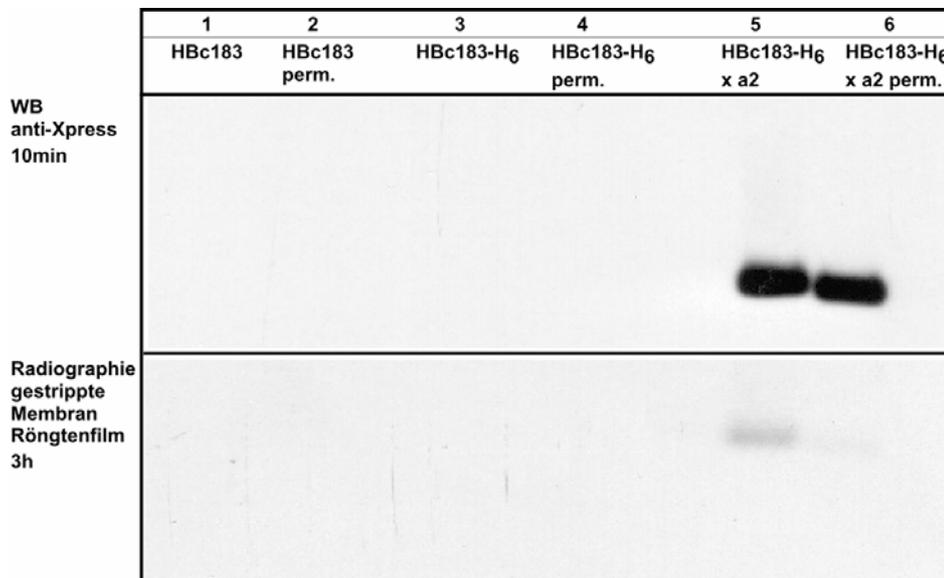


Abbildung 5-59: SRPK 1 kann bei Koexpression mit HBc183 als distinkte Bande spezifisch detektiert werden. Die im Blot eines nativen Agarosegels detektierten Banden entsprechen in ihren Laufverhalten assemblierten Corepartikeln (oben). Die Detektion der Kinase in Spur 5 und 6 ist spezifisch, da das Xpress-Epitop von SRPK 1 mit dem Antikörper erkannt wird. Die Signale können dabei nicht von der γ -³²P-Markierung stammen, da selbst nach 3 h Exposition nur sehr schwache Signale im Autoradiogramm detektierbar sind (unten).

Um auszuschließen, dass diese Signale von radioaktiv markierten Partikeln stammten, wurde die Membran danach erneut gestrippt und direkt auf einen Röntgenfilm exponiert. Abbildung 5-59 zeigt, dass nach 3 Stunden Exposition in Spur 5 und Spur 6 ein schwaches bzw. sehr schwaches Signal in Höhe der Corebanden auftaucht, dessen Intensität keinesfalls dem Signal der immunologischen Detektion nach ca. 1 min entspricht.

Zur weiteren Bestätigung wurde der Versuch mit Proben der koexprimierten Form HBc183 x SRPK 1(a2) und der ohne Kinase exprimierten Form HBc183-H6 wiederholt, wobei rekombinante SRPK 1 mit auf das Agarosegel aufgetragen wurde.

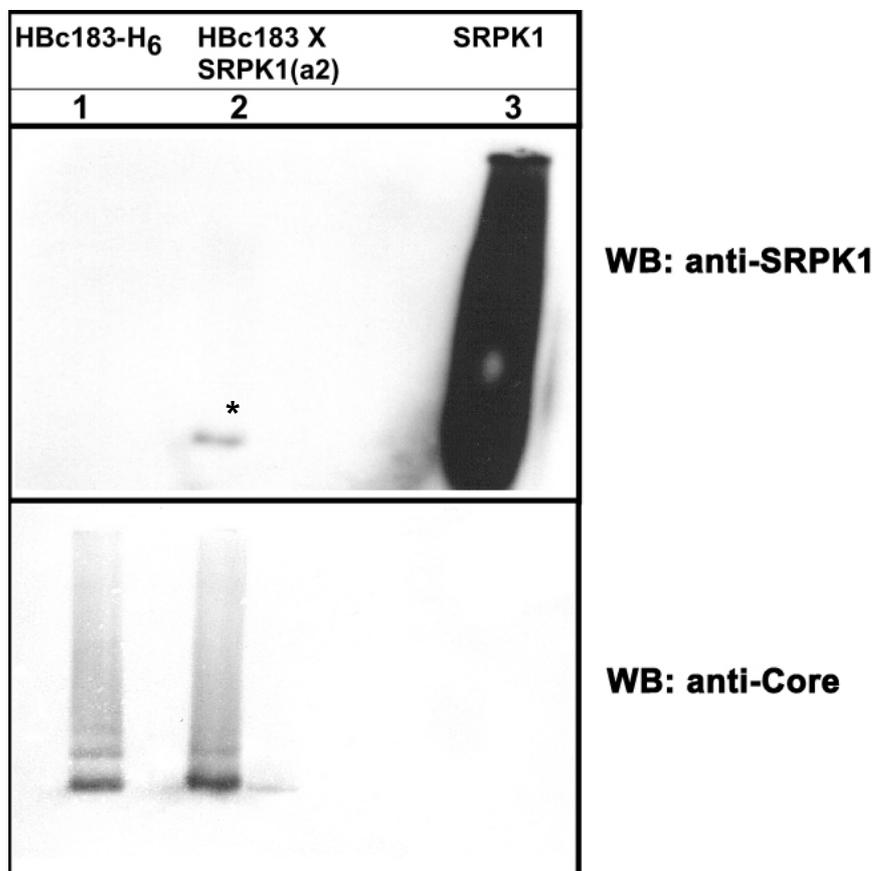


Abbildung 5-60: SRPK 1 zeigt bei Auftrennung im nativen Agarosegel kein distinktes Laufverhalten. Spur 1 (HBc183-H₆) enthält keine exogene Kinase; Spur 2 enthält koexprimierte Kinase. In Spur 3 wurde die rekombinante Kinase aufgetragen. Die Detektion von SRPK 1 (oben) erfolgte über den Kinase-spezifischen Antikörper anti-Xpress, der nachfolgende Nachweis der Coreproteine über den Antikörper mc275. Der Stern * kennzeichnet die Detektion der mit den Corepartikel assoziierten bzw. verpackten Kinase SRPK 1.

Die Detektion mit dem SRPK 1-spezifischen Antikörper in Abbildung 5-60 ergab im Vergleich zu Abbildung 5-59 eine schwache Bande, die gemeinsam mit den HBc183 x SRPK 1(a2) Partikeln wandert. Das Laufverhalten von SRPK 1 Proteins zeigte wegen deutlicher Überladung eine breite Verteilung von der Auftragstasche des Gels bis weit unter die HBc183 Bandenhöhe, aber keine Anreicherung auf Höhe der distinkten Bande in Spur 2. Da diese Bande wiederum nur in der mit SRPK 1 koexprimierten Probe auftrat, spricht dies stark für eine spezifische Assoziation der koexprimierten Kinase mit den Corepartikeln.

Für einen direkteren Nachweis wurden jeweils mit bzw. ohne SRPK 1 exprimierte Corepartikel erneut auf einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle diente eine aus den separat exprimierten Komponenten bestehende Mischung von rekombinanter SRPK 1 und HBc183-H₆. Die Partikel-spezifischen Banden wurden über Ethidiumbromidfärbung identifiziert, aus dem Gel ausgeschnitten und wie in 4.5.4 beschrieben in einem 15 % SDS-PAGE erneut aufgetrennt. Die Proteine wurden im Semi-dry Blot auf eine PVDF Membran transferiert. Die abschließende Western Blot Analyse erfolgte mit dem für SRPK 1-spezifischen Antikörper anti-Xpress bzw. nach Strippen der Membran mit dem Core-spezifischen Antikörper mc158.

Bei Koexpression der Kinase zeigten sich in Abbildung 5-61 im unteren Blot 3 verschiedene Banden, eine mit > 90 kDa, welche sehr wahrscheinlich der Vollängen Kinase entspricht, eine weitere Bande bei ca. 44 kDa, welche einem Abbauprodukt der Kinase zugeordnet wurde (vergleiche native Reinigung SRPK 1; 4.7.1).

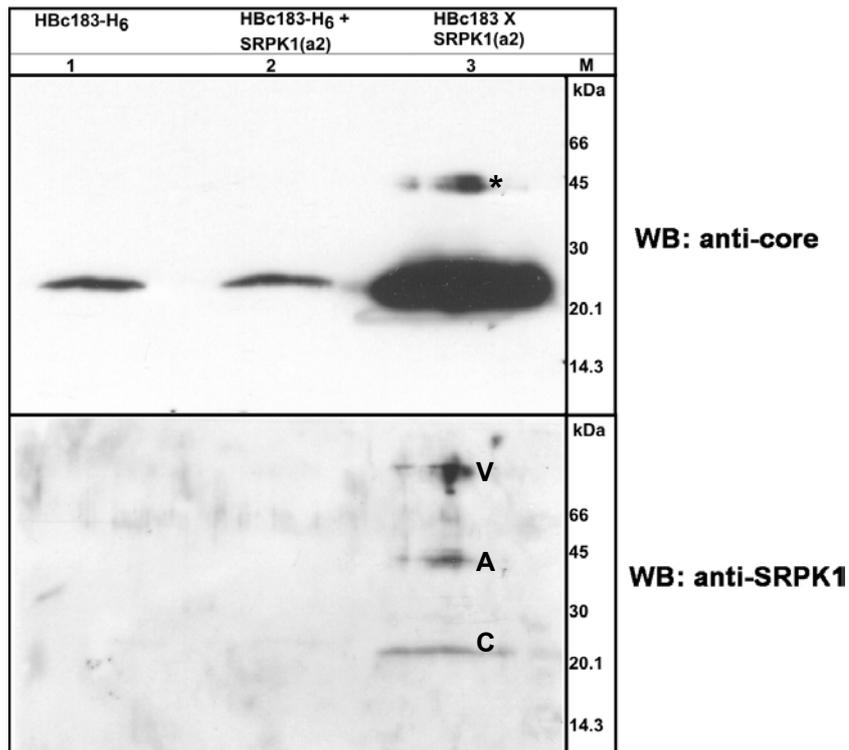


Abbildung 5-61: Aus der distinkten Bande einer im nativen Agarosegel aufgetrennten HBc183 x SRPK 1(a2) Probe lässt sich die Kinase direkt freisetzen und nachweisen. Die koexprimierte Kinase (Spur 3) kann mit dem SRPK 1-spezifischen Antikörper (unterer Blot) als Vollängen Protein (92 kDa), im Bild als V bezeichnet, als Abbauprodukt A (ca. 44 kDa) und in einer Bande in Höhe des Coreproteins C (21 kDa) detektiert werden. Bei Inkubation von exogener Kinase mit Corepartikeln kann SRPK 1 nicht mit HBc183 kolokalisiert werden (Spur 2). HBc183 Coreproteine können auf der gleichen Membran (oberer Blot) in allen Proben mit dem Core-spezifischen Antikörper bei 21 kDa detektiert werden. Ein Teil des Coreproteins scheint auch mit dem Abbauprodukt der Kinase assoziiert zu sein (siehe *).

Bei Mischung von Corepartikeln mit SRPK 1 kann mit dem Antikörper anti-Xpress keine mit den Partikeln assoziierte Kinase detektiert werden. Es scheint aber möglich, dass die Kinase unter den gewählten Versuchsbedingungen, d.h. einer sehr kurzen Inkubation mit den Partikeln, nur schwach an die Partikel gebunden und durch die Auftrennung im Agarosegel wieder von den Partikeln abgetrennt wurde. Es ist zudem denkbar, dass phosphorylierte Coreproteine wesentlich effizienter auf die PVDF Membran transferiert werden, da nur nach Koexpression mit SRPK 1 (Spur 3) ein überdurchschnittlich hohes Core-spezifisches Signal im oberen Blot nachweisbar ist.

5.4.6. Der Phosphorylierungsstatus von HBV Coreproteinen ist mit herkömmlichen Trennverfahren nicht darstellbar

Die durchgeführten γ - 32 P-ATP Phosphorylierungen hatten gezeigt, dass SRPK 1 Coreproteine bei Koexpression in *E. coli* phosphorylieren konnte. Unklar war aber weiterhin das Ausmaß der so entstandenen Phosphorylierung der Coreproteine. Daher wurde ein Trennsystem gesucht, welches eine direkte Unterscheidung von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Coreproteinen ermöglicht. Eine signifikante Veränderung des Laufverhaltens in einem nativen Agarosegel von HBc183 x SRPK 1(a2) Partikeln nach Zugabe von weiterem Substrat (ATP) bzw. nach *in vitro* Phosphorylierung durch exogene SRPK 1 konnte auch durch die Veränderung des pH-Wertes des Laufpuffers von (vergleiche 4.4.4) annähernd neutral (TAE-Puffer; Abbildung 5-62; Teil A) zu leicht alkalisch (TB-Puffer; nicht gezeigt) nicht gefunden werden. Auch die Auftrennung in einem herkömmlichen Tris-Glycin-SDS-Gel (Abbildung 5-62; Teil B) ließ nur eine minimale Veränderungen der Mobilität nach Phosphorylierung erahnen.

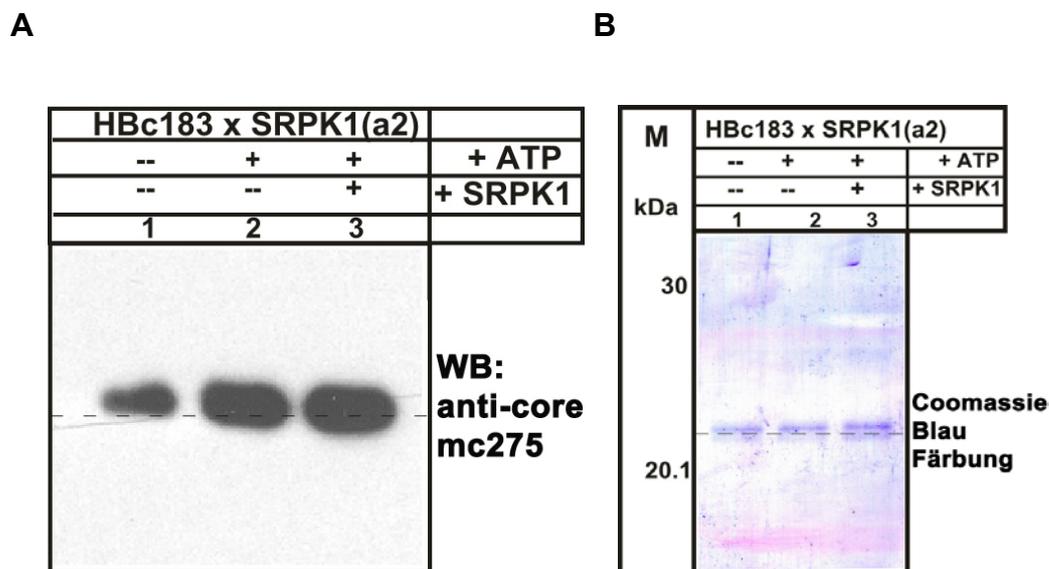


Abbildung 5-62: Das Laufverhalten von *in vitro* phosphorylierten HBc183 x SRPK 1 Partikeln in einem nativen TAE-Agarosegel bzw. Tris-Glycin-SDS-Gel ist nur geringfügig verändert. Unbehandelte HBc183 x SRPK 1 Partikel (Spur 1) wurden mit zusätzlichem Substrat (Spur 2) bzw. exogener Kinase plus Substrat (Spur 3) versetzt. Unterschiede im Laufverhalten der Partikel durch eine Phosphorylierung sind A: im Western Blot mit einem Partikel-spezifischen Antikörper (mc275) bzw. B: nach Coomassie Blau Färbung des SDS-Gels kaum erkennbar. Die gestrichelte Linie in B deutet auf die minimale Veränderung des Laufverhaltens hin.

Erst durch das Tricin Gelsystem (Schägger und von Jagow, 1987) (vergleiche 4.3.2) wurde es möglich, die verlangsamte Mobilität von Coreproteinen durch eine SRPK 1-Phosphorylierung darzustellen. Abbildung 5-63 zeigt deutlich die Veränderung der Mobilität durch das unterschiedliche Laufverhalten von *in vivo* phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem HBc183 Coreprotein in einem 15% Tris-Tricin SDS-Gel.

