

Aus dem Institut für Molekularbiologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. P. Müller

**Proteolytische Abspaltung des Assemblierungssignals 2A von  
Hepatitis A-Prokapsiden  
durch die virale Proteinase 3C und die Wirtsproteinase Faktor Xa**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von

Andrea Rachow

1. Berichtstatterin:

2. Berichtstatter/-in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1 Die Hepatitis A–Infektion: Historie, Physiologie, Immunität .....	1
2 Das Hepatitis A Virus: Klassifikation und Besonderheiten.....	3
3 Das HAV-Polyprotein und seine Prozessierung.....	4
4 Die HAV-Strukturproteine: Charakterisierung und Funktion.....	6
5 Die besondere Rolle von HAV-2A.....	6
6 Die HAV-Partikelbildung.....	7
<b>II Ziel der Doktorarbeit</b> .....	<b>9</b>
<b>III Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
1 Geräte .....	10
2 Materialien.....	10
2.1 Chemikalien.....	10
2.2 Standards und Kits.....	10
2.3 Escherichia coli-Stamm .....	10
2.4 Vakziniavirus-Stamm .....	11
2.6 Zelllinie.....	12
3 Bakterien und Plasmide .....	13
3.1 Herstellung kompetenter E.coli Zellen (nach Inoue et al., 1990).....	13
3.2 Transformation von E.coli .....	13
3.3 Plasmid-Präparationstechniken aus E.coli .....	13
3.4 Restriktionsverdau von Plasmiden.....	14
3.5 DNA-Agarosegelelektrophorese .....	14
4 Herstellung T7-promovierter Expressionskonstrukte .....	15
4.1 Ortsspezifische Mutagenese.....	15
4.2 DNA-Sequenzierung.....	17
4.3 Primerkonstruktion und -synthese.....	17
5 Eukaryotische Zellkultur .....	19
5.1 Transfektion/Lipofektion .....	19
5.2 Das Vakzinia-T7-Expressionssystem.....	19
5.3 Herstellung eines hochtitrigen Vakzinia-Stocks .....	20
5.4 Vakzinia-T7 Wirktitertbestimmung (nach Sambrook et al., 1989).....	20
5.5 Die Transinfektion .....	21
5.6 Zellernte und Zellaufschluss .....	22
6 Proteinchemische Methoden.....	22
6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
6.2 Westernblot.....	23
6.3 Hepatitis A-Antigen-ELISA (HAAg-EIA) .....	26
6.4 Proteinaseverdau .....	27
6.4.1 Optimierung des in vitro-Verdau mit den Proteinase FXa und Thrombin.....	28
6.4.2 Proteinase und HAAg-EIA.....	30
7 Sedimentationskonstantenbestimmung durch Saccharosegradienten-Zentrifugation .....	31

<b>IV Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
1A: Prozessierung im HAV-Strukturprotein VP1-2A durch die virale Proteinase 3C .....	32
1B: Beeinflussung der Partikelbildung durch die Aminosäuresequenz an Position [273]/[274] in VP1-2A .....	37
2A: 3C-vermittelte Prozessierung von P1-2A mit modifizierter Spaltstelle zwischen VP1 und 2A .....	38
2B: Partikelbildung von P1-2A mit modifizierter Spaltstelle zwischen VP1 und 2A .....	41
3A: FXa- und Thrombin-vermittelte Abspaltung von 2A.....	41
3B: Einfluss der FXa- oder Thrombin-vermittelten 2A-Abspaltung auf die Antigenität rekombinanter HAV-Partikel.....	42
4: FXa- bzw. Thrombin-Spaltung von Wildtyp-VP1-2A in HAV-Prokapsiden.....	43
5: FXa-Spaltung in P1-2A in Abhängigkeit von der Konformation der Strukturproteine .....	46
6A: Identifizierung der nativen FXa-Spaltstelle in VP1-2A.....	49
6B: Partikelbildung der Konstrukte pET11a-HM-P1-2A(E-S)-R[278]M und pET11a-HM-P1(E-S)-[278] .....	53
7: Charakterisierung VP1-2A- und VP1-haltiger HAV-Prokapside durch die Saccharosegradientenzentrifugation .....	54
8: VP1-2A-Multimere.....	58
<b>V Diskussion</b> .....	<b>61</b>
1 Prozessierung von VP1-2A - Virale Proteinase oder Wirtspoteinase? .....	61
2 Die Bedeutung der leberspezifischen Replikation für das Hepatitis A Virus unter Berücksichtigung der Beteiligung einer Wirtszellproteinase.....	65
3 Homogene rekombinante HAV-Partikel vor und nach 2A-Abspaltung .....	68
4 HAV-Partikelscreening mit Hilfe des FXa-Verdau .....	70
5 Die Rolle von 2A im HAV-Replikationszyklus .....	70
5.1 Lage und Flexibilität von 2A im HAV-Prokapsid .....	70
5.2 Funktion von 2A bei der HAV-Kapsidsynthese .....	72
5.3 Weitere Funktionen von HAV-2A innerhalb des HAV-Replikationszyklus .....	73
<b>VI Zusammenfassung</b> .....	<b>75</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Danksagungen</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>XVI</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
3D	dreidimensional
dam	DNA-Adenin-Methylase
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ds	Doppelstrang
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alteri
FKS	Fötales Kälberserum
FX	Faktor X
FXa	Faktor Xa
G	Guanin
HAV	Hepatitis A-Virus
HAAg	Hepatitis A-Antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton ( $10^3$ g/mol)
LB	Luria Bertani

MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
OD	optische Dichte (Extinktion)
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidelectrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-TW	Phosphate buffered saline + 0,05%(v/v) Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIPES	Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonicacid]
PNPG	p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
RIFA	Radioimmunofocus assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
ss	Singelstrang
s.u.	siehe unten
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris buffered saline + 0,05 % (v/v) Triton X100
Th	Thrombin
Tm	Schmelztemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
z.B.	zum Beispiel

# **I Einleitung**

## **1 Die Hepatitis A–Infektion: Historie, Physiologie, Immunität**

Das Hepatitis A Virus (HAV) ist weltweit der häufigste Erreger der Gelbsucht. Besonders in Regionen mit niedrigem hygienischen Standard stellt diese Infektionskrankheit ein gesundheitspolitisches Problem dar. Hier beträgt die Durchseuchungsrate unter 10-jährigen Kindern nahezu 100% (Gust et al., 1979; Barin et al., 1980).

Bereits im Jahr 1912 benutzte Cockayne erstmals den Terminus „infektiöse Hepatitis“, um das epidemische Auftreten von Gelbsucht zu beschreiben (Cockayne, 1912). In dem selben Zeitraum postulierte McDonald, dass die „gelbe Atrophie der Leber“ durch ein Virus in der bereits vorgeschädigten Leber verursacht wird (McDonald, 1908). Darauf folgende epidemiologische Studien und Experimente an Freiwilligen bestätigten die virale Ätiologie der Erkrankung (Voegt, 1942; MacCallum und Bradley, 1944; Havens, 1947; Medical Research Council, 1951; MacCallum et al., 1952). MacCallum führte 1947 die Unterteilung in Hepatitis A und B ein, um die virale Entzündung der Leber nach ihrem Erregerursprung zu kategorisieren (MacCallum, 1947). Diese Bezeichnungen wurden später von der WHO bestätigt (WHO, 1973). Jedoch erst im Jahr 1973 gelang es Feinstone und seinen Mitarbeitern, das Hepatitis A Virus mit Hilfe der Immun-elektronenmikroskopie im Stuhl infizierter Personen zu identifizieren (Feinstone et al., 1973).