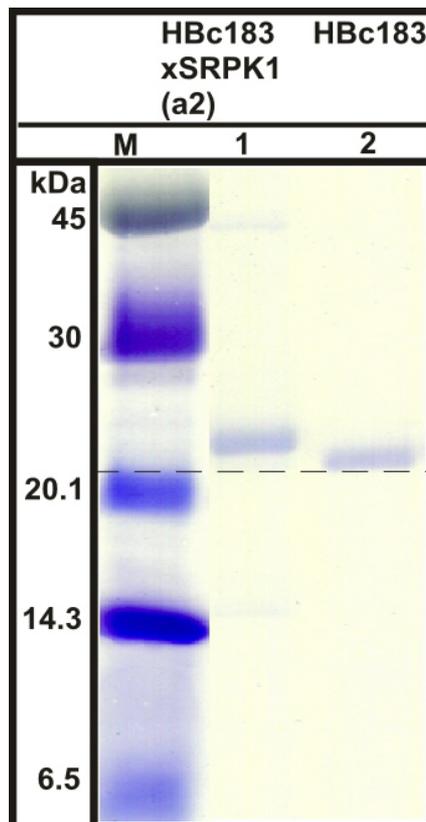


Abbildung 5-63: In einem denaturierenden 15 % Tris-Tricin SDS-Gel nach Schägger und von Jagow kann eine *in vivo* Phosphorylierung durch die Veränderung des Laufverhaltens nachgewiesen werden. Mit SRPK 1 koexprimiertes Coreprotein HBc183 x SRPK 1 in Spur 1 zeigt eine deutlich verlangsamte Mobilität durch die Phosphorylierung. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den Laufunterschied zur unphosphorylierten Probe HBc183 in Spur 2.

Wie in Abbildung 5-64 gezeigt, lieferte das Tris-Tricin Gelsystem zudem einen starken Hinweis darauf, dass die *in vivo* Phosphorylierung von Coreprotein wesentlich effizienter erfolgte als die *in vitro* durchgeführte Phosphorylierung, da hier kaum eine Veränderung der Mobilität nachweisbar war.

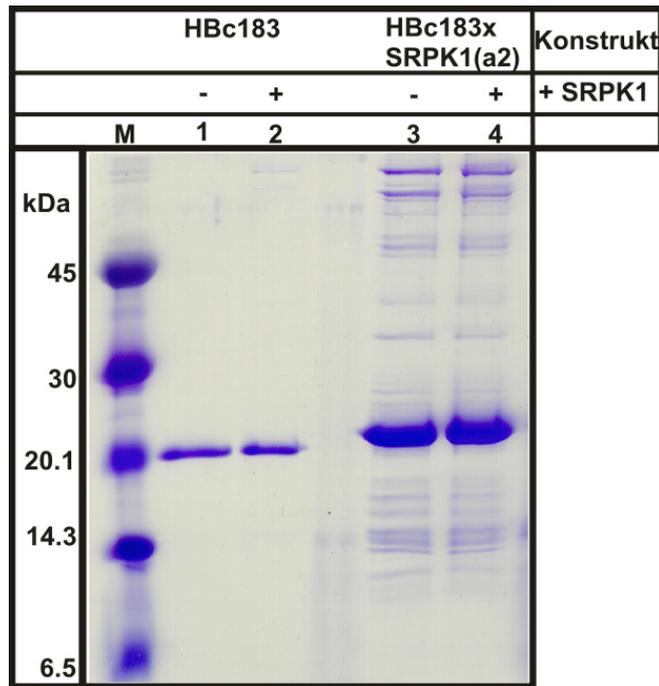


Abbildung 5-64: Eine deutliche Veränderung der Mobilität ist nur bei *in vivo* phosphorylierten, aber nicht bei *in vitro* phosphorylierten Coreprotein HBc183 in einem Tris-Tricin SDS-Gel nachweisbar. *In vitro* phosphorylierte HBc183 Proteine (Spur 1) zeigen gegenüber der unphosphorylierten Form (Spur 2) eine minimale Verlangsamung bei Auftrennung im Gel. Der Unterschied zu den *in vivo* phosphorylierten HBc183 x SRPK 1 Proteine (Spur 3) hingegen ist deutlich. Eine weitere Phosphorylierung durch exogene Kinase kann wiederum kaum sichtbar gemacht werden (Spur 4).

5.4.7. Der Einfluss der Coreprotein Phosphorylierung durch SRPK 1 auf die Nukleinsäurebindungsfähigkeit

Eine wahrscheinliche Rolle der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne im Coreprotein ist die Regulation der Nukleinsäurebindungsfähigkeit (Green *et al.*, 1993), (Tacke *et al.*, 1997). Mit dem in dieser Arbeit gezeigten Nachweis einer effizienten Phosphorylierung des HBV Coreproteins durch Koexpression mit SRPK 1 ergab sich dafür ein erster einfacher Test. Für einen semi-quantitativen Vergleich des Anteils an in *E. coli* verpackter bzw. assoziierter bakterieller RNA wurden eine Verdünnungsreihe (nominal 2,5 µg bis 0,15 µg) von phosphorylierten bzw. nicht-phosphorylierten Corepartikeln auf einem Agarosegel aufgetrennt. Zur Unterscheidung von Core-assoziiertes zu verpackter RNA war ein Teil der Ansätze mit 25 U Benzonase inkubiert worden. Die Nukleinsäuren wurden über Ethidiumbromidfärbung detektiert und die Coreproteine nachfolgend mit Coomassie Blau gefärbt.

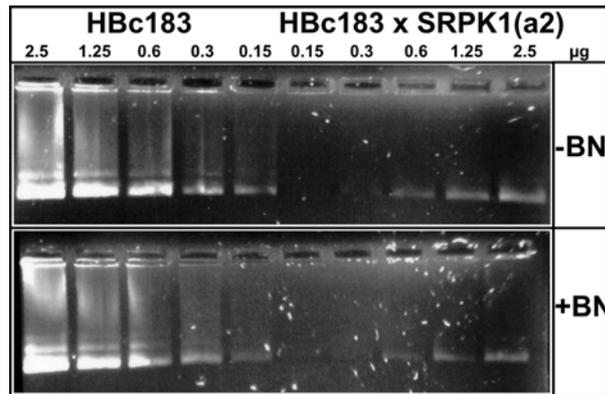


Abbildung 5-65: Detektion core-assoziierter bzw. verpackter bakterieller RNA in Abhängigkeit der Phosphorylierung. HBc183 bzw. HBc183 x SRPK 1 Partikel wurden in aufsteigenden Verdünnungen auf einem nativen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden sowohl mit (+BN) als auch ohne (-BN) Benzonase behandelte Kapside untersucht. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte über Ethidiumbromidfärbung des Gels. Es lassen sich deutlich mehr Nukleinsäuren bei HBc183 Partikel als bei HBc183 x SRPK 1 Partikel nachweisen.

Abbildung 5-65 zeigt, dass die Signale der Ethidiumbromidfärbung von 0,3 µg HBc183 Partikel ungefähr vergleichbar mit denen von 2,5 µg der HBc183 x SRPK 1(a2) Probe sind. Der Vergleich dieser Signale und die Abschätzung der Mengen an Coreprotein in Abbildung 5-66 zeigt, dass die nicht-phosphorylierte Corepartikel mindestens 10x mehr RNA als die phosphorylierten Partikel enthalten. Diese verpackte RNA ist vor einem Verdau mit Benzonase geschützt.

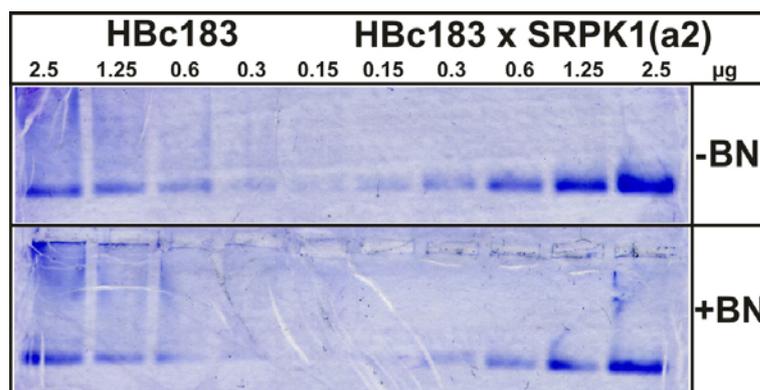


Abbildung 5-66: Detektion der HBc183 bzw. HBc183 x SRPK 1 Partikel durch Coomassie Blau Färbung. Die in einem nativen Agarosegel aufgetrennten Partikel aus Abbildung 5-65 wurden durch nachträgliche Färbung des Gels mit Coomassie Blau sichtbar gemacht. (+BN) kennzeichnet die mit Benzonase behandelten Kapside; (-BN) Partikel wurden nicht behandelt. Eine Änderung der Mobilität durch die Phosphorylierung ist nicht erkennbar.

5.4.8. Durch SRPK 1 phosphorylierte, aber nicht unphosphorylierte rekombinante HBV Corepartikel werden zur Kernpore transportiert.

So genannte reife, DNA-haltige HBV Partikel können aktiv in den Zellkern transportiert werden. Die Rolle der Core Phosphorylierung im Transport der reifen HBV Partikel zur Kernpore wird ausführlich untersucht (Kann *et al.*, 1999), (Rabe *et al.*, 2003). In *E. coli* exprimierte Coreproteine liegen durch die Abwesenheit einer spezifischen Kinase in einem unphosphorylierten Zustand vor. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass bei *in vitro* Phosphorylierung durch die Protein Kinase C der Phosphorylierungsstatus der rekombinanten Partikel so verändert werden kann, dass diese im Gegensatz zu nicht-phosphorylierten Partikel zur Kernpore transportiert werden. Entscheidendes Kriterium der *in vitro* Phosphorylierung durch PKC scheint aber die kurzfristige Schwächung der Kapsidstruktur durch drastische Absenkung der Salzkonzentration. Durch diese „Permeabilisierung“ werden die Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des Coreproteins für die Kinase zugänglich gemacht. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von HBV Partikeln durch SRPK 1 keiner solchen „Permeabilisierung“ bedarf (siehe 5.4.2), war es sehr interessant zu untersuchen, wie sich *in vitro* bzw. durch Koexpression *in vivo* phosphorylierte Wildtyp HBc183 Partikel in einem Versuchsaufbau verhalten, der den Transport zum Kern untersucht.

Abbildung 5-67 zeigt deutlich, dass durch die Phosphorylierung der Transport von rekombinanten HBc183 Partikeln zur Kernpore ermöglicht wird, da nur dann eine Kolokalisation von Proteinen der Kernpore mit Kapsiden nachweisbar ist. Dabei kann aber kein Unterschied zwischen einer Phosphorylierung durch PKC oder SRPK 1 gefunden werden. Der durch die SRPK 1-Phosphorylierung ermöglichte Kerntransport ist spezifisch, da sich die Reaktionen durch Wheat Germ Agglutinin (WGA), einen Inhibitor des Kerntransportweges, hemmen lässt.

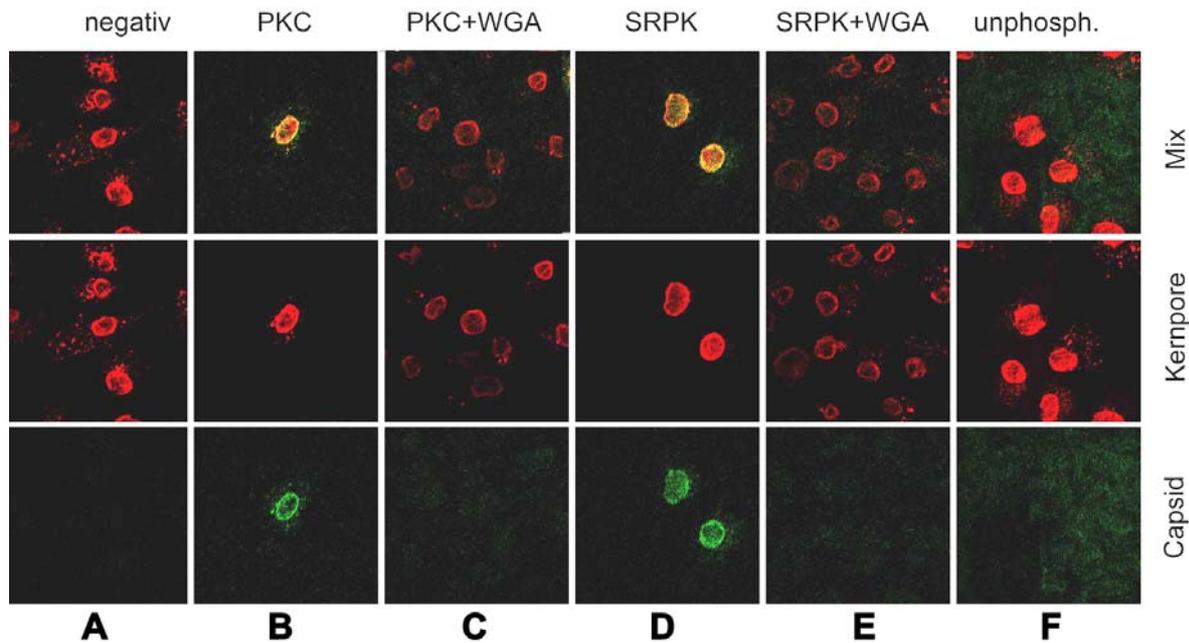


Abbildung 5-67: Der durch SRPK 1 verursachte Phosphorylierungsstatus ermöglicht rekombinanten HBC183 Partikeln den spezifischen Transport zur Kernpore. Nur nach Phosphorylierung mit SRPK 1 (Reihe D) kann eine Kolokalisation (Mix = gelb) der grün gefärbten Kapside mit der spezifisch angefärbten Proteinen der Kernpore (rot) gefunden werden. Der Transport lässt sich durch Wheat Germ Agglutinin (WGA) in Reihe E hemmen, einen Inhibitor des Importin Transportweges. Die Effizienz des Transports ist mit der vergleichbar, die nach Phosphorylierung mit PKC (Reihe B und C) stattfindet. Die indirekten Immunfluoreszenzaufnahmen wurden freundlicherweise von M. Kann durchgeführt.

5.4.9. *In vitro* Phosphorylierung von DHBV Coreproteinen

Da es nur geringe Homologien in den Aminosäuresequenz der orthohepadnaviralen und avihepadnaviralen Coreproteine gibt (vergleiche Abbildung 5-68) sollte untersucht werden, ob sich auch rekombinante DHBV Partikel mit der Serin-Arginin-Protein-Spezifischen-Kinase 1 (SRPK 1) *in vitro* phosphorylieren lassen.

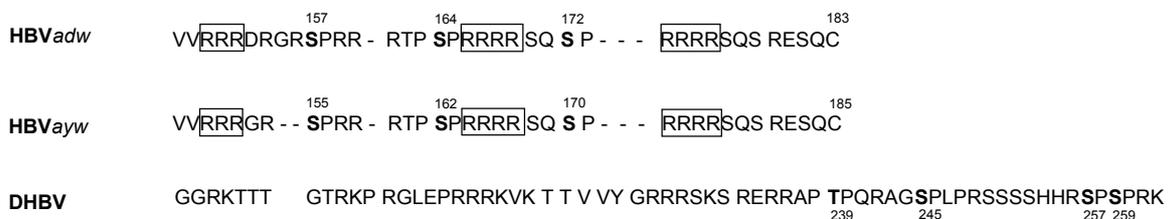


Abbildung 5-68: Die C-terminale Domäne des HBV und DHBV Coreproteins. Die Phosphorylierungsstellen im HBV Coreproteins des Subtyps *adw* bzw. Subtyps *ayw* und die des DHBV Coreproteins sind dunkel gekennzeichnet.

Hierfür standen vorgereinigte Präparationen von Vollängen DHBc (262 aa) und dem entsprechenden Derivat mit His₆-Peptid (DHBc-H₆), jeweils mit und ohne koexprimierter SRPK 1 zur Verfügung. Diese wurden wie in 4.7.5 beschrieben *in vitro* phosphoryliert.

5.4.9.1. DHBV Partikel können *in vitro* phosphoryliert werden

Um eine *in vitro* Phosphorylierung der DHBV Coreproteine nachzuweisen, wurde zunächst radioaktiv markiertes γ -³²P-ATP und exogene SRPK 1 verwendet. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität der koexprimierten und mit aufgereinigten Kinase im Ansatz DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) wie in 4.7.5 beschrieben untersucht.

Das Resultat in Abbildung 5-69 zeigt, dass DHBc Partikel (Spur 1) ebenso wie die Variante mit His₆-Peptid (DHBc-H₆; Spur 2) und das Konstrukt mit koexprimierter Kinase DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) (Spur 4) *in vitro* phosphorylierbar sind.

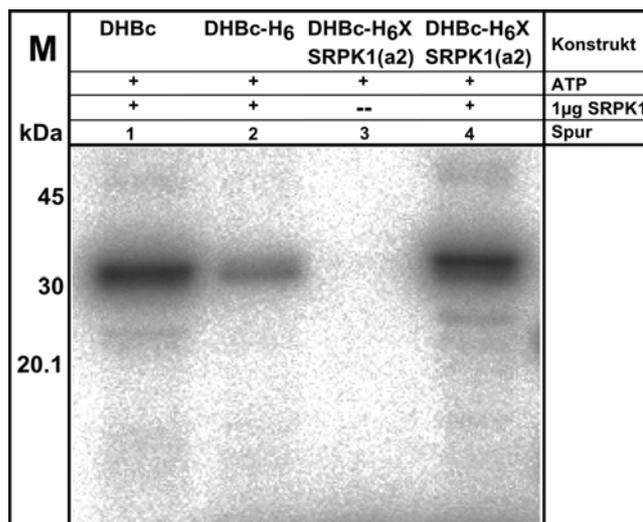


Abbildung 5-69: DHBc Partikel ohne und mit C-terminaler Fusion des His₆-Peptids lassen sich durch SRPK 1 *in vitro* phosphorylieren. Sowohl DHBc (Spur 1) als auch DHBc-H₆ (Spur 2) werden durch SRPK 1 phosphoryliert. Bei Koexpression der Kinase (a2) wird bei Zugabe von γ -³²P-ATP das angebotene Substrat nicht verwendet (Spur 3), erst durch Zugabe von exogener Kinase und Substrat kann das Coreprotein phosphoryliert werden (Spur 4).

Die Variante DHBc x SRPK 1(a5) stand zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Das His₆-Peptid schien keinen Einfluss auf die Phosphorylierung an sich auszuüben, wobei aber eine Aussage über die Effizienz der Phosphorylierung sich nicht treffen ließ, da nicht die gleichen Proteinmengen eingesetzt worden waren. Laut einem nachträglich durchgeführten Bradford Assay waren ungefähr doppelt so

viel DHBc Partikel wie DHBc-H₆ Partikel eingesetzt worden; demnach waren beide Varianten mit nahezu gleicher Effizienz phosphoryliert worden. Das Konstrukt mit koexprimierter Kinase DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) zeigt bei Zugabe von Substrat ATP ohne weitere Zugabe exogener Kinase keine detektierbaren Signale (Spur 3), d.h. es gab keine Anzeichen einer Phosphorylierung. Um zu testen, ob die fehlende Aktivität dadurch verursacht wurde, dass die Kinase bei der Reinigung nicht mit gereinigt worden war, wurde versucht in den Proben DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) bzw. DHBc x SRPK 1(a5) die Kinase über das Xpress-Epitop mit dem Antikörper anti-Xpress immunologisch nachzuweisen. Im Ansatz DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) wurde sowohl die Vollängen Kinase als auch Abbauprodukte detektiert. Der Anteil an detektierbarer Core-assoziiierter bzw. verpackter Kinase war aber relativ gering (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte, dass in der Probe DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) die Kinase zwar exprimiert worden war, aber nach Isolierung aus *E. coli* bei Zugabe von neuem ATP-Substrat keine Enzymaktivität mehr besaß oder an das Coreprotein keine weiteren Phosphatreste mehr angefügt werden konnten, z.B. weil die Kinase bereits in den Bakterienzellen das mit exprimierte Coreprotein vollständig phosphoryliert hatte. Erst nach Zugabe von exogener Kinase und Substrat wurde auch DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) *in vitro* phosphoryliert.

5.4.9.2. Die Koexpression von SRPK 1 führt zu einer nachweisbaren Veränderung der Mobilität der DHBV Partikel

Wie in 5.4.9.1 beschrieben war es möglich, dass die koexprimierte Kinase im Ansatz DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) in den *E. coli* Zellen die vorliegenden Coreproteine phosphoryliert hatte und diese Phosphorylierung auch durch eine Veränderung der Mobilität darstellbar wäre. Hierfür wurde die denaturierende Auftrennung auf einem hochprozentigen Tris-Glycin SDS-Gel gewählt. Von den Konstrukten DHBc, DHBc x SRPK 1(a5), DHBc-H₆ und DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) wurde jeweils die Fraktion Nr. 7 eines Sucrosegradienten (alle Gradienten von Jolanta Vorreiter) ausgewählt, auf einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blau gefärbt.

Abbildung 5-70 zeigt, dass in der DHBc x SRPK 1(a5) Präparation stark nach oben verschobene Coreproteine im SDS-Gel nachgewiesen werden konnten. Diese Veränderung der Mobilität lässt sich bei DHBc x SRPK 1(a5) im Vergleich zu

HBc183 x SRPK 1(a2) schon in einem herkömmlichen Tris-Glycin SDS-Gel nachweisen.

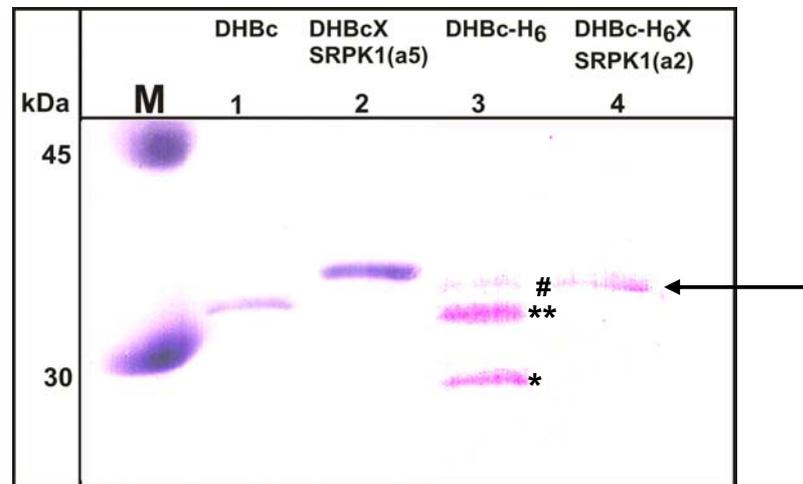


Abbildung 5-70: Eine *in vivo* Phosphorylierung durch Koexpression von SRPK 1 ist bei DHBc ohne His₆-Peptid durch eine Veränderung der Mobilität im Tris-Glycin SDS Gel nachweisbar. Die Veränderung des Laufverhaltens von DHBc (Spur 1) zur phosphorylierten Variante DHBc x SRPK 1(a5) (Spur 2) ist beträchtlich. Die in Spur 3 Coomassie gefärbte Bande in Höhe von DHBc (**) entspricht nicht DHBc-H₆ (#), sondern liegt kaum sichtbar darüber (siehe Pfeil). Die phosphorylierte Form DHBc-H₆ x SRPK 1 (Spur 4) liegt auf gleicher Höhe wie DHBc-H₆, zeigt in diesem Gel also keine Veränderung der Mobilität. Ein weiteres Abbauprodukt von DHBc-H₆ ist mit * gekennzeichnet.

Die langsamste Bande der hier insgesamt drei anfärbbaren Banden von DHBc-H₆ in Spur 3 zeigt im Vergleich zu DHBc in Spur 1 eine Veränderung der Mobilität durch das His₆-Peptid. Eine weitere Veränderung dieser Bande durch Phosphorylierung kann aber für DHBc-H₆ x SRPK 1(a2) in Spur 4 nicht gefunden werden. Die zuvor detektierte Vollängen Kinase diesem Ansatz schien daher weder *in vitro* noch *in vivo* in den Bakterienzellen Enzymaktivität zur Phosphorylierung der Coreproteine zu haben. Die hier gezeigten Veränderungen der Mobilität sind sicherlich durch die Verwendung des in 5.4.6 beschriebenen Tris-Tricin-Gelsystems nach Schägger und von Jagow noch deutlich besser darstellbar.

6. Diskussion

6.1. Eignung von HBV Coreprotein CLPs als Trägerstruktur für Strukturanalysen von Fremdproteinen.

Zur Gewinnung detaillierter Strukturdaten ist die Röntgenstrukturanalyse besonders aussichtsreich, da diese Technik eine Auflösung der Struktur bis in fast atomare Bereiche ermöglichen kann. Dafür müssen aber ausreichende Mengen an Proteinen in kristalliner oder zumindest hochgeordneter Form vorliegen, was gerade bei der Untersuchung von Viruspartikeln problematisch sein kann.

Auch Mithilfe von Elektronenmikroskopie (EM) können Strukturdaten von Viren gewonnen werden. Untersuchungen mit dem EM verlangen aber neben der Verwendung von Vakuum eine zusätzliche Kontrastierung der Viruspartikel. Eine Weiterentwicklung stellen daher kryo-elektronenmikroskopische Verfahren dar. Dies erfordert weder eine künstliche Fixierung noch eine zusätzliche Kontrastierung der zu untersuchenden Virusstrukturen, sondern ermöglicht die Betrachtung der nativen Struktur in hydratisierter Form (Baker *et al.*, 1999). Insbesondere bei ikosahedral angeordneten Viruspartikeln lässt sich die inhärente Symmetrie sinnvoll ausnutzen, da sich dadurch z.B. die erhaltenen Bilder der Partikel einfach in eine Orientierung ausrichten lassen. Durch die Kombination mit computerunterstützter Bildverarbeitung kann so eine Auslösung der Struktur kleiner 10 Å erzielt werden. Dies konnte eindrucksvoll am Beispiel der Strukturuntersuchung von rekombinanten HBV Corepartikeln gezeigt werden. Insbesondere durch die hochgeordnete Anordnung vieler identischer Coreprotein Untereinheiten im ikosahedral symmetrischen HBV Corepartikel und durch die computerunterstützte Verarbeitung vieler gleich ausgerichteter Summenbilder war es möglich, die HBV Kapsidstruktur mit einer Auflösung von 7,4 Å darzustellen (Böttcher *et al.*, 1997). Diese konnte dann auch durch die nachfolgend durchgeführte Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 3,5 Å im Detail bestätigt werden (Wynne *et al.*, 1999a).

Da es häufig nicht möglich ist, Proteine in einer hochgeordneten Anordnung zu erhalten oder gar zu kristallisieren, wäre die Präsentation vieler identischer Proteinuntereinheiten in einer repetitiven z.B. ikosahedralen Anordnung eine wünschenswerte Zwischenstufe. Auch wenn keine näheren Strukturdaten des

Proteins bekannt sind, sollte es durch die regelmäßige Anordnung von 180 bzw. 240 Untereinheiten eines Fremdproteins auf einem Träger mit bekannter Struktur und Symmetrie möglich sein, die präsentierten Proteine genauer aufzulösen. Basierend auf der hochgeordneten Anordnung der Coreprotein Untereinheiten im Partikel schien es daher möglich, HBc-abgeleitete CLPs als ikosahedral symmetrische Plattform für Fremdproteine zu nutzen. Durch die Möglichkeit, HBV Corefusionsproteine in *E. coli* mit sehr hoher Ausbeute zu exprimieren, können bei dieser Methode sehr viele chimäre Partikel in eine computerunterstützte Bildverarbeitung sinnvoll eingehen. Dies hätte die Möglichkeit schaffen können, auch andere Proteine ohne vorherige Kristallisation einer Strukturanalytik mit einer Auflösung im Bereich von 10 Å zu unterziehen.

Am Beispiel von GFP als Modellprotein bekannter Struktur konnte gezeigt werden, dass GFP unter Verwendung von absichtlich langen Linkern in das c/e1 Epitop des Coreprotein inseriert werden kann, ohne dass dabei die Partikelbildungsfähigkeit des Corefusionsprotein eingeschränkt wurde. Die GFP-Einheiten wurden auf der Oberfläche der Partikel präsentiert, für eine detaillierte Auflösung der GFP-Struktur waren diese aber anscheinend nicht genügend geordnet vorgelegen (Kratz *et al.*, 1999).

Ein entscheidendes Kriterium bei der Versuchsdurchführung war das Design einer topologisch geeigneten Fixierung am Träger, um die GFP-Domänen einer ikosahedral symmetrischen Anordnung zu unterwerfen. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, eine möglichst starre Fixierung der GFP-Domänen auf der Kapsidoberfläche zu erzielen, ohne dabei die Fähigkeit des Fusionsproteins zur Partikelbildung zu beeinträchtigen. Im ersten Teil der Arbeit konnten neue Core-GFP Varianten konstruiert und ein optimiertes Protokoll zur Herstellung von hochkonzentrierten, reinen chimären Partikeln entwickelt werden. Der Einsatz von Benzonase ließ einen verkürzten Zellaufschluss durch Ultraschall zu, wodurch weniger kontaminierende Bakterienproteine freigesetzt wurden. Durch Niedrigsalz-Bedingungen wurde zudem eine Assoziation der Coreproteine mit kontaminierenden bakteriellen Proteinen verhindert. Die Herstellung von hochkonzentrierten reineren partikulären Proben, mit Ausbeuten von ca. 5 - 10 mg/ml, wurde durch die Einführung neuartiger Ultrafiltrationseinheiten entscheidend verbessert. Diese Einheiten (Amicon®Ultra, Millipore) verwenden zwei vertikale, großflächige Ultracel® Membranen mit sehr niedriger unspezifischer Proteinbindung, die zu einer sehr

schnellen Anreicherung der Coreproteine ohne größere Verluste und/oder Aggregation der Proteine führte. Insgesamt wurden 27 verschiedene Konstrukte hergestellt. Die biochemische Charakterisierung dieser Konstrukte zeigte, dass sowohl die Variation des Linkers, welche zum Teil auch asymmetrische Verkürzungen umfasste, wie auch die Variation des Insertionsortes gut toleriert wurden, da von allen Varianten partikuläre Formen gewonnen werden konnten. Jede einzelne Core-GFP Variante wurde im EM durch negativ Kontrastierung auf ihre Eignung für die Kryo-Elektronenmikroskopie begutachtet, was viel Zeit in Anspruch nahm. Auf Grund dieser langen Vorlaufzeiten wurden aus den 27 Konstrukten für eine weiterführende Auswertung durch Kryo-Elektronenmikroskopie zwei Varianten ausgewählt, an Hand derer repräsentativ der Einfluss der Linkerlänge untersucht werden sollte. Im Vergleich zum ursprünglichen Konstrukt mit sehr langen Linkern wurde eine Core-GFP Variante mit mittlerer Linkerlänge, sowie eine Variante mit drastisch verkürztem Linker ausgewählt. Der Einfluss des Insertionsortes wurde bislang nicht genauer untersucht.

Die erste analysierte Coreprotein Variante mit GFP-Insertion im c/e1 Epitop wies eine Deletion der Core Aminosäuren Prolin 79 (P79) und Alanin 80 (A80) sowie einen Aminosäurelinker von 4 Glycinresten auf jeder Seite der GFP-Einheit auf. Diese Probe zeigte schon zu Beginn der Auswertung eine Inhomogenität hinsichtlich der Partikelgrößen. Bei der Expression von C-terminal verkürzten Coreproteinen in *E. coli* weisen üblicherweise 40 % aller Partikel eine Triangulationszahl von $T = 3$ bzw. 60 % von $T = 4$ auf (Wingfield *et al.*, 1995). Bei den vorliegenden Coreprotein Varianten war es neben einem erhöhten $T = 3$ Anteil auch zur Ausbildung von Partikeln gekommen, die auf Grund ihrer irregulären Größen in keine der beiden Klassen eingeteilt werden konnten. Die notwendige manuelle Einteilung in zwei Partikelklassen nahm nicht nur viel Zeit in Anspruch, sondern führte möglicherweise schon sehr früh zu einer Beeinflussung der Ergebnisse. So wurden „kleine“ Partikel als Partikel mit einer Triangulationszahl von $T = 3$ betrachtet, „große“ wurden als $T = 4$ Partikel analysiert. Ob diese Einteilung korrekt war, bleibt unbeantwortet. Jede Klasse wurde einzeln ausgewertet und lieferte zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse. Sowohl für die $T = 3$ als auch $T = 4$ Partikel konnte im Vergleich mit unmodifizierten Kapsiden ein zusätzlicher äußerer elektronendichter Bereich detektiert werden, d.h. beide hatten durch die GFP-Einheiten einen größeren Durchmesser. Die relative Dichte der GFP-Einheiten, gemessen in Abhängigkeit vom

Radius, war aber bei beiden Klassen deutlich geringer als die der innen liegenden Core-Schale und verdeutlichte die schlechte Auflösung der GFP-Moleküle. Aus der Lage der maximalen Elektronendichte über der lokalen dreifachen Symmetrieachse der $T = 3$ Partikel ließ sich aus geometrischen Überlegungen folgern, dass diese aus drei GFP-Molekülen, je ein Molekül von einer Coreproteinuntereinheit stammend, gebildet werden musste. Die tatsächlich gemessene Dichte war aber für drei GFP-Moleküle viel zu klein, maximal ein GFP-Molekül ließ sich hinlänglich einpassen. In den größeren $T = 4$ Partikeln kam es zu einer Anordnung der äußeren Masse direkt über den Spikes, die daher aus je zwei GFP-Einheiten gebildet sein müssten. Auch hier konnte in die tatsächliche Elektronendichte kein GFP-Dimer eingepasst werden. Die mangelnde Auflösung der Fremd-Epitope verdeutlichte, dass diese noch immer zu flexibel an der Coreproteinen befestigt waren.