Die natürliche Infektion mit HAV erfolgt hauptsächlich über den fäkal-oralen Weg. Die mit der Nahrung aufgenommenen Erreger gelangen über den Darm in die Leber, wo die Vermehrung der Viren stattfindet. Die Faktoren und Mechanismen, welche die ausschließliche Virusreplikation in der Leber unterstützen, sind nicht bekannt. Obwohl sich eine ganze Reihe von Zellen, die nicht der Leber entstammen, mit HAV in der Zellkultur infizieren lassen (Flehmig et al., 1981; Dotzauer et al., 1994; Frings und Dotzauer, 2001), konnte bisher kein extrahepatischer Replikationsort für HAV identifiziert werden. Dotzauer zeigte, dass ein IgA-Carrier System, welches Komplexe aus HAV und spezifischem IgA transportiert, die gezielte Infektion von Hepatozyten mit HAV vermittelt (Dotzauer et al., 2000). Nach Sekretion in die Galle gelangen die reifen Viren in den Stuhl (Schulman et al., 1976), womit sich der infektiöse Kreislauf schließt. Außer in

Hepatozyten und Kupffer-Zellen (Shimizu et al., 1978) ist HAV besonders in der frühen Phase der Infektion auch im Blut nachweisbar (Lemon, 1985).

Die Ausprägung der klinischen Symptomatik einer Hepatitis A-Infektion ist abhängig vom Alter des Wirts. Während es nur bei 5-20% der infizierten Kinder zur Ausbildung typischer Erkrankungsmerkmale kommt, werden ca. 75-90% der infizierten Erwachsenen symptomatisch (Lednar et al., 1985). Die Mortalität korreliert ebenfalls mit dem Alter der Patienten. Obwohl zwei Drittel aller klinisch apparenten HAV-Infektionen bei Kindern auftreten, sind mehr als 70% der verstorbenen Erkrankten über 49 Jahre alt (Hadler, 1991). Eine überstandene Hepatitis A-Infektion hinterlässt eine lebenslange Immunität. Die Tatsache, dass sich durch die globale Verbesserung der hygienischen Standards das Alter bei der Erstinfektion deutlich in das Erwachsenenalter verschiebt, und damit die Zahl der symptomatischen Erkrankungen rapide ansteigt, macht die Notwendigkeit einer Immunisierung gegen HAV deutlich, besonders vor dem Hintergrund einer zur Zeit nicht verfügbaren antiviralen Therapie.

Bis zur Einführung der aktiven Immunisierung durch einen HAV-Totimpfstoff im Jahr 1992 standen lediglich Immunglobuline zur Prävention einer Infektion zur Verfügung. Durch passive Immunisierung gelang es, in Abhängigkeit von der Konzentration der anti-HAV-Immunglobuline den Verlauf der Erkrankung zu modifizieren oder vollständig zu unterdrücken (Hall et al., 1977; Drake und Ming, 1994). Die Möglichkeit der aktiven Immunisierung seit 1992 stellt einen Meilenstein in der Prävention dieser viralen Infektion dar. Die Herstellung des, für den Impfstoff sowie auch für diagnostische Zwecke genutzten, Antigens erfolgt durch die Anzucht des Virus über vier Wochen in der Zellkultur und anschließender Formalininaktivierung. Die Probleme bei der Kultivierung von HAV in der Zellkultur gestalten diesen Prozess sehr arbeits- und kostenintensiv. Derzeit wird an der Entwicklung eines attenuierten Lebendimpfstoffes gearbeitet, der, einmal oral verabreicht, über Aktivierung der T-Zell-Abwehr eine lebenslange Immunität induzieren soll. Eine weitere Alternative stellt die wesentlich effizientere und kostengünstigere Produktion leerer HAV-Partikel im rekombinanten System dar, welche in gleichem Umfang eine schützende Immunantwort induzieren (Stapleton et al., 1991; Winokur et al., 1991; Rosen et al., 1993; Zhu et al., 1994). Der Vorteil rekombinanter Partikel als Impfstoff liegt in ihrer fehlenden Infektiosität und in der Möglichkeit, für ihre Gewinnung ein Produktionssystem zu nutzen, welches unabhängig von der Säugerzellkultur ist. Die Wahrscheinlichkeit, zusammen mit dem Virus unwissentlich andere unbekannte infektiöse Erreger zu kultivieren, ist hierbei stark reduziert.



## 2 Das Hepatitis A Virus: Klassifikation und Besonderheiten

HAV ist das einzige Mitglied der Gattung *Hepatovirus* innerhalb der Familie der Picornaviren. Es besitzt ein nicht behülltes ikosaedersymmetrisches Nukleokapsid mit einem Durchmesser zwischen 27 und 32 nm, welches morphologisch nicht von dem anderer Picornaviren unterscheidbar ist. Das virale Genom besteht aus einer 7,5 kb großen Einzelstrang-RNA mit Plusstrang-Polarität. Es kodiert für ein einziges Polyprotein, aus welchem posttranslational durch die virale Proteinase 3C die Strukturproteine und Nicht-Strukturproteine freigespalten werden (Abb. I-1). Zu Beginn der 80er Jahre wurde HAV wegen seiner biophysikalischen Eigenschaften zunächst der Gattung der Enteroviren zugeordnet, welche neben den Aphtho-, Rhino-, Cardio- und Parechoviren ebenfalls zu der Familie der Picornaviren gehört. Spätere Studien zeigten, dass sich HAV durch charakteristische Eigenschaften sowohl von den Enteroviren als auch den übrigen Picornaviren unterscheidet. Aufgrund dieser Besonderheiten resultierte die Einordnung in eine neue Gattung, namentlich die der Hepatoviren, deren einziger Vertreter HAV bis heute darstellt (Francki et al., 1991):

1. Ein Enterovirus-spezifisches Antiserum reagiert nicht mit HAV (Yousef et al., 1987).
2. Die HAV-Nukleotid- und Aminosäuresequenz weicht von der anderer Gattungen ab (Cohen et al., 1987).
3. HAV besitzt eine außergewöhnliche Säurestabilität (Scholz et al., 1989).
4. Das Virus ist resistent gegenüber Temperaturen und chemischen Agenzien, durch die andere Picornaviren inaktiviert werden (Siegl et al., 1984).
5. Von HAV sind nur ein Serotyp und eine antigene Domäne bekannt (Lemon und Binn, 1983; Zahn et al., 1984; Lemon et al., 1987).
6. HAV ist schlecht an die Zellkultur adaptierbar und wächst sehr langsam, ohne einen zytopathischen Effekt zu induzieren.