In der zweiten analysierten Coreprotein Variante, war die Linkersequenz daher auf nur einen Glycinrest zu beiden Seiten der GFP-Einheit verkürzt worden. Durch die gute Expression und Partikelbildungsfähigkeit dieser Variante konnten nicht nur sterische Behinderungen zwischen den GFP-Domänen und den Coreproteinen ausgeschlossen werden, das Konstrukt zeichnete sich mit einem weiter erhöhten $T = 3$ Anteil durch eine bessere Partikelhomogenität aus. Insgesamt gingen 1600, als $T = 3$ klassifizierte Partikel in die Berechnungen ein. Es konnte gezeigt werden, dass durch die kurze Fixierung der GFP-Einheiten auf der Coreoberfläche tatsächlich eine bessere Auflösung der Insertionen erzielt werden konnte, da die relativen Dichten der GFP-Einheiten deutlich höher waren als die des zuvor untersuchten 4 Glycin-Linkerkonstrukts. Erstmals war die äußere GFP-Dichte vergleichbar mit der inneren Dichte der Core-Schale. Auch eine sinnvolle, nahezu ikosahedrale Verteilung der GFP-Einheiten auf der Coreoberfläche konnte verzeichnet werden. Mit den vorliegenden Daten war es zudem möglich, in die gemessene Elektronendichte GFP-Molekül(e) relativ präzise einzupassen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse lassen sich aber zwei gegenläufige Tendenzen beobachten. Zum einen kann man eine deutliche Verbesserung in der Auflösung der GFP-Struktur mit steigender Verkürzung der Linkersequenz verzeichnen. Andererseits scheint die Verkürzung des Linkers einen beträchtlichen negativen Effekt auf die Struktur des Trägers selbst auszuüben. Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein Core-GFP Fusionsprotein mit sehr langer und flexibler Linkersequenz. Diese chimären Partikel wiesen im EM nach negativ Kontrastierung

eine relativ homogene Verteilung an $T = 3$ bzw. $T = 4$ Partikel auf und zeigten deutlich erkennbar einen zusätzlichen äußeren Ring um die Core-Schale. Bei den hochauflösenden Analysen durch Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildrekonstruktion wurde jedoch deutlich, dass die erzielte Elektronendichte für die GFP-Moleküle so gering war, dass keine Auflösung der Struktur möglich war. Die Analyse der Trägerstruktur zeigte hingegen keinerlei Beeinträchtigung durch die Insertion der Fremd-Epitope. Die unterschiedlichen Dimer-Typen innerhalb der chimären Partikel wichen nicht von denen der parallel analysierten unmodifizierten Partikel ab (Kratz *et al.*, 1999). Die Verkürzung zu einem 4 Glycin-Linker, die gleichzeitig auch zu einer verminderten Flexibilität der Linkersequenz führte, zeigte bei der ersten Betrachtung eine veränderte Partikelhomogenität und Partikelgrößen, die sich nicht eindeutig in eine Triangulationsklasse einordnen ließen. Durch negativ Kontrastierung erschienen die Partikel gleichförmig und mit einem deutlichen GFP-Ring versehen, und somit nicht unterschiedlich vom Ursprungsstruktur. Erst die Rekonstruktion der Core-Schalen erbrachte eine massive Abweichung vom früheren Erscheinungsbild. Bei den $T = 3$ Partikeln war es zu mindestens einer nachweisbaren Veränderung der Dimer Anordnung im Partikel gekommen, bei den $T = 4$ Partikeln konnten eine Umordnung von mindestens zwei verschiedenen Dimer-Typen beobachtet werden. Die Dimere zeigten erhebliche Verschiebungen und Verdrehungen innerhalb der Partikelstruktur. Die weitere Verkürzung der Linkersequenz auf nur einen Glycinrest zu beiden Seiten der GFP-Einheit zeigte im EM nach wie vor gleichmäßige Partikel, die hauptsächlich als $T = 3$ Partikel klassifiziert werden konnten und einen deutlich besser aufgelösten GFP-Ring aufwiesen. Die Anordnung der einzelnen GFP-Untereinheiten über der Coreoberfläche schien relativ sinnvoll, sie deutete darauf hin, dass es zu einer annähernd ikosahedralen Anordnung der GFP-Einheiten gekommen war. Das Erscheinungsbild im EM und die rekonstruierte Anordnung der Fremd-Epitope wiesen somit nicht darauf hin, dass es zu einer massiven Umstrukturierung der Coreoberfläche gekommen war. Die in der Rekonstruktion dargestellte Oberfläche der inneren Hülle zeigte aber nur noch wenige Core-typische Merkmale, eine ikosahedrale Anordnung der Coreprotein Untereinheiten war kaum noch erkennbar. Die beobachtete Umstrukturierung der Trägeroberfläche lässt sich zum heutigen Zeitpunkt nicht hinreichend erklären. Es bleibt zu spekulieren, wie es möglich ist, dass die Coreprotein-Untereinheiten eine solch starke Umordnung erfahren können,

und dabei trotzdem zu einer Assemblierung in scheinbar „normalen“ Partikeln fähig sind. Unter dem Aspekt, dass die Corehülle eine verhältnismäßig starre Trägeroberfläche darstellt, lassen sich die beobachteten Phänomene nicht erklären. Vielmehr scheint es sehr wahrscheinlich, dass das Kapsid in sich eine viel höhere Flexibilität aufweist als bisher angenommen. Dies ließe sich dadurch erklären, dass sehr viele, aber relativ schwache Kontakte zwischen den einzelnen Untereinheiten ausreichen, um in der Summe zu einer global stabilen Gesamtstruktur zu führen (Ceres und Zlotnick, 2002).

Die vorgestellten Versuche zeigten, dass eine universelle Linkersequenz zur Befestigung der Fremd-Domänen auf dem Träger nicht gegeben ist. Die notwendige Anpassung an jedes neue Konstrukt ist, wie gezeigt wurde, sehr zeitraubend. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass wie erwartet die verbindende Linkersequenz zwischen dem Coreprotein als Träger und dem Fremdprotein einen maßgeblichen Einfluss auf den Ausgang einer hochauflösenden Strukturanalyse ausübt.

Durch die Verwendung weiterer fluoreszierender Proteine mit einer zu GFP sehr ähnlichen Struktur, konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Linkersequenz, sondern auch die Eigenschaften des inserierten Proteins eine entscheidende Rolle spielen. Die Proteine eCFP und eYFP entstanden durch Punktmutationen von eGFP, dem aus der Qualle *Aequorea* isolierten Chromoprotein (Ormö *et al.*, 1996), und weisen mit diesem eine hohe Strukturverwandtschaft auf. Die rot fluoreszierende Variante RFP stammt aus der Koralle *Discosoma* und weist deutliche Sequenzunterschiede, aber eine GFP-ähnliche Struktur auf (Fradkov *et al.*, 2000). Trotz struktureller Ähnlichkeiten war nach Insertion jedes dieser drei Proteine in das c/e1 Epitop des Coreproteins keines der Corefusionsproteine zur Partikelbildung fähig. Veröffentlichungen zeigten, dass die GFP-verwandten Chromoproteine besonders bei höheren Konzentrationen zur Eigenassoziation neigen. RFP kommt obligat als Tetramer vor (Matz *et al.*, 1999). Daraus ergaben sich Restriktionen hinsichtlich der Eignung als Fusionspartner für andere Proteine. Mehrfache Mutationen an RFP wurden durchgeführt, die sowohl die langsame Ausreifung des Chromophors wie auch die Tetramerisierung verändern sollten. DsRed2 stellt eine schnell reifende Variante von RFP mit insgesamt 6 Aminosäuresubstitutionen dar, die unter anderem das Multimerisierungs-verhalten vermindern sollten (Baird *et al.*, 2000), (Bevis und Glick, 2002). Der Einsatz von dsRed2 als Fusionsprotein des

Vollängen HBV Coreproteins in dieser Arbeit zeigte aber eine unverminderte Tendenz zur Aggregation, die eine Assemblierung zu chimären, rot-fluoreszierenden Partikeln fast vollständig verhinderte. Zacharias *et al.* konnte zeigen, dass sich durch Mutation der Kontaktdomänen die Interaktion zwischen den Proteinen reduzieren lassen (Zacharias *et al.*, 2002). Durch die vergleichende Untersuchungen der zur Dimerisierung neigenden Proteine eCFP und eYFP mit den punktmutierten monomeren Varianten mCFP bzw. mYFP (Zacharias *et al.*, 2002) konnte schließlich bestätigt werden, dass durch das Multimerisierungsverhalten der Chromoproteine und nicht durch die Wahl des Aminosäurelinkers der ursprünglichen Fusionsproteine die Assemblierung verhindert wurde. Die Varianten mCFP und mYFP zeigten keinerlei Aggregation bei Fusion mit HBc149-H₆, was sich in einem ausgezeichneten Assemblierungs-verhalten widerspiegelte. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich erst durch die Einführung von insgesamt 33 Mutationen an dsRed, die insbesondere die Kontaktpunkten der Untereinheiten umfassten, die Eigenassoziation der rot-fluoreszierenden Proteine vollständig ausschalten ließ. Die Mutante mRFP1 zeigte sowohl bei Expression in *E. coli* wie auch in Hela-Zellen keine Aggregation und konnte in der SDS-PAGE mit der berechneten Masse eines Monomers nachgewiesen werden (Campbell *et al.*, 2002). Da diese neue Variante aber bisher nicht kommerziell vertrieben wird, steht eine Fusion von mRFP1 mit HBV Coreproteinen noch aus.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die strukturellen Eigenschaften bzw. das Interaktionsverhalten des Fusionspartners einen entscheidenden Einfluss auf die Assemblierungsfähigkeit des Corefusionsproteins ausüben können.

Eine zusätzliche Abänderung vom ursprünglichen Konstrukt lag in der Verwendung einer C-terminalen Fusion eines His₆-Peptid. Die Verlängerung des C-Terminus durch die Anfügung von sechs Histidinresten könnte möglicherweise eine Umstrukturierung oder Neuordnung der C-terminalen Domänen verursachen. Ob dies zur Schaffung von neuen, signifikant geordneten Bereichen wie den beobachteten „inneren“ Elektronendichten und zur Verschiebung der Core Dimere führen kann, bleibt fraglich. Es wäre aber vorstellbar, dass eine C-terminale Umstrukturierung durch die Insertion einer großen Fremd-Domäne in die Spitze der Spikes verstärkt werden könnte. Möglicherweise wird durch die Insertion der Fremd-Proteine ein gewisser „Stress“ auf die Coreproteine ausgeübt. Bei steigender Verkürzung der Linkersequenz nimmt der Einfluss der Fremd-Domänen auf die

Coreproteine zu, die diesem „Stress“ nur durch eine Umordnung der Partikelstruktur ausweichen können. Das Resultat einer solchen erzwungenen Umstrukturierung könnte z.B. die beobachtete Verschiebung bzw. Spreizung der Dimere aus einer ikosahedralen Anordnung heraus sein. Bei weiterer Erhöhung des äußeren Einflusses ist mit einer weiteren Deformierung der Partikel zu rechnen. Wahrscheinlich würde dies in der Unfähigkeit, zu vollständigen Partikeln zu assemblieren, enden. Durch Insertion einer starren Prolinkette in das c/e1 Epitop, könnte eventuell die Umstrukturierung der Core Dimere weiter provoziert werden. Ein solches Konstrukt wurde gerade hergestellt. Die Partikelbildungsfähigkeit, über das Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten und durch das Laufverhalten im nativen Agarosegel bestimmt, ist für diese Variante uneingeschränkt gut. Im Moment wird die Eignung der Probe für eine kryo-elektronenmikroskopische Auswertung durch EM-Aufnahmen nach negativ Kontrastierung durchgeführt.

Die Ursache der in allen untersuchten Konstrukten aufgetretenen zusätzlichen Elektronendichte im Inneren der Partikel konnte bisher nicht geklärt werden. Es bleibt zu erwägen, ob durch das verwendete His₆-Peptid vermehrt elektronendichtes Material wie z.B. Nickel oder Nukleinsäuren aus dem Anzuchtmedium der Bakterien in den Partikeln angereichert werden kann. Eine Rekonstruktion von Kapsiden aus C-terminal verkürzten Coreproteinen (aa 1-149) zeigt, dass diese, bedingt durch ihren geringen RNA Gehalt, keine Elektronendichte im Inneren aufweisen. Vollängen (aa 1-183) Kapside hingegen, deren Gehalt an verpackter RNA um ein Vielfaches höher ist, weisen einen definierten elektronendichten Ring im Kapsid Innenraum auf (Kenney *et al.*, 1995). Durch Markierung eines artifiziell an das Coreprotein aa 1-149 fusionierten Cysteinrestes (Cys150) mit Undecagold lassen sich diese elektronendichten Bereiche in den assemblierten Kapsiden weiter hervorheben (Zlotnick *et al.*, 1997). Um den Einfluss der C-terminalen His₆-Peptid Verlängerung auf die vorliegenden Rekonstruktionen zu klären, müssten vergleichende Untersuchungen zweier an sich identischer Konstrukte mit bzw. ohne His₆-Peptid unter ansonsten identischen Reinigungsbedingungen durchgeführt werden. Durch zusätzliche Inkubation der Partikel in einem nickelreichen Medium bzw. durch Zusatz von RNA könnte der Effekt einer möglichen Einlagerung der Metall-Ionen bzw. die Verpackung von endogener Nukleinsäure in die Partikel weiter verstärkt werden. Solche Versuche sind zum Teil gerade durchgeführt worden, die

Auswertung und Rekonstruktion der resultierenden Partikel ist aber im Moment noch in Arbeit.

6.2. Nicht-assemblierungsfähige Corefusionsproteine können durch *in vitro* Reassoziaton mit unmodifizierten Coreproteinen als Mosaikpartikel dargestellt werden.

Bei der Präsentation von Fremd-Epitopen durch HBV Coreproteine bestehen durch das vorgegebene Raumangebot auf der Partikeloberfläche und im Inneren der Kapside zwangsläufig Restriktionen hinsichtlich der Größe der Fremd-Epitope. Um diese Beschränkungen zu umgehen, beruht ein möglicher Ansatz darauf, einen Teil der Fusionsproteine durch sterisch weniger anspruchsvolle unmodifizierte Coreprotein-Untereinheiten zu ersetzen.

Kapside mit einer Triangulationszahl von $T = 4$ haben einen Innendurchmesser von ca. 26 nm, woraus sich ein Volumen von ca. 9000 nm^3 abschätzen lässt. Bei Assemblierung von 240 identischen Corefusionsproteinen würden somit jedem Fusionsanteil im Inneren der Partikel maximal $37,5 \text{ nm}^3$ zur Verfügung stehen. Erst kürzlich konnte demonstriert werden, dass die Fusion der 17 kDa (167 aa) *Staphylococcus aureus* Nuklease (SN) am C-Terminus des HBV Coreproteins zur Expression von Partikeln mit innen liegender, enzymatisch aktiver Nuklease führte (Beterams *et al.*, 2000). Der angenommene Raumbedarf einer globulären Nuklease-Untereinheit liegt bei ca. 36 nm^3 , womit bei Verpackung von 240 Untereinheiten die Volumengrenze gerade noch unterschritten wurde (Beterams, 2000). Da die Anordnung von 240 Untereinheiten im Innenraum des Partikels eine sehr dichte Packung erfordert, ist abzusehen, dass der Assemblierungsvorgang und die Partikelstabilität davon beeinflusst werden können. So waren die Partikel aus reinem Core-SN Protein relativ instabil. Die Ko-Assemblierung durch Koexpression mit unmodifiziertem Coreprotein in *E. coli* führte zur Entstehung von widerstandsfähigen Mischpartikeln. Dieses Beispiel zeigt bildhaft, dass die Wahrscheinlichkeit, 240 Untereinheiten eines Fusionsproteins mit noch größerer C-terminaler Fremd-Domäne wie z.B. das 238 aa GFP stabil zu assemblieren, nicht sehr hoch ist.