Für das schlechte Wachstum in der Zellkultur werden u.a. die unvollständige Reifungsspaltung mit dem damit verbundenen ineffizienten „uncoating“ (Bishop und Anderson, 1993; 2000), die asynchrone Replikation (Cho und Ehrenfeld, 1991) und die mangelnde Beeinträchtigung des Wirtszellmetabolismus (Glass und Summers, 1993) verantwortlich gemacht. Im Vergleich zum Poliovirus, welches 500 bis 5000 Partikel pro infizierte Zelle bildet, produziert HAV nur etwa 20 Partikel (Anderson und Locarni, 1987).

Es ist nicht bekannt, ob auch im infizierten Individuum ein verzögertes und insuffizientes virales Wachstum stattfindet, oder ob dieses Phänomen auf einen Mangel an bestimmten Faktoren in der Zellkultur zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die ineffiziente Replikation sowie die Abwesenheit eines zytopathogenen Effekts für das Virus den Vorteil beinhalten, dass die Funktion des Zielorgans, der Leber, nicht oder nur minimal beeinträchtigt wird, denn die vollständige virale Replikation ist auf eine intakte Gallesekretion angewiesen, um das Virus im Sinne eines fäkal-oralen Übertragungsmodus über den Stuhl wieder auszuscheiden (Lemon et al., 1992).

Sowohl das langsame Wachstum in der Zellkultur als auch die geringe Beeinträchtigung des Wirtszellmetabolismus führen zu Problemen bei der Untersuchung des HAV-spezifischen Replikationszyklus in der Zellkultur. Aus diesem Grunde wird die Erforschung dieser molekularen Vorgänge, wie auch in der vorliegenden Studie, anhand rekombinanter Systeme durchgeführt.

### **3 Das HAV-Polyprotein und seine Prozessierung**

Der Aufbau und die Prozessierung des HAV-Polyproteins werden in Abbildung I-1 veranschaulicht, wobei die Darstellung der Spaltungskaskade auf den Daten von Probst und Mitarbeitern beruhen (Probst et al., 1997; 1998).

Wie alle picornaviralen Genome gliedert sich auch das von HAV in die 5' und 3' nicht translatierte Region sowie einen offenen Leserahmen, der für das 250 kD große Polyprotein kodiert. Dieses lässt sich nach Rueckert und Wimmer (1984) in die Regionen P1, P2 und P3 unterteilen. Während P1 die Strukturproteine enthält, beinhalten die P2- und P3-Regionen die Nicht-Strukturproteine, die auch als Funktionsproteine bezeichnet werden. Anhand von in vitro-Studien konnte für HAV gezeigt werden, dass die primäre Spaltung zwischen 2A und 2B, welche die Strukturproteine von den Funktionsproteinen trennt, durch die virale Proteinase 3C katalysiert wird (Jia et al., 1991; 1993; Martin et al., 1995). Als weitere frühe und effiziente Spaltung ist die zwischen 2BC und P3 beschrieben (Probst et al., 1998), die wie alle folgenden Prozessierungsschritte innerhalb der HAV-Proteine ebenfalls durch 3C katalysiert wird (Gauss-Müller et al., 1991; Schultheiss et al., 1994; 1995). Die virale Proteinase 3C ist eine Trypsin-ähnliche, cysteinhaltige Proteinase und zugleich die einzige viruskodierte Proteinase. Dieses Charakteristikum unterscheidet HAV wesentlich von den anderen Picornaviren (Palmenberg, 1990), welche mindestens

zwei unterschiedliche Proteinasen für die Primär- bzw. Sekundärspaltungen besitzen. Die Reifungsspaltung von VP0 zu VP2 und VP4 ist RNA-abhängig und stellt wahrscheinlich einen Proteinase-unabhängigen Prozess dar (Bishop und Anderson, 1993). Die 2A-Abspaltung von seinem Vorläufer VP1-2A, die für HAV einmalig unter den Picornaviren ist, wird kontrovers diskutiert.

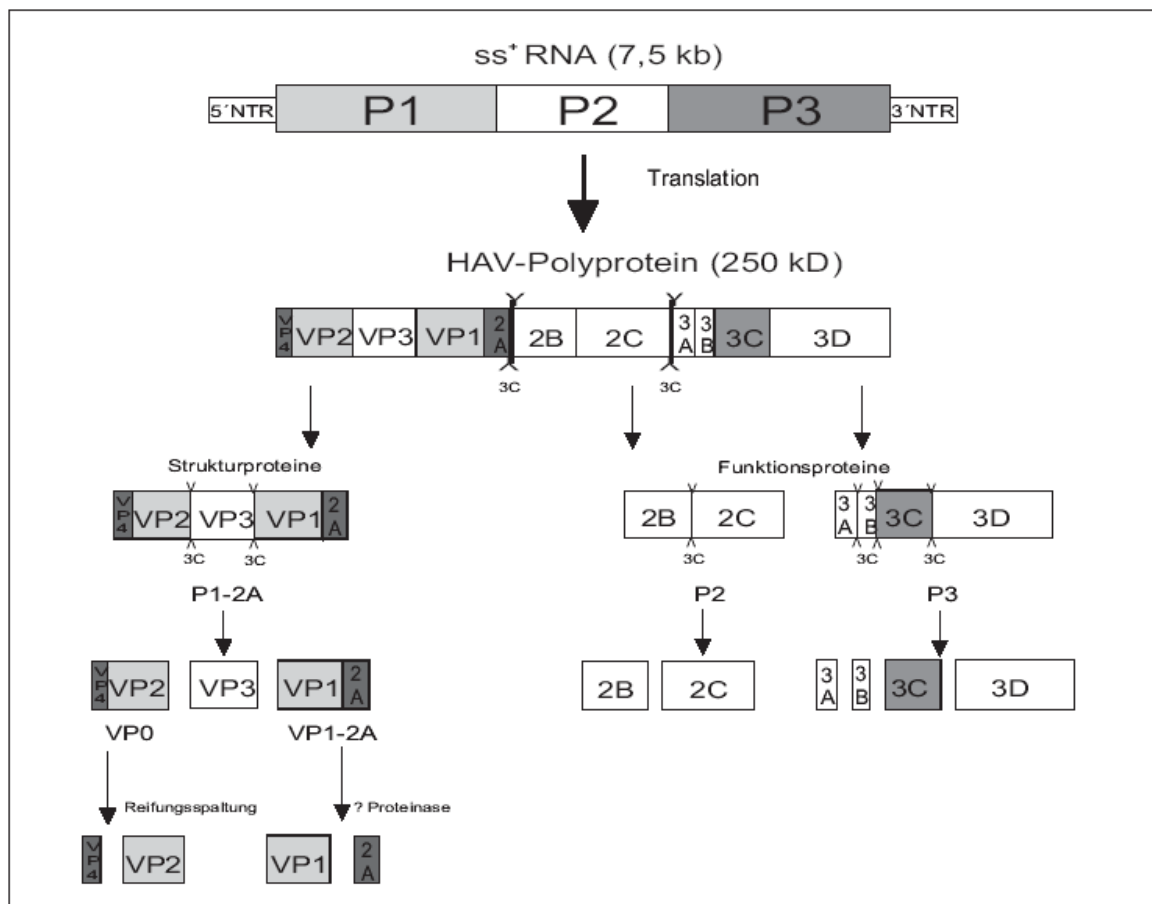


Abbildung I-1: Kaskade der Polyproteinprozessierung von HAV

Schultheiss und Mitarbeiter zeigten, dass die einzige virale Proteinase 3C prinzipiell zwischen VP1 und 2A spalten kann (Schultheiss et al., 1994). Durch vergleichende Spaltungsanalysen mit mutierten HAV-Sequenzen konnten Probst und Mitarbeiter die 3C-vermittelte Spaltung zwischen VP1 und 2A bestätigen (Probst et al., 1997). Aufgrund von Komigrationsstudien und Analysen potentieller 3C-Konsensussequenzen in VP1-2A wurde die Position Glutamin[273]/Serin[274] innerhalb von VP1-2A als potentielle 3C-Spaltstelle vorgeschlagen (Jewell et al., 1992; Dotzauer et al., 1995; Probst et al., 1997). Basierend auf der Bestimmung der C-terminalen Sequenz von reifem VP1, welches aus HAV-infizierten Zellen isoliert wurde (Graff et al., 1999), sowie Spaltungs- und Komigrationsstudien von unterschiedlichen VP1-2A-Molekülen (Martin et al., 1999)

favorisieren andere Arbeitsgruppen die Beteiligung einer Wirtszellproteinase an der Abspaltung von 2A. Neben Serin[274], als häufigsten VP1-C-Terminus, wurden auch Threonin[272] und Glutamin[273] als weitere C-Termini von reifem VP1 nachgewiesen.

#### **4 Die HAV-Strukturproteine: Charakterisierung und Funktion**

Die einzelnen Strukturproteine VP0, VP3 und VP1 (bzw. VP1-2A) sind am Aufbau des HAV-Nukleokapsids beteiligt. Im Rahmen der Reifungsspaltung werden aus VP0 die Teilproteine VP2 und VP4 freigesetzt. Dieser Vorgang geht mit einer konformationellen Veränderung des Viruskapsids einher und bedingt die Infektiösität der Partikel (Bishop und Anderson, 1993). Das Strukturprotein VP4, ein Polypeptid aus ca. 23 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 2,5 kD (Tesar et al., 1992), ist im Gegensatz zu VP4 anderer Picornaviren wesentlich kleiner und nicht myristilliert (Chow et al., 1987; Tesar et al., 1993). Bisher gelang es nicht, dieses Protein im HAV-Partikel nachzuweisen. Mit Hilfe einer Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass VP4 die Zusammenlagerung von 14S-Pentameren zu höheren Kapsidstrukturen vermittelt (Probst et al., 1999).

In umfangreichen Studien am HAV-Kapsid konnten die Strukturproteine VP2 und VP1 hauptsächlich an der Partikeloberfläche identifiziert werden (Hughes et al., 1984; Robertson et al., 1989; Lemon, et al., 1991). Darüber hinaus ist VP1 neben VP3 an der Ausbildung der antigenen Domäne beteiligt, gegen welche neutralisierende Antikörper gerichtet sind (Ping et al., 1988; Ping und Lemon, 1992).

#### **5 Die besondere Rolle von HAV-2A**

Im Gegensatz zu den Entero- (Kräusslich et al., 1987) und Rhinoviren ist für den HAV-Genlocus 2A keine proteolytische Funktion nachweisbar (Jia et al., 1991; Kusov et al., 1992<sub>a</sub>). Vielmehr scheint das 2A-Polypeptid als C-terminale Verlängerung von VP1 eine Domäne des größten Strukturproteins, VP1-2A, innerhalb des HAV-Kapsids zu sein. Von Anderson und Mitarbeitern konnten in der Zellkultur VP1-2A-haltige Pentamere, Prokapside und Pre-Provirionen nachgewiesen werden (Anderson und Ross, 1990; Bishop und Anderson, 1997), während aus dem Stuhl infizierter Individuen ausschließlich VP1-haltige Partikel isoliert wurden. Anhand einer Deletionsmutante zeigten Probst et al. (1999), dass in Abwesenheit von 2A die virale Kapsidassemblierung bereits in ihrem ersten Schritt, der Zusammenlagerung von fünf Molekülen des Vorläuferpolypeptids P1-

2A, unterbunden wird. Eine vorläufige Kartierung von 2A deutet zwei voneinander unabhängige Domänen an (Cohen et al., 2002). Während der N-Terminus von 2A die Assemblierung von HAV-Partikeln vermittelt, führen Mutationen im C-terminalen Anteil zu einer verminderten 2A-Abspaltung von seinem Vorläufer VP1-2A. Außerdem wurde durch Cohen eine verringerte spezifische Infektiosität von HAV-Partikeln postuliert, bei denen die posttranslationale 2A-Abspaltung verhindert war (Cohen et al., 2002). Anscheinend ist nach Abschluss der Kapsidassemblierung neben der Reifungsspaltung von VP0 ein weiterer proteolytischer „Reifungs“-Schritt erforderlich, in welchem das Teilprotein 2A vom HAV-Partikel abgespalten wird. Wie bereits erläutert, werden zur Zeit die Position und die involvierte Proteinase innerhalb dieses Prozesses kontrovers diskutiert.

## 6 Die HAV-Partikelbildung

Das Modell der HAV-Partikelassemblierung ist in Abbildung I-2 dargestellt und basiert im Wesentlichen auf den Daten von Anderson und Ross, 1990; Borovec und Anderson, 1993; Basavappa et al., 1994 sowie von Probst et al., 1999.