Die Darstellung von Mosaikpartikeln durch Koexpression von zwei verschiedenen Plasmiden hat den Nachteil, dass für jede Untereinheit die Proteinexpression getrennt gesteuert wird. Dies ermöglicht nur sehr begrenzte Einflussmöglichkeiten

auf die jeweilige Menge jedes Proteins und dadurch auch auf die Zusammensetzung der neu gebildeten Mischpartikel. Ein anderer Ansatz nutzt die Expression beider Proteine, also die des unmodifizierten Coreproteins und des Fusionsproteins, von einem gemeinsamen Plasmid. Dieses enthält direkt nach dem Gen für das Coreprotein ein internes Stoppcodon, gefolgt von dem Gen für das Fremdprotein. In einem speziellen Suppressor-Bakterienstamm kann das Stoppcodon überlesen werden, womit die Möglichkeit der simultanen Expression beider Proteine besteht. Zwar konnte so die Mosaikpartikelbildung mit C-terminalen Fusionsproteinen von maximal 213 aa erzielt werden, eine Steuerung der Proteinmengen war aber auch hier nicht möglich. Zudem schien sich diese Anwendung auf C-terminale Insertionen zu beschränken (Koletzki *et al.*, 1997), (Kazaks *et al.*, 2002). Aber gerade für die Herstellung von multivalenten Impfstoffen ist eine Präsentation von möglichst vollständigen Antigenen auf der Partikeloberfläche erforderlich, um eine hohe und spezifische B-Zellimmunantwort zu induzieren. Dies lässt sich nach derzeitigem Kenntnisstand nur über eine zentrale Insertion in das c/e1 Epitop realisieren.

Mit der hier erarbeiteten Methode konnten Corefusionsproteine und Wildtyp Coreprotein-Untereinheiten *in vitro* zu stabilen Mosaikpartikeln assembliert werden. Durch eine getrennte Expression und Reinigung jeder Proteinuntereinheit wurde der Einsatz von beliebigen Mischungsverhältnissen der verwendeten Proteine möglich. Für die *in vitro* Assemblierung wurden die mit einer C-terminalen Fusion eines His₆-Peptids versehenen Proteine zu Dimeren dissoziiert und gemeinsam an eine Ni²⁺-Chelat Affinitätssäule gebunden. Die gemeinsame Elution erfolgte unter Assemblierung begünstigenden Bedingungen, wodurch es, auch bedingt durch die hohen Konzentrationen der eingesetzten reinen Proteinuntereinheiten, spontan zur Mosaik-Partikelbildung kam.

Das tonnenförmige Modellprotein GFP hat unter Einbeziehung der Seitenketten ein ungefähres Volumen von ca. 47 nm³. Bei der angenommenen Verpackung von 240 GFP-Untereinheiten im Inneren der Partikel würden diese mindestens 11000 nm³ benötigen, was die angenommene Kapazität von ca. 9000 nm³ deutlich übersteigt. Dies spiegelte sich in der mangelnden Partikelbildungsfähigkeit des C-terminalen Fusionsproteins HBc149-GFPct-H₆ allein wider. Durch die *in vitro* Assemblierung mit unmodifiziertem HBc149-H₆ Coreprotein konnten jedoch stabile partikuläre Formen gewonnen werden. Der Nachweis der Mosaik-Partikelbildung aus den einzelnen Coreprotein-Untereinheiten und deren Stabilität konnte über das

Sedimentationsverhalten im Sucroedichtegradienten bzw. über das Laufverhalten bei Auftrennung in einem nativen Agarosegel nachgewiesen werden. Letztlich belegten die elektronenmikroskopischen Daten die effiziente Partikelbildung.

Im Laufe der Versuchsdurchführungen zeigte sich allerdings, dass auch bei Einsatz von gleichen Proteinmengen jeder Untereinheit, der Einbau von unmodifiziertem Coreprotein in die neu entstehenden Partikel unter den gewählten Versuchbedingungen nur schwer regulierbar war. So kam es im Fall der Ko-Assemblierung des verkürzten Coreprotein HBc149-H₆ mit der C-terminalen GFP-Fusionsprotein-Variante (HBc149-GFPct-H₆) zur Ausbildung von mindestens 2 verschiedenen Partikelformen. Diese waren nach Auftrennung im nativen Agarosegel mit Coomassie direkt nachweisbar. Eine Analyse der Zusammensetzung dieser Partikel zeigte dann auch, dass sich sowohl Mosaikpartikel mit einem sehr hohen Anteil, aber auch solche mit sehr niedrigem Anteil an Fusionsprotein gebildet hatten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass bei der Assemblierung von sehr großen Fusionsproteinen der Anteil an unmodifiziertem Coreprotein so beigemischt wird, dass eine Assemblierung gerade möglich wird. Die unmodifizierten Coreprotein Untereinheiten könnten zur Entstehung von Assemblierungskeimen beitragen, welche die weitere Assemblierung der Fusionsproteine voran zu treiben. Ob eine Steuerung der exakten Anteile jeder Proteinuntereinheit in Mosaikpartikeln tatsächlich möglich ist, müsste z.B. durch eine Art Titration mit unmodifiziertem Coreprotein, abgeklärt werden.

Eine Vielzahl von Publikationen zeigt, dass großes Interesse an der Herstellung von chimären Virus-ähnlichen Partikeln besteht. Die einzigartigen strukturellen und immunologischen Eigenschaften machen das HBV Coreprotein zu einem sehr interessanten potenziellen Antigen präsentierenden Träger (Ulrich *et al.*, 1998). Die Einsatzmöglichkeiten als potenzielle Impfstoffe z.B. gegen Influenza- oder Malariainfektionen, werden mit Nachdruck untersucht (Neiryneck *et al.*, 1999), (Birkett *et al.*, 2002). *In vitro* hergestellte HBc-abgeleitete Mosaikpartikel könnten einen neuen Ausgangspunkt in der Herstellung von multivalenten Vakzinen darstellen, da es mit der vorgestellten Methode möglich sein sollte, mehr als zwei verschiedene gereinigte Corefusionsprotein Varianten mit unmodifizierten Coreproteinen zu assemblieren. Durch eine Kombination von Coreprotein Varianten, die Teile der authentischen HBV Nukleinsäurebindungsdomäne enthalten, könnten neben Proteinen auch heterogene Nukleinsäuren, z.B. Gene für immunmodulatorisch

wirkende Proteine oder CpG-reiche DNA-Oligonukleotide in HBc-abgeleitete CLPs verpackt werden.

Die Frage nach einer generellen Anwendbarkeit der *in vitro* Assemblierung muss zum heutigen Zeitpunkt dennoch vorsichtig beantwortet werden. Proteine, die während bzw. nach Ausbildung ihrer Tertiärstruktur eine Tendenz zur Di- bzw. Multimerisierung zeigen, neigen häufig zu einer irreversiblen Aggregatbildung. Ein erster Hinweis auf die Partikelbildungsfähigkeit eines solchen Corefusionsproteins ist durch dessen Löslichkeitsverhalten gegeben. Ein Fusionsprotein mit gestörtem Assemblierungsverhalten bildet schon in der Bakterienzelle keine Partikel, sondern hochmolekulare Aggregate, wodurch das Fusionsprotein nicht im löslichen Überstand, sondern größtenteils im Bakterienpellet zu finden ist. Kann das Bakterienpellet unter milden, d.h. semi-denaturierenden Harnstoffkonzentrationen aufgeschlossen werden, kann das Fusionsprotein wahrscheinlich für eine *in vitro* Assemblierung mit unmodifiziertem Coreprotein verwendet werden. Müssen hingegen sehr hohe Harnstoffkonzentrationen verwendet werden, um die Proteine in Lösung zu bringen, zeigt das Protein danach meist irreversible Missfaltungen, die eine Darstellung als Mischpartikel verhindern. Dies konnte am Beispiel der rot-fluoreszierenden Variante von GFP, dsRed2 (HBc149-dsRed2-H₆) gezeigt werden. Beim Versuch das Fusionsprotein *in vitro* mit einem Überschuss an unmodifiziertem Coreprotein zu assemblieren, konnten keine Mosaikpartikel gewonnen werden. HBc149-dsRed2-H₆ stellt ein primär unlösliches Corefusionsprotein dar. Zwar konnte ein Bakterienaufschluss unter denaturierenden Bedingungen und die gemeinsame Bindung der Coreprotein Variante mit unmodifizierten Proteinen an die Nickelsäule durchgeführt werden, aber die Proteine zeigten keine Tendenz zur Mischpartikelbildung, sondern bildeten wiederum nur unlösliche Aggregate. Wahrscheinlich übersteigt hier die Geschwindigkeit eine Multimerisierung des Fusionsanteils dsRed2 die Geschwindigkeit der Core Assemblierung. Die dadurch bedingte Bildung von dsRed2 Aggregaten ist zudem irreversibel, wodurch eine Mischpartikelbildung wirksam verhindert wird.

6.3. Heterologe Nukleinsäuren lassen sich in Kapsid-ähnliche Partikel aus HBV Coreproteinen verpacken.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden reassoziierbare HBV CLPs auf ihre Eignung zur Verpackung von heterologen Nukleinsäuren, im Sinne einer möglichen Anwendung für den Gentransfer, untersucht. An die zu diesem Zweck hergestellten CLP-Konstrukte wurden verschiedene Anforderungen gestellt. Zum einen musste es sich um einfach, möglichst bei geringer Harnstoffkonzentration, dissoziierbare Partikel handeln. Die ausgeprägte Stabilität von Wildtyp Partikeln wird durch die Interaktion von mit verpackter bakterieller RNA an die C-terminalen Argininblöcke des Vollängen Coreproteins und eine intermolekulare Quervernetzung über Disulfidbrücken vermittelt. Versuche, das HBV Vollängen Coreprotein reversibel zu dissoziieren scheiterten bisher. CLPs aus C-terminal verkürzten Coreproteinen weisen hingegen eine herabgesetzte Partikelstabilität auf. Dadurch können die Partikel durch milde denaturierende Bedingungen zu Dimeren mit nativer Tertiärstruktur dissoziiert und bei nativen Pufferbedingungen wieder reassoziert werden (Wingfield *et al.*, 1995). Mit einem C-terminalen His₆-Peptid versehen wurden die C-terminal verkürzten Coreproteine durch Harnstoff zu Dimeren dissoziiert und über eine Ni²⁺-Chelat Affinitätschromatographie gereinigt. Durch die spezifische Bindung der Coreproteine und durch extensive Waschschriffe war es in der Versuchsdurchführung zudem möglich, einen Großteil der bakteriellen Kontaminationen aus den Präparationen zu entfernen. Durch einen im Aufschlussprotokoll vorgesehenen Nukleaseverdau konnte weiterhin ein Teil bakteriellen Nukleinsäuren zumindest enzymatisch abgebaut, allerdings nicht vollständig aus dem Ansatz entfernt werden.

Die zweite Grundvoraussetzung zur Versuchsdurchführung war eine spezifische Assoziation von Nukleinsäure an die Coreproteine ohne die Beteiligung der viralen Polymerase. Zwar können auch bei Coreprotein Varianten, deren C-Terminus bis zu aa 149 deletiert wurde (HBc 1-149) durch zufälligen Einschluss im Zuge des Assemblierung unspezifisch bakterielle Nukleinsäuren mit in die Partikel verpackt werden (Birnbaum und Nassal, 1990), eine effiziente Bindung wird aber nur durch die authentische Nukleinsäurebindungsdomäne des HBV Coreproteins oder auch Teile davon, vermittelt (Hatton *et al.*, 1992). Daher kamen in dieser Arbeit Coreprotein Varianten zum Einsatz, bei denen die Länge des C-Terminus so gewählt

worden war, dass sie entweder ein minimales RNA-Verpackungssegment oder ein zusätzliches DNA-Verpackungssegment aufwiesen. Diese Konstrukte zeichneten sich zudem durch ein im Vergleich zum Wildtyp gutes Dissoziations- und Reassoziationsverhalten aus.

In Kombination mit der oben beschriebenen *in vitro* Assemblierung an Ni²⁺-NTA Säulen gelang es, DNA und im eingeschränkten Ausmaß auch RNA in HBc-abgeleitete CLPs zu verpacken. Vermutlich durch die Anwendung von langsam absteigenden Harnstoffkonzentrationen im Reassoziationsverfahren wurde den Coreprotein Dimeren ermöglicht, Nukleinsäure zu assoziieren und zum Teil auch in die sich assemblierenden Kapside zu verpacken. Bei einer angebotenen DNA-Mischung von 250 bp - 10000 bp wurden Fragmente bis zu einer Größe von ≥ 3000 bp mit den Corepartikeln assoziiert gereinigt. Nicht nur bei der im hohen Ausmaß nachgewiesenen Assoziation der DNA mit den Partikeln, sondern insbesondere auch bei der Nuklease-geschützten Verpackung der Fragmente war aber eine deutliche Präferenz für kleinere Fragmente zwischen 250 bp - 750 bp zu verzeichnen, die nicht durch die künstliche Anreicherung im verwendeten DNA-Mix verursacht wurde. Wurde eine äquimolare Mischung zweier linearer DNA-Fragmente mit 500 bp und 5,5 kb angeboten, wobei das größere deutlich die Größe des HBV Genoms überschritt, wurde das große Fragment zwar mit den CLPs assoziiert, aber nicht Nuklease-geschützt in die CLPs verpackt. Das kleine Fragment hingegen zeigte sowohl eine Assoziation wie auch eine Nuklease-geschützte Verpackung in die Kapside. Beim Versuch DNA Plasmide zu verpacken, deren Größe teilweise die HBV Genomgröße überschritt, konnte ein interessantes Phänomen beobachtet werden. Die aus den CLPs isolierten, Nuklease-geschützten Fragmente entsprachen nicht mehr der ursprünglich eingesetzten DNA. Diese war in sehr kleine DNA Stücke zerlegt worden, wobei die Länge der einzelnen Fragmente in ca. 58 bp Schritten verändert wurde. Das größte detektierbare Fragment wies eine Länge von ca. 750 bp auf. Es wäre denkbar, dass DNA Fragmente wie eine Perlenkette mit Coreproteine besetzt werden. Bei einem relativ kleinem DNA Fragment können die Core Dimere wahrscheinlich ungehindert um die Nukleinsäure herum assemblieren und diese so vor der Nuklease schützen. Größere Fragmente können nicht mehr im Lumen der Partikel untergebracht werden und weisen wahrscheinlich zudem eine starrere, „unbiegsamere“ Struktur auf, wodurch die Assemblierung der Core Dimere verhindert werden kann. Dadurch werden die Bereiche zwischen den einzelnen Core

Dimeren sensitiv für einen Einsatz von Nuklease, die verbleibende gebundene DNA bleibt hingegen geschützt und kann mit in die sich assemblierenden Kapside verpackt werden.

Der Anteil an Core-assoziierten Nukleinsäuren schien in allen durchgeführten Versuchen relativ hoch zu sein. Bei der Auswertung zeigte sich jedoch, dass sich in den verwendeten CsCl Fraktionen zum Teil noch deutliche Mengen an freier Nukleinsäure befunden hatten. Die Abtrennung der nicht-verpackten Nukleinsäuren erfolgte durch eine isopyknische Zentrifugation im CsCl Dichtegradienten. Da es sich dabei um eine Gleichgewichtszentrifugation handelt, ist das Erreichen einer Gleichgewichtseinstellung entscheidend für das Ergebnis der Nukleinsäureabtrennung. Bei einem zu frühen Abbruch der Zentrifugation, also vor Erreichen des Endpunktes, konnte es zu einer unvollständigen Abtrennung der Nukleinsäuren von den beladenen CLPs kommen. Für eine bessere Abtrennung, besonders der kleineren DNA Fragmente, müsste daher deutlich länger zentrifugiert werden. Eine alternative Methode zur Abtrennung der freien Nukleinsäuren läge eventuell in einer differentiellen Zentrifugation, der gezielten Fällung Nukleinsäuren oder einer Immunpräzipitation der Coreproteine durch spezifische Antikörper aus dem Versuchsansatz.