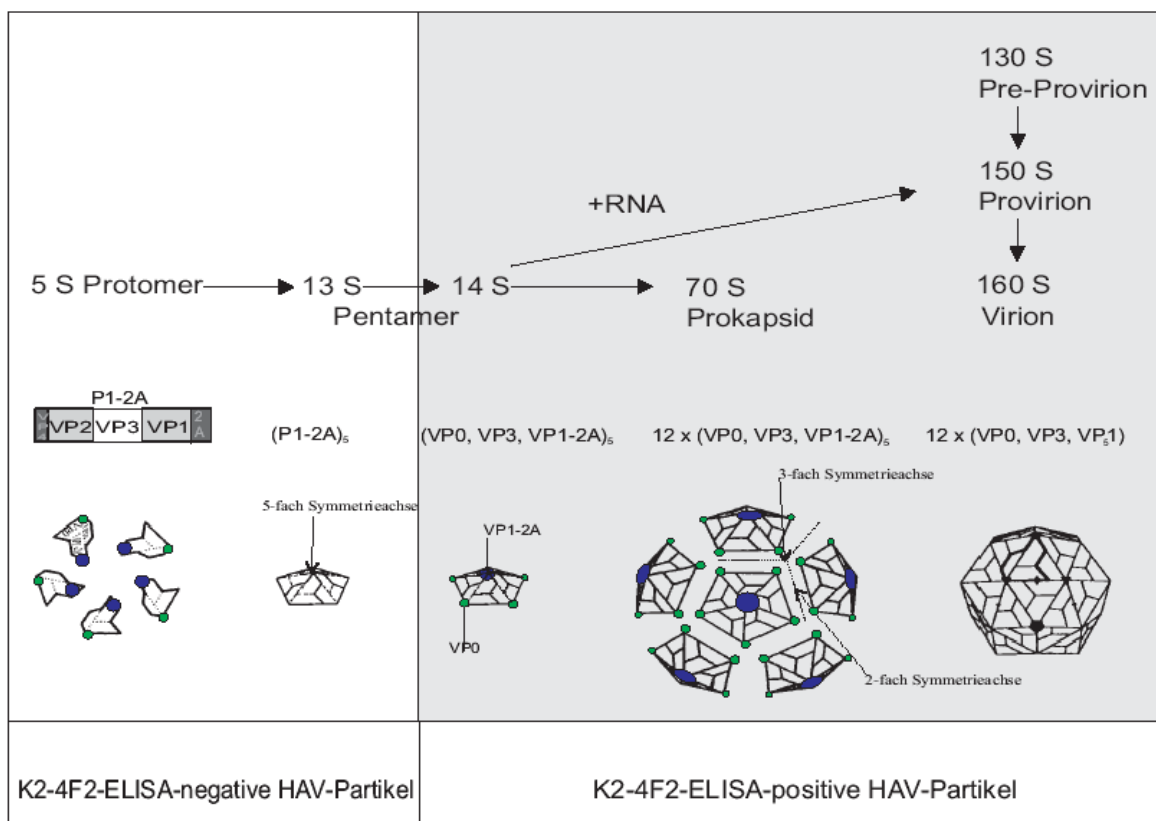


Abbildung I-2: HAV-Assemblierungsmodell

Unmittelbar nach Beginn der Synthese des HAV-Polyproteins beginnt die Partikelbildung mit der Abspaltung von P1-2A, dem Vorläufer der Strukturproteine, vom Rest des Polyproteins durch die virale Proteinase 3C. Wahrscheinlich aufgrund der zunächst geringen 3C-Konzentration erfolgt die Zusammenlagerung ungespaltener P1-2A-Vorläufermoleküle zu 13S Pentameren (Borovec und Anderson, 1993; Probst et al., 1999). Durch anschließende proteolytische Spaltungen innerhalb von P1-2A entstehen 14S Pentamere, die fünf Kopien von VP0, VP3 und VP1-2A sowie das neutralisierende K2-4F2-Epitop enthalten (Ping et al., 1988; Ping und Lemon, 1992). Wie bereits beschrieben, kommt es bei der Deletion von 2A nicht zur Bildung von Pentameren im rekombinanten System (Probst et al., 1999). In Abwesenheit von neusynthetisierter RNA lagern sich zwölf 14S-Pentamere zu leeren HAV-Prokapsiden zusammen, deren Sedimentationsgeschwindigkeit 70S beträgt. Nach Ruchti (Ruchti et al., 1991) und Basavappa (Basavappa et al., 1994) können die stabilen 70S-Prokapside als Pentamerreservoir betrachtet werden. Bei ausreichenden Mengen an RNA kommt es zur Bildung von Pro-Virionen, die mit 150S sedimentieren, sowie von den noch 2A-haltigen 130S-Pre-Provirionen (Anderson und Ross, 1990). Sowohl in den Pre-Provirionen als auch in den Prokapsiden erfolgt die Spaltung von VP1-2A zu VP1 und 2A. Die Reifungsspaltung, ein RNA-abhängiger autokatalytischer Prozess, führt durch Freisetzung von VP2 und VP4 aus VP0 zur Entstehung von reifen 160S-Virionen. Dieser Prozess ist für HAV als besonders ineffizient und langsam beschrieben worden (Bishop und Anderson, 1993). Die mit der Reifungsspaltung einhergehende konformationelle Änderung der Kapsidstruktur bewirkt die Partikelstabilisierung und führt zu einer Steigerung der Infektiösität der Kapside (Bishop und Anderson, 1993; 1997).

Bisher sind von reifen HAV-Partikeln keine Kristallstrukturdaten verfügbar. Ein Grund dafür könnte in der Inhomogenität der zur Zeit zur Verfügung stehenden Partikel liegen: Während in der infizierten Zellkultur die verzögert ablaufende Reifungsspaltung (VP0 → VP2 + VP4) zu Partikeln mit unterschiedlichen Anteilen von VP0 bzw. VP2 und VP4 führt, findet im rekombinanten System eine äußerst ineffiziente Abspaltung von 2A statt, so dass ein Großteil der rekombinanten HAV-Prokapside 2A-haltig ist, während jedoch ein kleiner Rest VP1 enthält. Es ist vorstellbar, dass im rekombinanten System homogene Prokapside produziert werden können, die sich der Kristallstrukturanalyse unterziehen lassen.

## **II Ziel der Doktorarbeit**

Prinzipiell ist die 3C-vermittelte Prozessierung innerhalb des HAV-Polyproteins in ihren Einzelheiten gut bekannt. Lediglich die proteolytische Spaltung zwischen VP1 und 2A wird hinsichtlich der exakten Position der Spaltstelle sowie der verantwortlichen Proteinase strittig dargestellt. Um die VP1-2A-Spaltstelle im Hepatitis A-Nukleokapsid genauer charakterisieren zu können, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch das experimentelle Verfahren der „Ortsspezifischen Mutagenese“ verschiedene HAV-Konstrukte entweder mit veränderten oder zusätzlich eingefügten Aminosäuresequenzen zwischen VP1 und 2A erzeugt und im rekombinanten System exprimiert werden. Neben der Modifikation der von Probst et al. (1997) propagierten 3C-Spaltstelle Glu[273]/Ser[274] im VP1-2A-Wildtyp-Polyprotein durch einzelne Punktmutationen wurden in weiteren Konstrukten die spezifischen Spaltstellensequenzen der Proteinase Faktor Xa oder Thrombin eingefügt. Anhand dieser HAV-Konstrukte könnte u.a. die Lage der VP1-2A-Spaltstelle im HAV-Partikel sowie deren Zugänglichkeit für verschiedene Proteinase untersucht werden. Weiterhin wurde erwartet, im Rahmen der Studie detailliertere Angaben über die Flexibilität der VP1-2A-Region gegenüber Fremdepitopen ableiten zu können. Mit Hilfe der neuen HAV-Mutanten könnte untersucht werden, ob diese die Möglichkeit bieten, die VP1-2A-Spaltung gezielt durch einen in vitro-Proteinase-Verdau zu induzieren und somit erstmals homogene rekombinante VP1-haltige HAV-Kapside zu erzeugen. Der Vergleich zwischen den auf diese Art entstandenen VP1-2A- und VP1-haltigen HAV-Partikeln sollte weiteren Aufschluss über die Funktion von 2A sowie die Bedeutung seiner Abspaltung innerhalb des HAV-Replikationszyklus geben.

## III Material und Methoden

### 1 Geräte

Auf eine Zusammenstellung der verwendeten Geräte wird verzichtet, da an den entsprechenden Stellen die physikalischen Parameter der Bearbeitungsmethode genannt werden. Mit Hilfe dieser Angaben ist es möglich, die Experimente unabhängig von einem speziellen Gerätetyp nachzuvollziehen.