Die Analyse des enzymatischen Verdaus von freier DNA zeigte, dass nur sehr geringe Nuklease Konzentrationen benötigt werden, um nicht verpackte DNA vollständig zu verdauen. Die in den Verpackungsversuchen eingesetzten Konzentrationen an Nuklease waren ca. 10 - 20x höher, wodurch sichergestellt wurde, dass es sich bei den detektierten Nukleinsäuren *de facto* um verpackte DNA handeln musste.

In den bisherigen Versuchen war die Ausbeute der Nuklease-geschützten Verpackung von DNA in HBc-abgeleitete CLPs gering. Anhand der eingesetzten Menge an Coreprotein bzw. der DNA Mischung aus vielen verschiedenen Fragmenten ließ sich abschätzen, dass nur ein Kapsid-ähnlicher Partikel aus ca. 700 mit DNA beladen wurde, die dann auch Nuklease-geschützt war. Eine genaue Aussage über die Verpackungseffizienz in HBc-CLPs ist aber schwierig. Bei den verwendeten Coreprotein Varianten können über die Bindung an den C-Terminus unspezifisch bakterielle Nukleinsäuren aus den *E. coli* Zellen mitgeschleppt werden, die bisher nicht gezielt entfernt wurden. Da die Verpackungsansätze somit noch

kontaminierende Nukleinsäuren enthaltenen können, ist eine Competition mit der $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP markierten DNA um die Nukleinsäurebindungsdomänen denkbar. Für eine Optimierung der Ausbeute von DNA bzw. RNA, die durch Bindung an die Nukleinsäurebindungsdomänen verpackt werden können, wäre eine komplette Eliminierung der unspezifischen Nukleinsäuren notwendig. Für eine Quantifizierung, die den Einfluss der authentischen Nukleinsäurebindungsdomänen bzw. der Länge dieser auf die Ausbeute einer Verpackung von heterologer Nukleinsäuren untersucht, müsste ein direkter Vergleich mit Konstrukten, die diese Domänen nicht enthalten, durchgeführt werden. Die beschriebene Methode müsste daher auf die C-terminale Core Deletionsvariante HBc1-149-H₆ übertragen und mit den Konstrukten HBc156-H₆ bzw. HBc161-H₆ verglichen werden. Ein Filterbindungs-Assay, der neben einem direkten Vergleich unterschiedlicher Coreprotein Varianten zusätzlich den Einfluss einer Phosphorylierung auf die spezifische Nukleinsäurebindung mit einbezieht, ist eines der wichtigsten ausstehenden Projekte. Der Einfluss der Coreprotein Phosphorylierung auf die Nukleinsäurebindung soll im Abschnitt 6.4 weiter diskutiert werden.

Eine Optimierung der Ausbeute an gebundener und verpackter Nukleinsäure in HBc-CLPs, könnte in Anlehnung an die Verpackungsversuche in andere Virus-ähnliche Partikel erfolgen. Bei der Verwendung des Polyoma VP1-Proteins zur Verpackung von DNA konnte z.B. gezeigt werden, dass ein höheres Verhältnis von eingesetzter DNA zu eingesetztem Coreprotein einen positiven Einfluss auf die tatsächliche Ausbeute an Nuklease-geschützter Nukleinsäure ausüben kann. Auch eine starke Abhängigkeit von der Salzkonzentration und des umgebenden pH-Wertes, auf das Assoziations- bzw. Verpackungsverhalten der Polyoma VP1-VLPs wurde beschrieben (Braun *et al.*, 1999), (Henke *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit durchgeführten Verpackungsversuche waren mit einem relativ niederen molaren Verhältnis von Nukleinsäure zu Coreprotein und bei neutralem pH-Wert durchgeführt worden, sodass durch eine Abwandlung der Versuchsbedingungen eine höhere Effizienz denkbar wäre. Durch Verwendung von anderen, nicht HBV-authentischen Nukleinsäurebindungsdomänen, könnten eventuell die Bindungs- und somit Verpackungskapazitäten von HBc-CLPs verändert werden. So besitzen z.B. rekombinante virus-ähnlichen Partikel (VLPs), die aus 90 Dimeren des Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) Kapsidproteins VP60 assembliert wurden, natürlicherweise keine DNA-Bindungsdomäne. Das Human Papilloma Virus (Typ 16;

HPV 16) ist über die DNA Bindungsdomänen L1 und L2 in der Lage, das 8 kb große HPV Genom spezifisch zu verpacken. Durch Fusion der DNA-Bindungsdomänen L1 bzw. L2 an das verkürzte VP60 Protein konnte die DNA-Bindungsaktivität auf die RHDV VLPs übertragen werden, wodurch die Verpackung von heterologer DNA von 7,2 kb möglich wurde (El Mehdaoui *et al.*, 2000). Es scheint wahrscheinlich, dass sich die L1 bzw. auch L2 -vermittelte DNA-Bindungsaktivität auch auf anderen Proteine, wie z.B. das HBV Coreprotein übertragen lässt, wodurch eine höhere Verpackungskapazität denkbar wäre.

Für mögliche Anwendungen der vorgestellten HBc-CLPs als gentherapeutische Vektoren haben sich trotz der erzielten niederen Ausbeute nützliche Schlussfolgerungen ergeben. Die maximale Größe der zu verpackenden Nukleinsäureinformation sollte nicht die Größe des HBV Genoms mit ca. 3 kb übersteigen, eine höhere Verpackungswahrscheinlichkeit ergibt sich wahrscheinlich aber bei der Verwendung von noch kleineren Fragmenten. Größere DNA-Fragmente können mit den Partikeln assoziiert und gemeinsam mit diesen aufgearbeitet werden. Ob aber die außerhalb der Partikel liegenden Nukleinsäuren durch die Assoziation mit dem Protein bei einem Transfer in eine Zelle vor Nukleasen geschützt sind, bleibt bisher ungeklärt.

Die Eignung von HBC-abgeleiteten CLPs für den Einsatz als Transportbehälter für heterologe Nukleinsäuren im Sinne von gentherapeutischen Anwendungen könnte weiter untersucht werden. Ein wesentlicher Vorteil der *in vitro* Verpackung liegt z.B. in der Möglichkeit, die zu verpackende Nukleinsäure gezielt auszuwählen und/oder biochemisch zu verändern. Ein erfolgreicher Transfer ließe sich z.B. durch die Verpackung von fluoreszenz-markierter DNA in der Zelle verfolgen. Die Expression der so transfizierten Nukleinsäure ließe sich z.B. durch die Verwendung eines Gens, welches für GFP kodiert, direkt über die Fluoreszenz in der Zelle nachweisen. Für den Transport in die Zelle sind verschiedene Ansätze denkbar. Die Verwendung von verschiedenen Protein Transduktionsmotiven (protein transduction domain = PTD) wie z.B. dem von HIV stammenden TAT-Motiv oder synthetischen Poly-Argininsequenzen, die auf der Oberfläche der Partikel präsentiert werden, ist ebenso denkbar wie kommerzielle Protein-Transduktions-Reagenzien wie BioPORTER® oder Chariot™. Eine zusammenfassende Darstellung neuerer Methoden und biologischer Anwendungen der Protein Transduktion sind z.B. in (Bonetta, 2002) oder (Kabouridis, 2003) gegeben. Eine interessante Methode liegt in der Zelltyp-

spezifische Transduktion durch direkte Präsentation einer Antikörper-Bindungsdomäne auf der Oberfläche der CLPs. Die Variante VP1-Z des Polyomavirus ist ein Fusionsprotein des Kapsidproteins VP1 mit einer Antikörper-Bindungsdomäne Z. Dieses Konstrukt ist in der Lage den Antikörper Herceptin zu binden. Bei Transduktion kommt es zur spezifischen Bindung des Antikörpers mit der Rezeptor Tyrosin Kinase ErbB2, dem Antigen, das in den Zielzellen exprimiert wird (Gleiter und Lilie, 2003).

Die Verpackung von RNA erwies sich bei der Durchführung als technisch schwierig. Zum einem war eine Detektion der mit unmarkierter RNA beladenen Kapside nur sehr schwer möglich. Bei der Analyse von Core-assoziiertes wie auch Nuklease-geschützter ^{32}P -RNA stellte sich heraus, dass es während der Versuchsdurchführung zu einem Abbau der Nukleinsäuren gekommen war und die Kapside nicht die ursprünglich eingesetzten, sondern nur sehr kleine RNA-Fragmente enthielten. Im Sinne einer antiviralen Therapie könnten sich aus dieser Beobachtung dennoch weitere Anwendungen ergeben, z.B. die Verpackung von sehr kurzen, inhibitorisch wirkenden RNA-Molekülen wie siRNA (Small interfering RNA) (Arenz und Schepers, 2003). Dabei sollten in künftigen Versuchen zur Verpackung von RNA spezielle Bedingungen, wie dem Einsatz von RNAsin, DEPC-behandelte Geräte und Lösungen, eingesetzt werden.

6.4. Durch Koexpression mit der Serin-Arginin-Protein-spezifische-Kinase 1 (SRPK 1) können *in vivo* phosphorylierte rekombinante HBV Coreprotein Varianten hergestellt werden

Durch die hier gezeigte *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierung von rekombinanten HBV und DHBV Kapsiden konnte die von Daub *et al.* beschriebene Phosphorylierung von eukaryot exprimierten HBV Coreproteinen durch die Serin-Arginin-Protein-spezifische-Kinase 1 (SRPK 1) bestätigt werden (Daub *et al.*, 2002). Die mit SRPK 1 sehr eng verwandte Kinase SRPK 2 zeigte bei Daub *et al.* vergleichbare biochemische Eigenschaften, wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Substrateigenschaften von SRPK 2 sind bisher gründlicher beschrieben worden als die von SRPK 1, lassen sich aber auf Grund der engen Sequenzverwandtschaft vermutlich auf das hier verwendete Homolog SRPK 1 übertragen, da schon in früheren Versuchen schon gezeigt werden konnte, dass

SRPK 1 und SRPK 2 *in vitro* in der Lage sind, dieselben Substrate zu phosphorylieren (Wang *et al.*, 1998). Beide Kinasen sind spezifisch für die Phosphorylierung von so genannten RS-Domänen zuständig (Colwill *et al.*, 1996). Sie erkennen spezifisch Argininreste in der Nähe der Phosphorylierungsstelle, wobei hier nur Serin-, aber nicht Threoninreste phosphoryliert werden (Gui *et al.*, 1994b). Für SRPK 2 konnte zudem gezeigt werden konnte, dass die Kinase Argininreste an Position P-3 vom Serinrest und Prolinreste in Position P+1 bevorzugt (Wang *et al.*, 1998). Überträgt man dieses Muster auf die drei Serinreste S155, S162 und S170 des HBV Coreproteins (*ayw*), findet man für alle kritischen Faktoren eine perfekte Übereinstimmung für eine erfolgreiche Phosphorylierung. Die Phosphorylierung der DHBV Partikel war zunächst überraschend, da nur sehr wenige Übereinstimmungen in der C-terminalen Sequenz des Coreprotein von HBV bzw. des Entenhomologs vorliegen und nicht nur die Lage, sondern auch die Anzahl der Phosphorylierungsstellen beider Coreproteine deutlich variiert. Trotzdem lassen sich aber in der C-terminalen Region von DHBc zwei Serinreste bestimmen, bei denen die umgebenden Arginin- bzw. Prolinreste das P-3 und P+1 Kriterium erfüllen können. Die bevorzugten Substrate von PKC zeigen hingegen ein abweichendes Muster. PKC erkennt zwar auch Argininreste in der Nähe der Phosphorylierungsstellen, eine Selektion gegen Prolin in Position P+1 unter physiologischen Bedingungen ist aber bekannt (Nishikawa *et al.*, 1997). In wieweit PKC für eine Coreprotein Phosphorylierung *in vivo* zuständig sein könnte, bleibt daher fraglich.

Die Phosphorylierung von HBV Partikeln konnte durch Einbau von radioaktiv markiertem ATP als Substrat oder direkt über die Auftrennung in einem hochauflösendem Tris-Tricingel (Schägger und von Jagow, 1987) nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von DHBV Partikeln konnte durch eine deutliche Erhöhung der Mobilität in einem herkömmlichen Tris-Glycin SDS-Gel dargestellt werden. Dabei zeigte sich, dass eine durch die Koexpression mit SRPK 1 verursachte *in vivo* Phosphorylierung weit effizienter war als eine *in vitro* Phosphorylierung mit der rekombinanten Kinase. Inwieweit sich die *in vitro* Versuchsbedingungen noch optimieren lassen, muss noch getestet werden. Bei einer Phosphorylierung handelt es sich um eine grundsätzlich reversible Modifikation. In dieser Arbeit konnte aber unter den angewendeten Versuchsbedingungen keine Phosphatase gefunden werden, die dazu in der Lage

war, die durch SRPK 1 angefügten Phosphatreste wieder vollständig zu entfernen. Falls es sich bei SRPK 1 um eine der HBV-spezifischen zellulären Kinasen handeln sollte, müsste die entsprechende spezifische zelluläre Phosphatase ebenfalls existieren, die aber noch identifiziert werden muss.

Eine sehr wichtige Erkenntnis, die in diesem Projekt gewonnen werden konnte, ist die Unabhängigkeit der SRPK 1 Phosphorylierung von einer kurzfristigen Destabilisierung („Permeabilisierung“) der Corestruktur. Die bekannte Phosphorylierung der C-Termini im HBV Coreprotein durch die Protein Kinase C (PKC) konnte *in vitro* nach reversibler „Permeabilisierung“ der Partikel gezeigt werden, wodurch eine Verpackung der Kinase in die Kapside möglich erschien (Kann *et al.*, 1993), (Kann und Gerlich, 1994). Erst kürzlich wurden Hinweise erhalten, dass eine Phosphorylierung des HBV C-Terminus die Exposition der internen Kernlokalisationssequenz verursachen könnte. Die *in vitro* Phosphorylierung durch PKC ermöglichte die Zugänglichkeit dieser Sequenz und dadurch den Transport von bakteriell exprimierten Kapsid-ähnlichen Partikeln zur Kernpore. Der Transport ohne vorherige Phosphorylierung blieb vollständig aus (Kann *et al.*, 1999). Neueste Untersuchungen in dieser Arbeit haben ergeben, dass auch die durch SRPK 1 verursachte Phosphorylierung von rekombinanten HBV Corepartikeln dazu in der Lage ist, den Transport der Kapside zum Kern zu ermöglichen. Die Effizienz und die spezifische Inhibierbarkeit dieses SRPK 1-vermittelten Transports war vergleichbar mit der zuvor gezeigten PKC Phosphorylierung. Der Transport durch die Kernpore hindurch sowie eine Partikel-Dissoziation zur Freisetzung der enthaltenen Nukleinsäuren kann jedoch nur bei aus Hepatomazellen isolierten genomhaltigen HBV Kapsiden, nicht aber bei rekombinanten, phosphorylierten Partikeln beobachtet werden (Rabe *et al.*, 2003). Man geht davon aus, dass nur reife HBV Partikel, die ein teilweise doppelsträngige DNA Genom enthalten, sowohl zur Kernpore, als auch durch sie hindurch transportiert werden können, um dort das Genom in den Kern freizusetzen. Die Resultate des SRPK 1-vermittelten Kerntransports sprechen aber dafür, dass kein Unterschied zwischen einer PKC und einer SRPK 1 Phosphorylierung von HBc existiert, da beide den Kerntransport ermöglichen. Somit können beide Kinase weiterhin als gleichwertige Kandidaten einer authentischen HBV-spezifischen Kinase angesehen werden. Ausweiten ließen sich diese Untersuchungen aber mit *in vitro* assemblierten und DNA-bepackten Kapsid-

ähnlichen Partikel, die nach Phosphorylierung mit SRPK 1, reife HBV Kapside nachahmen könnten.

Gerade die Freisetzung im Kern der im Zuge der reversen Transkription entstandenen teilweise doppelsträngigen DNA, benötigt eine gelockerte Partikelstruktur. Eine Bindung von DNA an das phosphorylierte Coreprotein könnte weniger fest sein, wodurch der C-Terminus exponiert und an der Oberfläche der Partikel als Kernlokalisationssequenz zugänglich werden kann. Ein möglicher Einfluß der SRPK 1-vermittelten Phosphorylierung könnte z.B. durch *in vitro* Verpackungsversuche von DNA in phosphorylierten CLPs untersucht werden. Es wäre denkbar, dass es, wie schon für DHBV Coreproteine gezeigt (Köck *et al.*, 2003), durch eine Phosphorylierung der Coreproteine zu einer deutlich Nuklease-sensitiveren Verpackung von DNA kommt, da die Partikelstruktur durch diese Modifikation gelockert vorliegt.