### 2 Materialien

#### 2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, von verschiedenen kommerziellen Anbietern in der Reinheitsstufe p.a. bezogen.

Restriktionsenzyme, nukleinsäuremodifizierende Enzyme und DNA-Polymerasen wurden bei MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England BioLabs (Frankfurt am Main) und Stratagene (Heidelberg) erworben.

#### 2.2 Standards und Kits

- DNA-Molekulargewichtsmarker „1kb DNA Leiter“, Gibco-BRL (Bethesda, USA)
- NuPAGE Electrophoresis System, Invitrogen (Karlsruhe)
- vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker „MultiMark“, Invitrogen (Karlsruhe)
- Plasmidpräparationskits (Mini und Midi), MACHEREY & NAGEL (Düren)
- „Factor Xa Cleavage Capture Kit“, Novagen (Schwalbach)
- „Thrombin Cleavage Capture Kit“, Novagen (Schwalbach)

#### 2.3 Escherichia coli-Stamm

Für die Propagation von Plasmiden wurde der Escherichia coli Stamm XL-2 (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-I hsdR17 sup E44 relA1 Lac[ F' proAB lacZΔM15 TN10 (Tet) Amy Cam2 ]m) verwendet.



## 2.4 Vakziniavirus-Stamm

vTF7-3ATCC VR-2153

## 2.5 Plasmide

### 2.5.1 pET11a-HM-P3

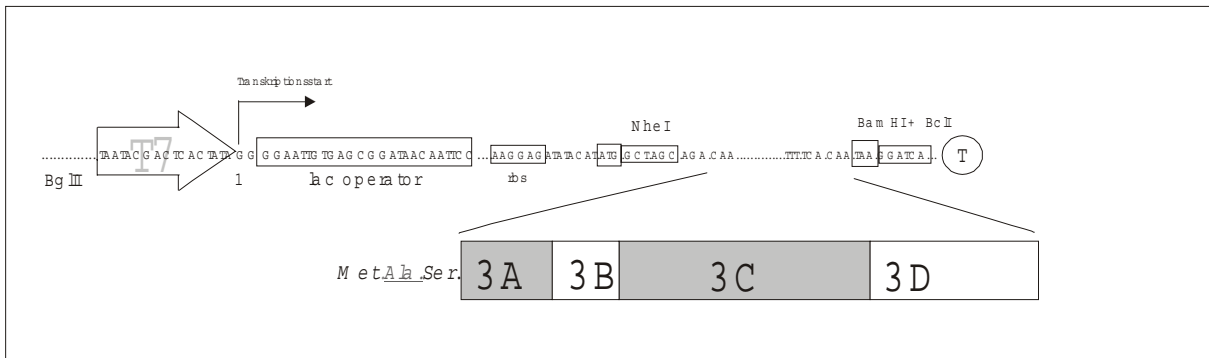


Abbildung III-1a: pET11a-HM-P3

Schematische Darstellung des für HAV-P3 kodierenden Plasmids pET11a-HM-P3 mit relevanten genetischen Elementen (z.B. Promotor (T7), Terminator (T), Restriktionsspalstellen, Proteinsequenz).

### 2.5.2 pET11a-HM-P1-2A(E-S)

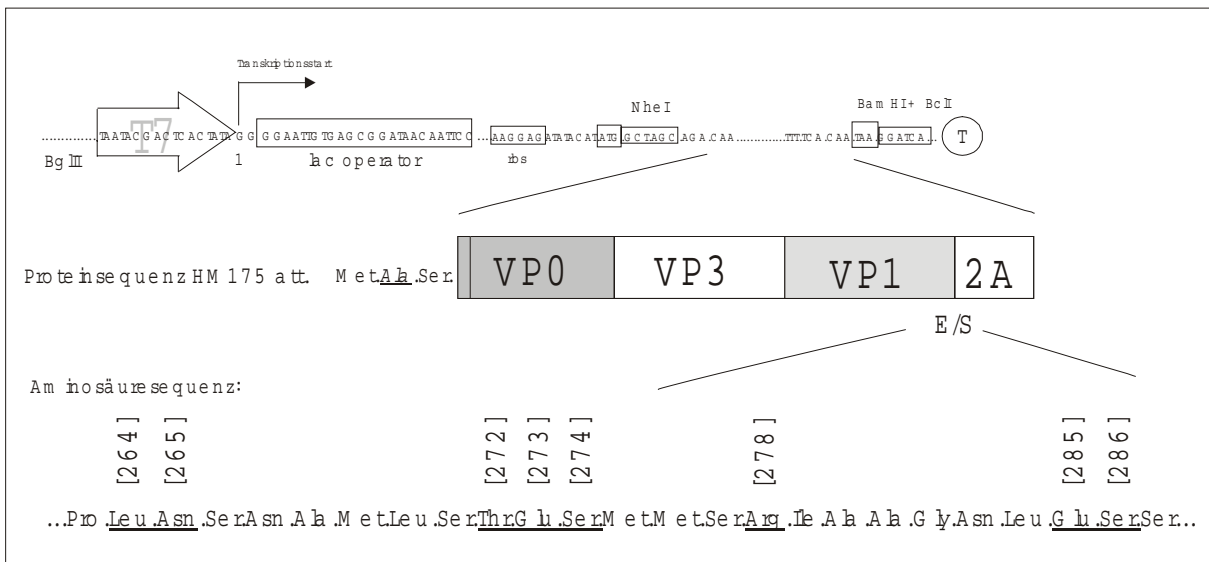


Abbildung III-1b: pET11a-HM-P1-2A(E-S)

Darstellung des für HAV-P1-2A kodierenden Plasmids pET11a-HM-P1-2A(E-S) mit relevanten genetischen Elementen (z.B. Ribosomenbindungstelle (rbs), Promotor (T7), Terminator (T), Restriktionsspalstellen, Aminosäuresequenz). Die durch pET11a-HM-P1-2A(E-S) kodierte Aminosäuresequenz ist identisch mit der von pEXT7-HM/HAS-P1-2A(E-S), dessen Klonierung an anderer Stelle beschrieben wurde (Probst et al., 1997). Das Konstrukt enthält die Nukleotidsequenz des HAV Stammes HAS15 3'-terminal von der NcoI-Schnittstelle (HAV nt 2807). Die restliche Sequenz entspricht dem HAV-Stamm HM175-attenuiert, der an die Zellkultur angepasst ist. Die in eckigen Klammern angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf VP1-2A des HAV-Stammes HM175 attenuiert, beginnend mit der ersten Aminosäure von VP1. Die

Positionen Leu[264]/Asn[265], Glu[273]/Ser[274] und Glu[285]/Ser[286] wurden als potentielle 3C-Spaltstelle genannt (Jewell et al., 1992). Die Aminosäuren Thr[272], Glu[273] und Ser[274] wurden als mögliche C-Termini von reifem VP1 bestimmt (Graff et al., 1999). An der Position Arg[278] befindet sich eine potentielle FXa-Spaltstelle.

### 2.5.3 Von pET11a-HM-P1-2A(E-S) abgeleitete Plasmide

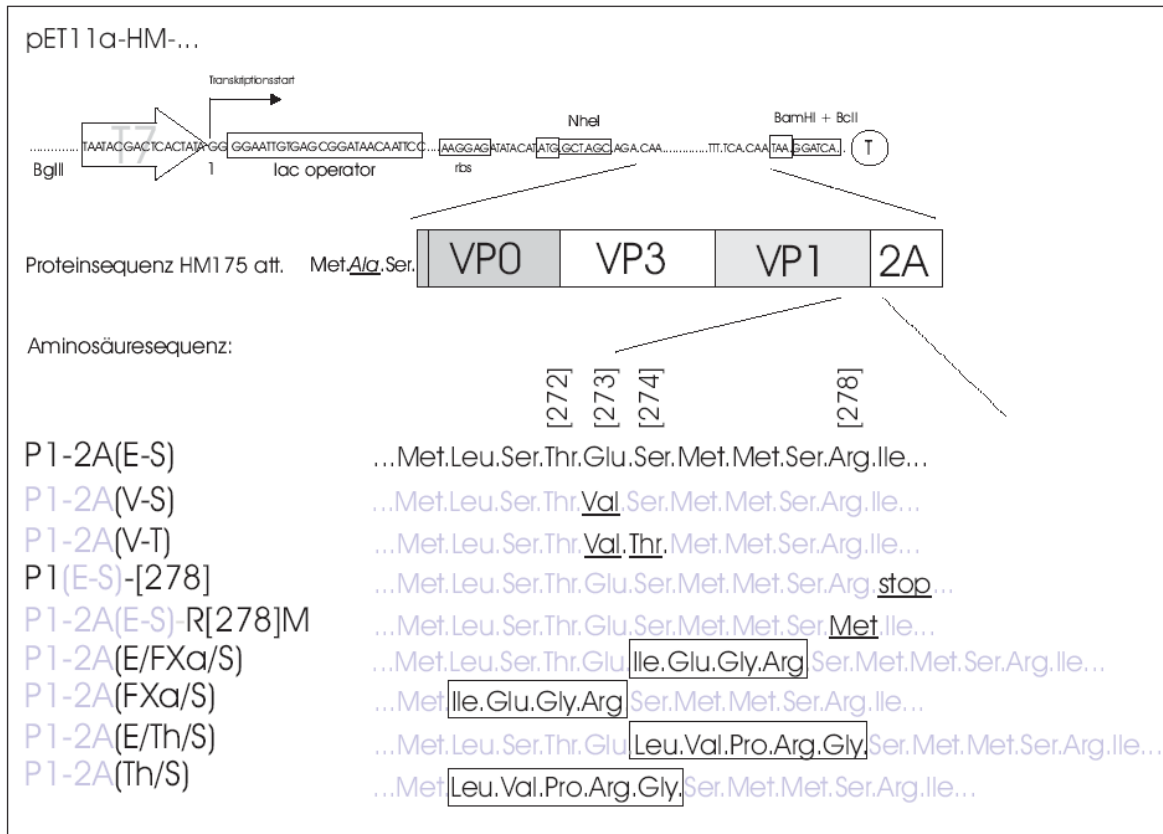


Abbildung III-1c: Von pET11a-HM-P1-2A(E-S) abgeleitete Plasmide

Darstellung der von pET11a-HM-P1-2A(E-S) abgeleiteten mutierten Plasmide. In den Konstrukten pET11a-HM-P1-2A(V-S) und pET11a-HM-P1-2A(V-T) wurde die E[273]/S[274]-Sequenz durch V-S bzw. V-T ersetzt. In pET11a-HM-P1(E-S)-[278] endet die Aminosäuresequenz von VP1-2A an der Position Arg[278]. In pET11a-HM-P1-2A(E-S)-R[278]M wurde Arg[278] durch Methionin ersetzt. Bei den übrigen Konstrukten wurde die Spaltstellenkonsensussequenz von FXa oder Thrombin entweder zusätzlich zwischen Glu[273] und Ser[274] (pET11a-HM-P1-2A(E/FXa/S), pET11a-HM-P1-2A(E/Th/S)) oder anstelle der Positionen vor Ser[274] (pET11a-HM-P1-2A(FXa/S), pET11a-HM-P1-2A(Th/S)) in VP1-2A eingefügt. Die Konstrukte wurden durch das Verfahren der ortsspezifischen Mutagenese hergestellt (s.u.).

## 2.6 Zelllinie

### COS7 ATCC CRL 1651

COS7-Zellen sind klonale Isolate, die von einer transformierten Nierenzelllinie des afrikanischen "green monkey" stammen. COS7-Zellen sind ideal für die Anwendung bei der rekombinanten Proteinherstellung sowie der Anzucht von Viren.

## **3 Bakterien und Plasmide**

### **3.1 Herstellung kompetenter E.coli Zellen (nach Inoue et al., 1990)**

250 ml LB-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit einer Einzelkolonie des entsprechenden E.coli-Stamms angeimpft. Anschließend wurde diese Kultur für etwa zwei Tage bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 18 °C unter Schütteln inkubiert. Darauf erfolgte eine Abkühlung der Kultur für zehn Minuten auf Eis. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 2500 g und 4 °C wurden die Bakterien pelletiert, um nachfolgend in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6,7) resuspendiert zu werden. Diese Suspension wurde nach einer 10-minütigen Inkubation im Eisbad erneut für zehn Minuten bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend vorsichtig in 20 ml eiskaltem Transformationpuffer resuspendiert. Daraufhin wurden zu dieser Suspension tropfenweise insgesamt 1,4 ml DMSO unter Schwenken hinzugefügt. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation im Eisbad wurde die Suspension zu je 1 ml Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten E.coli Zellen erfolgte bei -196 °C.

### **3.2 Transformation von E.coli**

Die zu transformierende DNA wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und auf dem Eisbad inkubiert. 100 µl der kompetenten E.coli-Zellen wurden aufgetaut und zu der DNA gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation im Eisbad erfolgte ein Thermoschock, indem der Ansatz für 45 Sekunden in einem 42 °C-Wasserbad aufbewahrt und anschließend wieder zurück ins Eisbad überführt wurde. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) wurde die Zellsuspension in 5 ml Reaktionsgefäße überführt und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Eine geeignete Menge dieser Kultur wurde daraufhin auf LB-Agarplatten (LB-Medium + 2% Agar) mit 100 µg/ml Ampicillinzusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### **3.3 Plasmid-Präparationstechniken aus E.coli**

Für die Plasmidpräparationen wurde entsprechend des Bedarfs an zu isolierender DNA das Midi-(100 µg) oder das Mini-(15 µg)-Plasmidpräparationskit der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren) verwendet. Die Bakterienanzucht und Plasmidpräparation wurden nach

den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bakterienlyse erfolgte auf der Grundlage einer alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die DNA-Isolation bei der Midi-Präparation wurde mit Hilfe einer Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt und schloss einen Isopropanol-Fällungsschritt ein. Das Prinzip der Mini-Präparation bestand in der Ausnutzung der Silikataffinität von Nukleinsäure unter chaotropen Bedingungen und schloss keine Fällungsreaktion ein. Die mit diesen beiden Methoden aufgereinigte DNA war uneingeschränkt für die im Folgenden dargestellten Arbeiten einsetzbar.