Im Lebenszyklus von HBV scheint eine Phosphorylierung des C-Terminus für die Verpackung von pgRNA notwendig zu sein (Gazina *et al.*, 2000). Die spezifische Phosphorylierung entscheidender Serinreste im C-Terminus könnte z.B. dafür sorgen, dass nur die dafür vorgesehene pgRNA, die durch die ε -Haarnadelschleife an der Polymerase gebunden vorliegt, spezifisch verpackt wird. Allen anderen RNAs im vorliegenden RNA-Pool des Zytoplasma wie mRNAs, rRNAs und tRNAs würde somit eine Bindung nicht ermöglicht oder zumindest erschwert werden. Ob dabei alle Serinreste innerhalb einer Coreprotein Untereinheit phosphoryliert werden, oder ob überhaupt alle Coreprotein Untereinheiten im Partikel phosphoryliert vorliegen müssen, ist bisher ungeklärt (Gerlich *et al.*, 1982). Durch die spezifische Bindung wird die RNA gezielt in die sich assemblierenden Kapside verpackt, wobei durch die sehr stabile Partikelstruktur ein optimaler Schutz des Transkripts gewährleistet wird. Offen bleibt aber weiterhin die Frage nach der Identität derjenigen Kinase, die durch Phosphorylierung für eine spezifische Bindung der prägenomischen RNA an die Coreprotein und damit für die gemeinsame Verpackung mit der Polymerase zuständig ist. Beruhend auf der Tatsache, dass HBV Coreproteine Serin- (S) und Arginin (R)-reiche Domänen aufweisen, könnte die Phosphorylierung durch SRPK 1 über einen Antikörper nachweisbar sein, der spezifisch die im SRPK 1 Konsensus-Motiv liegende Phosphorylierung erkennt. Ein solcher Antikörper ist z.B. der in der Literatur beschriebene Antikörper mAb104, welcher ein spezifisches Phospho-Epitop aller Mitglieder der SR-Proteinfamilie erkennen kann (Zahler *et al.*, 1992). Mithilfe

dieses Antikörpers sollte es möglich sein nachzuweisen, ob durch die Phosphorylierung mit SRPK 1 in den HBV und DHBV Coreproteinen eine solche Antikörper-Erkennungssequenz geschaffen wird. Sollte der Nachweis bei rekombinanten Coreproteinen gelingen, wäre es interessant, auch aus Hepatozyten oder Hepatomzellen gewonnene Partikel auf diese Modifikation hin mit mAb104 zu untersuchen. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Phosphorylierung von Serin (S)- und Arginin (R)-reichen Domänen eine unspezifische Bindung von RNA verhindert werden kann (Tacke *et al.*, 1997).

Die Möglichkeit, rekombinante Coreproteine *in vitro* und *in vivo* durch SRPK 1 definiert phosphorylieren und in großen Mengen herstellen zu können, erlaubt es, die Affinität heterologer Nukleinsäuren, sowie eventuell auch der viralen pgRNA an die Coreproteine weiter zu untersuchen. Ein erster Hinweis, welchen Einfluss eine SRPK 1-Phosphorylierung auf die Nukleinsäurebindungsfähigkeit des Coreproteins haben könnte, lag im nachgewiesenen Gehalt verpackter bakterieller Nukleinsäuren in rekombinanten HBV Partikeln. In phosphorylierten Partikeln wurde ca. 10x weniger verpackte Nukleinsäure detektiert als in nicht-phosphorylierten Partikeln. Ein direkter Test, der den Einfluss der Phosphorylierung auf die Nukleinsäurebindungsfähigkeit weiter untersuchen würde, wäre ein klassischer Filterbindungs-Assay, bei dem Coreproteine auf einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert werden. Durch Inkubation mit markierten Nukleinsäuren sollte, nach Entfernung der ungebundenen Nukleinsäuren, ein direkter Rückschluss von den messbaren radioaktiven Signalen auf die Bindungsfähigkeit der Coreprotein Varianten möglich sein (Hatton *et al.*, 1992). Diese Analyse wurde in abgewandelter Form mit auf PVDF Membran gespotteten Coreproteinen durchgeführt, lieferte aber noch kein auswertbares Ergebnis. Eine Wiederholung ist geplant.

In rekombinanten Kapsiden ohne C-terminale Nukleinsäurebindungsdomänen kommt es zu keiner sequenz-spezifischen Bindung von pgRNA, wodurch nur bakterielle RNA im Zuge der Assemblierung unspezifisch mit in die Kapside verpackt wird. Daher besteht die Möglichkeit, dass vermehrt C-Termini der Coreprotein-Untereinheiten ungebunden vorliegen und auf der Oberfläche der Partikel exponiert werden können. Die Verlängerung des C-Terminus durch das His₆-Peptid könnte zudem zu einer besseren Exposition bzw. Zugänglichkeit des C-Terminus führen, wodurch sich die in dieser Arbeit gezeigten erhöhten Signale bei der Phosphorylierung von HBV Coreproteinen mit His₆-Peptid Fusion erklären ließen. Ein

Nachweis für die verstärkte Exposition der phosphorylierten C-Termini wäre z.B. ein tryptischer Verdau von SRPK 1-phosphorylierten und nicht-phosphorylierten HBV bzw. DHBV Partikeln, der eventuell durch das Vorhandensein eines C-terminalen His₆-Peptids zusätzlich beeinflusst werden kann. Neuste Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Phosphorylierung von genomhaltigen Kapsiden Bestandteil des Reifungsprozesses bzw. selbst eine Art Reifungssignal darstellen könnte, welches den Nukleokapsiden die Umhüllung und die nachfolgende Sekretion aus der Zelle oder auch den Transport in den Kern ermöglichen kann (Summers und Mason, 1982), (Perlman und Hu, 2003). Die Herstellung von rekombinanten *in vivo* phosphorylierten HBV und DHBV Partikeln, als Modell „reifer“ Nukleokapside, könnte detaillierte Untersuchungen zum Einfluss der Phosphorylierung auf die Partikelgesamtstruktur durch hochauflösende Verfahren erlauben. Gerade zur Erlangung struktureller Informationen von Viren in den unterschiedlichsten Stadien der Reifung, bietet die Kryo-Elektronenmikroskopie ausgezeichnete Möglichkeiten. So war es bei einigen Viren im Gegensatz zu röntgenkristallographischen Methoden möglich, diese unterschiedlichen Stadien, durch das blitzartige Einfrieren der Proben zu erhalten und die der Umordnung der Proteinuntereinheiten in den Viruspartikeln darzustellen. Durch Kombination mit röntgenkristallographischen Strukturdaten von mindestens einer viralen Proteinuntereinheit können diese Daten in die erhaltenen Elektronendichtekarten eingepasst werden und die Auflösung weiter verfeinert werden. Ein aktueller Überblick über die sich gegenseitig ergänzenden Methoden von Kryo-Elektronenmikroskopie, Röntgen-Kristallographie und weiteren Techniken zur Ermittlung von Strukturdaten, z.B. ikosahedral symmetrischer Viren, wurde gerade veröffentlicht (Lee und Johnson, 2003).

Die durchgeführten Versuche mit SRPK 1 an HBV und DHBV Coreproteine machen deutlich, wie wenig über den Einfluss einer so wichtigen Modifikation wie der Phosphorylierung bisher bekannt ist. Der Nachweis von SRPK 1 oder dem Homolog SRPK 2 in infizierten Hepatozyten, eine Koexpression von SRPK 1 und HBV oder die Überexpression der Kinase Zellkultur, sowie weiterführende Versuche mit den vorgestellten rekombinanten Proteinen könnte dazu beitragen, diese Lücken zu füllen.

7. Literaturverzeichnis

- Albin, C. und Robinson, W.S. (1980) Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.*, **34**, 297-302.
- Arbuthnot, P., Capovilla, A. und Kew, M. (2000) Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **15**, 357-368.
- Arenz, C. und Schepers, U. (2003) RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften*, **90**, 345-359.
- Ausubel, F.M. und Frederick, M. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. Inc.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A. und Tsien, R.Y. (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 11984-11989.
- Baker, T.S., Olson, N.H. und Fuller, S.D. (1999) Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 862-922.
- Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M. und Schaller, H. (1990) The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J. Virol.*, **64**, 5324-5332.
- Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1992) Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.*, **11**, 3413-3420.
- Beck, J. und Nassal, M. (2001) Reconstitution of a Functional Duck Hepatitis B Virus Replication Initiation Complex from Separate Reverse Transcriptase Domains Expressed in Escherichia coli. *J. Virol.*, **75**, 7410-7419.
- Beck, J. und Nassal, M. (2003) Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36128-36138.
- Beck, J., Vogel, M. und Nassal, M. (2002) dNTP versus NTP discrimination by phenylalanine 451 in duck hepatitis B virus P protein indicates a common

- structure of the dNTP-binding pocket with other reverse transcriptases. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1679-1687.
- Beterams, G. (2000) Das Coreprotein der Hepatitis B Viren: Untersuchungen zu Struktur und Assemblierung unter besonderer Berücksichtigung seiner Einsatzmöglichkeit für eine antivirale Therapie. Dissertation, Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Beterams, G., Böttcher, B. und Nassal, M. (2000) Packaging of up to 240 subunits of a 17 kDa nuclease into the interior of recombinant hepatitis B virus capsids. *FEBS Lett.*, **481**, 169-176.
- Beterams, G. und Nassal, M. (2001) Significant Interference with Hepatitis B Virus Replication by a Core-nuclease Fusion Protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 8875-8883.
- Bevis, B.J. und Glick, B.S. (2002) Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.*, **20**, 83-87.
- Birkett, A., Lyons, K., Schmidt, A., Boyd, D., Oliveira, G.A., Siddique, A., Nussenzweig, R., Calvo-Calle, J.M. und Nardin, E. (2002) A modified hepatitis B virus core particle containing multiple epitopes of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein provides a highly immunogenic malaria vaccine in preclinical analyses in rodent and primate hosts. *Infect. Immun.*, **70**, 6860-6870.
- Birnbaum, F. und Nassal, M. (1990) Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J. Virol.*, **64**, 3319-3330.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Blumberg, B.S. (1997) Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 7121-7125.
- Bock, C.T., Schranz, P., Schröder, C.H. und Zentgraf, H. (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes*, **8**, 215-229.
- Bock, C.T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M.P., Trautwein, C. und Zentgraf, H. (2001) Structural Organization of the Hepatitis B Virus Minichromosome. *J. Mol. Biol.*, **307**, 183-196.
- Bonetta, L. (2002) Getting proteins into cells. Online Journal: *The scientist.com*, Vol. **16**, Seite 38.

- Borisova, G., Borschukova Wanst, O., Mezule, G., Skrastina, D., Petrovskis, I., Dislers, A., Pumpens, P. und Grens, E. (1996) Spatial structure and insertion capacity of immunodominant region of hepatitis B core antigen. *Intervirology*, **39**, 16-22.
- Böttcher, B., Wynne, S.A. und Crowther, R.A. (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, **386**, 88-91.
- Böttcher, B., Tsuji, N., Takahashi, H., Dyson, M.R., Zhao, S., Crowther, R.A. und Murray, K. (1998) Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *EMBO J.*, **17**, 6839-6845.
- Bouchard, M.J., Wang, L.H. und Schneider, R.J. (2001) Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science*, **294**, 2376-2378.
- Bouchard, M.J., Puro, R.J., Wang, L. und Schneider, R.J. (2003) Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J. Virol.*, **77**, 7713-7719.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Braun, H., Boller, K., Löwer, J., Bertling, W.M. und Zimmer, A. (1999) Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 31-43.
- Breiner, K.M., Urban, S. und Schaller, H. (1998) Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J. Virol.*, **72**, 8098-8104.
- Bringas, R. (1997) Folding and assembly of hepatitis B virus core protein: a new model proposal. *J. Struct. Biol.*, **118**, 189-196.
- Bruss, V. und Gerlich, W.H. (1988) Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology*, **163**, 268-275.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R. und Gerlich, W.H. (1994) Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J.*, **13**, 2273-2279.

- Bruss, V., Gerhardt, E., Vieluf, K. und Wunderlich, G. (1996a) Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology*, **39**, 23-31.
- Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E. und Galle, P.R. (1996b) Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology*, **218**, 396-399.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. und Tsien, R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 7877-7882.
- Caspar, D. und Klug, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1-24.
- Ceres, P. und Zlotnick, A. (2002) Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry*, **41**, 11525-11531.
- Chacon, P. und Wriggers, W. (2002) Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, **317**, 375-384.
- Chang, C., Zhou, S., Ganem, D. und Standring, D.N. (1994) Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential. *J. Virol.*, **68**, 5225-5231.
- Chang, S.F., Netter, H.J., Hildt, E., Schuster, R., Schaefer, S., Hsu, Y.C., Rang, A. und Will, H. (2001) Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. *J. Virol.*, **75**, 161-170.
- Chouteau, P., Le Seyec, J., Cannie, I., Nassal, M., Guguen-Guillouzo, C. und Gripon, P. (2001) A short N-proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J. Virol.*, **75**, 11565-11572.
- Colwill, K., Feng, L.L., Yeakley, J.M., Gish, G.D., Caceres, J.F., Pawson, T. und Fu, X.-D. (1996) SRPK1 and Clk/Sty Protein Kinases Show Distinct Substrate Specificities for Serine/Arginine-rich Splicing Factors. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24569-24575.
- Conway, J.F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P.T., Stahl, S.J. und Steven, A.C. (1997) Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*, **386**, 91-94.
- Conway, J.F., Cheng, N., Zlotnick, A., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., Belnap, D.M., Kanngiesser, U., Noah, M. und Steven, A.C. (1998a) Hepatitis B virus capsid:

- localization of the putative immunodominant loop (residues 78 to 83) on the capsid surface, and implications for the distinction between c and e-antigens. *J. Mol. Biol.*, **279**, 1111-1121.
- Conway, J.F., Cheng, N., Zlotnick, A., Stahl, S.J., Wingfield, P.T. und Steven, A.C. (1998b) Localization of the N terminus of hepatitis B virus capsid protein by peptide-based difference mapping from cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 14622-14627.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Böttcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V. und Pumpens, P. (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, **77**, 943-950.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. und Briggs, M. (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, **1**, 695-698.
- Daub, H., Blencke, S., Habenberger, P., Kurtenbach, A., Dennenmoser, J., Wissing, J., Ullrich, A. und Cotten, M. (2002) Identification of SRPK1 and SRPK2 as the Major Cellular Protein Kinases Phosphorylating Hepatitis B Virus Core Protein. *J. Virol.*, **76**, 8124-8137.
- Dyson, M.R. und Murray, K. (1995) Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: association of the core and surface antigens of hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 2194-2198.
- Eckhardt, S.G., Milich, D.R. und McLachlan, A. (1991) Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J. Virol.*, **65**, 575-582.
- El Mehdaoui, S., Touze, A., Laurent, S., Sizaret, P.Y., Rasschaert, D. und Coursaget, P. (2000) Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.*, **74**, 10332-10340.
- Fouillot, N., Tlouzeau, S., Rossignol, J.M. und Jean-Jean, O. (1993) Translation of the hepatitis B virus P gene by ribosomal scanning as an alternative to internal initiation. *J. Virol.*, **67**, 4886-4895.
- Fradkov, A.F., Chen, Y., Ding, L., Barsova, E.V., Matz, M.V. und Lukyanov, S.A. (2000) Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett.*, **479**, 127-130.

- Gallina, A., Bonelli, F., Zentilin, L., Rindi, G., Muttini, M. und Milanesi, G. (1989) A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.*, **63**, 4645-4652.
- Ganem, D. (1991) Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **168**, 61-83.
- Gazina, E.V., Fielding, J.E., Lin, B. und Anderson, D.A. (2000) Core Protein Phosphorylation Modulates Pregenomic RNA Encapsidation to Different Extents in Human and Duck Hepatitis B Viruses. *J. Virol.*, **74**, 4721-4728.
- Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E. und Bruss, V. (1996) Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J. Virol.*, **70**, 4269-4274.
- Gerin, J.L., Ford, E.C. und Purcell, R.H. (1975) Biochemical characterization of Australia antigen. Evidence for defective particles of hepatitis B virus. *Am. J. Pathol.*, **81**, 651-668.
- Gerlich, W.H., Goldmann, U., Müller, R., Stibbe, W. und Wolff, W. (1982) Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J. Virol.*, **42**, 761-766.
- Gleiter, S. und Lilie, H. (2003) Cell-type specific targeting and gene expression using a variant of polyoma VP1 virus-like particles. *Biol Chem*, **384**, 247-255.
- Green, G.R., Lee, H.J. und Poccia, D.L. (1993) Phosphorylation weakens DNA binding by peptides containing multiple "SPKK" sequences. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11247-11255.
- Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. und Guguen-Guillouzo, C. (1995) Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology*, **213**, 292-299.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. und Guguen-Guillouzo, C. (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 15655-15660.
- Gui, J.F., Lane, W.S. und Fu, X.D. (1994a) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*, **369**, 678-682.

- Gui, J.F., Tronchere, H., Chandler, S.D. und Fu, X.D. (1994b) Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**, 10824-10828.
- Hatton, T., Zhou, S. und Standing, D. (1992) RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J. Virol.*, **66**, 5232-5241.
- Heermann, K.H., Kruse, F., Seifer, M. und Gerlich, W.H. (1987) Immunogenicity of the gene S and Pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments. *Intervirology*, **28**, 14-25.
- Henke, S., Rohmann, A., Bertling, W.M., Dingermann, T. und Zimmer, A. (2000) Enhanced in vitro oligonucleotide and plasmid DNA transport by VP1 virus-like particles. *Pharm. Res.*, **17**, 1062-1070.
- Hoofnagle, J.H., Gerety, R.J. und Barker, L.F. (1973) Antibody to hepatitis-B-virus core in man. *Lancet*, **2**, 869-873.
- Hu, J. und Seeger, C. (1996) Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 1060-1064.
- Huovila, A.P., Eder, A.M. und Fuller, S.D. (1992) Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J. Cell. Biol.*, **118**, 1305-1320.
- Ishikawa, T. und Ganem, D. (1995) The pre-S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 6259-6263.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1990) A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.*, **9**, 3389-3396.
- Kabouridis, P.S. (2003) Biological applications of protein transduction technology. *Trends Biotechnol.*, **21**, 498-503.
- 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. Suppl.*, **8**, 53-62.
- Kann, M. und Gerlich, W.H. (1994) Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J. Virol.*, **68**, 7993-8000.

- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H. und Helenius, A. (1999) Phosphorylation-dependent Binding of Hepatitis B Virus Core Particles to the Nuclear Pore Complex. *J. Cell Biol.*, **145**, 45-55.
- Kazaks, A., Lachmann, S., Koletzki, D., Petrovskis, I., Dislers, A., Ose, V., Skrastina, D., Gelderblom, H.R., Lundkvist, A., Meisel, H., Borisova, G., Krüger, D.H., Pumpens, P. und Ulrich, R. (2002) Stop codon insertion restores the particle formation ability of hepatitis B virus core-hantavirus nucleocapsid protein fusions. *Intervirology*, **45**, 340-349.
- Kenney, J.M., von Bonsdorff, C.H., Nassal, M. und Fuller, S.D. (1995) Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Structure*, **3**, 1009-1019.
- Köck, J. und Schlicht, H.J. (1993) Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J. Virol.*, **67**, 4867-4874.
- Köck, J., Kann, M., Pütz, G., Blum, H.E. und Von Weizsäcker, F. (2003) Central role of a serine phosphorylation site within duck hepatitis B virus core protein for capsid trafficking and genome release. *J. Biol. Chem.*, **278**, 28123-28129.
- Koletzki, D., Zankl, A., Gelderblom, H.R., Meisel, H., Dislers, A., Borisova, G., Pumpens, P., Krüger, D.H. und Ulrich, R. (1997) Mosaic hepatitis B virus core particles allow insertion of extended foreign protein segments. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2049-2053.
- Kratz, P.A., Böttcher, B. und Nassal, M. (1999) Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 1915-1920.
- Kuroki, K., Cheung, R., Marion, P.L. und Ganem, D. (1994) A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. *J. Virol.*, **68**, 2091-2096.
- Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F. und Ganem, D. (1995) gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15022-15028.
- Lachmann, S., Meisel, H., Muselmann, C., Koletzki, D., Gelderblom, H.R., Borisova, G., Krüger, D.H., Pumpens, P. und Ulrich, R. (1999) Characterization of potential insertion sites in the core antigen of hepatitis B virus by the use of a short-sized model epitope. *Intervirology*, **42**, 51-56.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambert, C. und Prange, R. (2003) Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 5199-5204.
- Lan, Y.T., Li, J., Liao, W. und Ou, J. (1999) Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology*, **259**, 342-348.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns, R.B., 3rd und Rico-Hesse, R. (1998) Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 5757-5761.
- Lee, K.K. und Johnson, J.E. (2003) Complementary approaches to structure determination of icosahedral viruses. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 558-569.
- Liao, W. und Ou, J. (1995) Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J. Virol.*, **69**, 1025-1029.
- Lin, C.G. und Lo, S.J. (1992) Evidence for involvement of a ribosomal leaky scanning mechanism in the translation of the hepatitis B virus pol gene from the viral pregenome RNA. *Virology*, **188**, 342-352.
- Liu, N., Tian, R. und Loeb, D.D. (2003) Base pairing among three cis-acting sequences contributes to template switching during hepadnavirus reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 1984-1989.
- Löffler-Mary, H., Werr, M. und Prange, R. (1997) Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology*, **235**, 144-152.
- Mabit, H., Breiner, K.M., Knaust, A., Zachmann-Brand, B. und Schaller, H. (2001) Signals for bidirectional nucleocytoplasmic transport in the duck hepatitis B virus capsid protein. *J. Virol.*, **75**, 1968-1977.
- Machida, A., Ohnuma, H., Tsuda, F., Yoshikawa, A., Hoshi, Y., Tanaka, T., Kishimoto, S., Akahane, Y., Miyakawa, Y. und Mayumi, M. (1991) Phosphorylation in the carboxyl-terminal domain of the capsid protein of hepatitis B virus: evaluation with a monoclonal antibody. *J. Virol.*, **65**, 6024-6030.

- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H. und Robinson, W.S. (1980) A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **77**, 2941-2945.
- Mason, W.S., Seal, G. und Summers, J. (1980) Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.*, **36**, 829-836.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. und Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 969-973.
- Metzger, K. und Bringas, R. (1998) Proline-138 is essential for the assembly of hepatitis B virus core protein. *J. Gen. Virol.*, **79**, 587-590.
- Milich, D.R. und McLachlan, A. (1986) The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science*, **234**, 1398-1401.
- Milich, D.R., Schödel, F., Hughes, J.L., Jones, J.E. und Peterson, D.L. (1997) The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol.*, **71**, 2192-2201.
- Miller, R.H. und Robinson, W.S. (1986) Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **83**, 2531-2535.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Murakami, S. (1999) Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology*, **42**, 81-99.
- Nassal, M. (1992a) The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J. Virol.*, **66**, 4107-4116.
- Nassal, M. (1992b) Conserved cysteines of the hepatitis B virus core protein are not required for assembly of replication-competent core particles nor for their envelopment. *Virology*, **190**, 499-505.
- Nassal, M. und Rieger, A. (1993) An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J. Virol.*, **67**, 4307-4315.
- Nassal, M. und Schaller, H. (1993) Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol.*, **1**, 221-228.
- Nassal, M. und Schaller, H. (1996) Hepatitis B virus replication--an update. *J. Viral Hepat.*, **3**, 217-226.

- Nassal, M. (2002) Ca²⁺: the clue to hepatitis B virus X protein function? *Hepatology*, **36**, 755-757.
- Neiryneck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W.M. und Fiers, W. (1999) A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.*, **5**, 1157-1163.
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.J., Songyang, Z. und Cantley, L.C. (1997) Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 952-960.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. und Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, **273**, 1392-1395.
- Pante, N. und Kann, M. (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 425-434.
- Parker, R.C. und Seed, B. (1980) Two-dimensional agarose gel electrophoresis "SeaPlaque" agarose dimension. *Methods Enzymol.*, **65**, 358-363.
- Perlman, D. und Hu, J. (2003) Duck hepatitis B virus virion secretion requires a double-stranded DNA genome. *J. Virol.*, **77**, 2287-2294.
- Petit, M.A. und Pillot, J. (1985) HBc and HBe antigenicity and DNA-binding activity of major core protein P22 in hepatitis B virus core particles isolated from the cytoplasm of human liver cells. *J. Virol.*, **53**, 543-551.
- Ponsel, D. und Bruss, V. (2003) Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J. Virol.*, **77**, 416-422.
- Pope, B. und Kent, H.M. (1996) High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 536-537.
- Prange, R. und Streeck, R.E. (1995) Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.*, **14**, 247-256.
- Prassolov, A., Hohenberg, H., Kalinina, T., Schneider, C., Cova, L., Krone, O., Frolich, K., Will, H. und Sirma, H. (2003) New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J. Virol.*, **77**, 1964-1976.
- Pult, I., Netter, H.J., Bruns, M., Prassolov, A., Sirma, H., Hohenberg, H., Chang, S.F., Frolich, K., Krone, O., Kaleta, E.F. und Will, H. (2001) Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology*, **289**, 114-128.

- Pushko, P., Sallberg, M., Borisova, G., Ruden, U., Bichko, V., Wahren, B., Pumpens, P. und Magnius, L. (1994) Identification of Hepatitis B Virus Core Protein Regions Exposed or internalized at the Surface of HBcAg Particles by Scanning with Monoclonal Antibodies. *Virology*, **202**, 912-920.
- Rabe, B., Vlachou, A., Pante, N., Helenius, A. und Kann, M. (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 9849-9854.
- Radziwill, G., Tucker, W. und Schaller, H. (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J. Virol.*, **64**, 613-620.
- Rieger, A. und Nassal, M. (1996) Specific hepatitis B virus minus-strand DNA synthesis requires only the 5' encapsidation signal and the 3'-proximal direct repeat DR1. *J. Virol.*, **70**, 585-589.
- Salfeld, J., Pfaff, E., Noah, M. und Schaller, H. (1989) Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *J. Virol.*, **63**, 798-808.
- Sällberg, M., Ruden, U., Magnius, L.O., Harthus, H.P., Noah, M. und Wahren, B. (1991) Characterisation of a linear binding site for a monoclonal antibody to hepatitis B core antigen. *J. Med. Virol.*, **33**, 248-252.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.
- Schödel, F., Moriarty, A.M., Peterson, D.L., Zheng, J.A., Hughes, J.L., Will, H., Leturcq, D.J., McGee, J.S. und Milich, D.R. (1992) The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J. Virol.*, **66**, 106-114.
- Schödel, F., Peterson, D. und Milich, D. (1996) Hepatitis B virus core and e antigen: immune recognition and use as a vaccine carrier moiety. *Intervirology*, **39**, 104-110.

- Seeger, C., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, **232**, 477-484.
- Seeger, C. und Mason, W.S. (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 51-68.
- Seifer, M. und Standring, D.N. (1995) Assembly and antigenicity of hepatitis B virus core particles. *Intervirology*, **38**, 47-62.
- Serwer, P., Khan, S.A. und Griess, G.A. (1995) Non-denaturing gel electrophoresis of biological nanoparticles: viruses. *J. Chromatogr. A.*, **698**, 251-261.
- Sprengel, R., Kaleta, E.F. und Will, H. (1988) Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.*, **62**, 3832-3839.
- 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. U S A*, **75**, 4533-4537.
- Summers, J. und Mason, W.S. (1982) Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, **29**, 403-415.
- Tacke, R., Chen, Y. und Manley, J.L. (1997) Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 1148-1153.
- Ulrich, R., Nassal, M., Meisel, H. und Krüger, D.H. (1998) Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv. Virus Res.*, **50**, 141-182.
- Urban, S., Breiner, K.M., Fehler, F., Klingmüller, U. und Schaller, H. (1998) Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180. *J. Virol.*, **72**, 8089-8097.
- Uy, A., Bruss, V., Gerlich, W.H., Kochel, H.G. und Thomssen, R. (1986) Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein. *Virology*, **155**, 89-96.
- Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C. und Fu, X.D. (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, **140**, 737-750.
- Watts, N.R., Conway, J.F., Cheng, N., Stahl, S.J., Belnap, D.M., Steven, A.C. und Wingfield, P.T. (2002) The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J.*, **21**, 876-884.

- Weber, M., Bronsema, V., Bartos, H., Bosserhoff, A., Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1994) Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J. Virol.*, **68**, 2994-2999.
- Wieslander, L. (1979) A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.*, **98**, 305-309.
- Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Williams, R.W. und Steven, A.C. (1995) Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry*, **34**, 4919-4932.
- Wizemann, H., Weiland, F., Pfaff, E. und von Brunn, A. (2000) Polyhistidine-tagged hepatitis B core particles as carriers of HIV-1/gp120 epitopes of different HIV-1 subtypes. *Biol. Chem.*, **381**, 231-243.
- Wynne, S.A., Crowther, R.A. und Leslie, A.G.W. (1999a) The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell*, **3**, 771-780.
- Wynne, S.A., Leslie, A.G., Butler, P.J. und Crowther, R.A. (1999b) Crystallization of hepatitis B virus core protein shells: determination of cryoprotectant conditions and preliminary X-ray characterization. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **55**, 557-560.
- Yeh, C.T., Liaw, Y.F. und Ou, J.H. (1990) The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.*, **64**, 6141-6147.
- Yeh, C.T., Chu, C.M. und Liaw, Y.F. (1995) A single serine mutation on the nuclear localization signal of hepatitis B virus core protein abolishes the inhibition of nuclear transport by surface proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213**, 1068-1074.
- Yu, M. und Summers, J. (1994a) Multiple functions of capsid protein phosphorylation in duck hepatitis B virus replication. *J. Virol.*, **68**, 4341-4348.
- Yu, M. und Summers, J. (1994b) Phosphorylation of the duck hepatitis B virus capsid protein associated with conformational changes in the C terminus. *J. Virol.*, **68**, 2965-2969.
- Yue, B.-G., Ajuh, P., Akusjarvi, G., Lamond, A.I. und Kreivi, J.-P. (2000) Functional coexpression of serine protein kinase SRPK1 and its substrate ASF/SF2 in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*, **28**, e14.

- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C. und Tsien, R.Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, **296**, 913-916.
- Zahler, A.M., Lane, W.S., Stolk, J.A. und Roth, M.B. (1992) SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.*, **6**, 837-847.
- Zhou, S. und Standring, D.N. (1992) Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**, 10046-10050.
- Zlotnick, A., Cheng, N., Conway, J.F., Booy, F.P., Steven, A.C., Stahl, S.J. und Wingfield, P.T. (1996) Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry*, **35**, 7412-7421.
- Zlotnick, A., Cheng, N., Stahl, S.J., Conway, J.F., Steven, A.C. und Wingfield, P.T. (1997) Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 9556-9561.
- Zlotnick, A., Palmer, I., Kaufman, J.D., Stahl, S.J., Steven, A.C. und Wingfield, P.T. (1999) Separation and crystallization of T = 3 and T = 4 icosahedral complexes of the hepatitis B virus core protein. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **55**, 717-720.
- 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.
- Zoulim, F. und Seeger, C. (1994) Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J. Virol.*, **68**, 6-13.

Lebenslauf

Name: Maren Vogel

Geburtsdatum: 24. Juli 1969

Geburtsort: Konstanz

1979 - 1988 Gymnasium in Villingen-Schwenningen

1989 - 1991 Ausbildung zur staatlich geprüften Biologisch-technischen Assistentin am Naturwissenschaftlichen Technikum in Landau/ Pfalz

1991 - 1993 Position als Biologisch-technische Assistentin an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen

1993 - 1998 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart
Hauptfächer: Molekularbiologie und Technische Biochemie
Nebenfächer: Biophysik und Bioverfahrenstechnik

1998 - 1999 Diplomarbeit an der John Curtin School of Medical Research in Canberra (Australien)
Thema: "Functional analysis of the Ubiquitin-like domain (Sub) of the Ubiquitin-specific protease Ubp6p"

Oktober 1999 Diplom an der Universität Stuttgart

1999 - 2000 Position als Wissenschaftliche Angestellte
Klinik für Tumorbologie am Institut für Molekulare Onkologie in Freiburg

seit August 2000 Promotion am Universitätsklinikum Freiburg,
Abteilung Innere Medizin II/ Molekularbiologie bei Prof. Dr. Michael Nassal
Thema: "Rekombinante Hepatitis B Virus Kapside: Untersuchungen zur Eignung als ikosahedrale Träger für Strukturuntersuchungen, zur *in vitro* Assemblierung und Nukleinsäureverpackung"