### **3.4 Restriktionsverdau von Plasmiden**

Für die Kontrollrestriktion von Plasmiden wurden diese mit Restriktionsenzymen, welche doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden, behandelt. Die Restriktionsansätze wurden mit Hilfe der entsprechenden 10-fach Puffer für die einzelnen Enzyme nach den Angaben des Herstellers inkubiert.

### **3.5 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Die Agaroseelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Molekülen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist von verschiedenen Faktoren wie dem Molekulargewicht, der Konformation der DNA, der Agarosekonzentration im Gel sowie der elektrischen Feldstärke abhängig. Mit Hilfe des interkalierenden Agens Ethidiumbromid kann die Position der DNA-Fragmente im Agarosegel anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte durch horizontale submerse Elektrophorese im TAE-Puffersystem (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5) bei einer Feldstärke von etwa 10 V/cm. Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid aus einer 10 mg/ml-Stammlösung in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt. Die zu analysierende Probe wurde vor dem Auftragen mit ¼ Volumen 5-fach-Puffer (30 % Glycerol, 50 mM EDTA, pH 8,5, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenecyanol) versetzt.

## 4 Herstellung T7-promovierter Expressionskonstrukte

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Anzucht von Hepatitis A-Viren in der Zellkultur stellt der Einsatz des rekombinanten Überexpressionsystems für die Analyse der HAV-Strukturproteine eine geeignete Alternative dar. Wie unter Punkt 5.2 beschrieben, wurden T7-promovierte Plasmide, die für unterschiedliche HAV-Strukturproteine kodierten (Abb. III-1c), mit Hilfe der, durch das Vakziniavirus bereitgestellten, T7-RNA-Polymerase in COS7-Zellen exprimiert.

### 4.1 Ortsspezifische Mutagenese

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Verfahren der ortsspezifischen Mutagenese basiert auf dem QuickChange-Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Heidelberg). Diese Methode wurde genutzt, um in das P1-2A-HAV-Strukturprotein Spaltstellen für entsprechende Proteinasen einzubauen und um ausgewählte Aminosäuresequenzen zu modifizieren. Als Matrize für die Mutation diente das Plasmid pET11a-HM-P1-2A(E-S). Das zueinander komplementäre Primerpaar trug in der zentralen Position die gewünschte Mutation (Beschreibung unter Punkt 4.3). Da bei allen verwendeten Primern die Schmelzpunkte zwischen 77 °C und 79 °C lagen, war es möglich, ein standardisiertes, nach Malcolm modifiziertes (Wang und Malcolm, 1999) PCR-Protokoll durchzuführen. Zunächst wurde die dsDNA-Matrize (Template-DNA) durch Hitzebehandlung (95 °C) denaturiert (Denaturierung), wodurch zwei Einzelstränge entstanden. Aufgrund ihrer Komplementarität lagerten sich in einem zweiten Schritt bei niedriger Temperatur (55 °C) (Annealing) die beiden Primer, welche die erwünschte Mutation enthielten, dem entsprechenden Einzelstrang an. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur und damit von der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotid-Primer. Je GC-reicher diese sind, desto höher liegt die Hybridisierungstemperatur. Es gilt folgende Näherung:  $T_m (°C) = (2 \times [A+T] + 4 \times [C+G])$ , wobei A, T, C und G die Anzahl der jeweiligen Basen darstellen. Während des dritten Schrittes (Elongation) synthetisierte die hitzestabile Pfu-DNA-Polymerase den zum parentalen Einzelstrang-Plasmid komplementären Strang, welcher die erwünschte Mutation enthielt. Die Polymerasereaktionszeit wurde entsprechend der Näherung 1 kb/Minute berechnet. Das Wiederholen der drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation führte zur exponentiellen Zunahme des erwünschten Plasmids mit Strangbrüchen. Um die parentale, nicht mutierte DNA zu entfernen, wurde der PCR-Ansatz nach Ablauf der Reaktion mit

der Restriktionsendonuklease DpnI (Zielsequenz: 5'-Ga<sup>m6</sup>TC-3') restringiert. Fast alle E.coli-Stämme (auch der für diese Arbeit verwendete (2.3)) enthalten das Enzym Dam-Methylase, welches die Adeninbasen der DNA methyliert. Nach Verdau der methylierten Matrizen-DNA durch DpnI, verblieb nur die gewünschte, mutierte DNA im Reaktionsgefäß. Diese wurde in E.coli-Zellen transformiert, wo die Strangbrüche des mutierten Plasmids repariert wurden.

Standard- PCR-Ansatz nach Malcolm (50 µl):

Der Unterschied des PCR-Protokolls nach Malcolm zu den Standard-PCR-Protokollen liegt darin, dass „sense“- und „anti“-sense Primer zunächst voneinander getrennt mit der Template-DNA inkubiert werden und die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation durchlaufen. Erst nach Ablauf einiger Zyklen werden die beiden verschiedenen Ansätze zusammengeführt (s.u.). Mit dieser Methode wird verhindert, dass aufgrund von Wechselwirkungen von größeren Primern untereinander kein optimales Annealing stattfindet.

- 37,5 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl 10x Pfu-Turbo-Puffer (Stratagene, Heidelberg)
- 2,5 µl sense-Primer (5 µM) oder 2,5 µl antisense-Primer (5 µM)
- 1 µl dNTP's (10 mM pro Nukleotid), (Stratagene, Heidelberg)
- 3 µl Template-DNA (10 ng/µl)  
→ 1 Tropfen Mineralöl auf den PCR-Ansatz geben, 5 Minuten 95 °C
- 1 µl Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg)

PCR-Protokoll nach Malcolm:

30 Sekunden 95 °C (Denaturierung)

1 Minute 55 °C (Annealing)

10 Minuten (Plasmidgröße in kb x 1 Minute) 68 °C (Elongation)

insgesamt 4 Zyklen

Danach wurden 25 µl PCR-Ansatz mit dem sense-Primer und 25 µl PCR-Ansatz mit dem antisense-Primer gemischt.

Anschließend wurden die Produkte durch eine PCR nach Standardprotokoll amplifiziert.

Standard-PCR-Protokoll:

- 1 Minute 95 °C
- 1 Minute 55 °C
- 10 Minuten (Plasmidgröße in kb x 1 Minute) 68 °C

insgesamt 25 Zyklen

#### 4.2 DNA-Sequenzierung

Um die gewünschte Mutation zu bestätigen, wurde die DNA-Sequenz des für die Reklonierung verwendeten Genomfragmentes von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bestimmt.

#### 4.3 Primerkonstruktion und -synthese

Als Basis für die Synthese der Primer diente die HAV-Sequenz des Stammes HAS-15, da die Nukleotidsequenz in der zu mutierenden VP1-2A-Region des pET11a-HM-P1-2A-Konstrukts der von HAS-15 entspricht (siehe 2.5.2). Die eingefügten oder substituierten Aminosäure-Triplettcodes entsprachen den im HAV-Genom häufig genutzten Varianten. Die Überprüfung der Primersequenzen erfolgte in „oligo.exe“ durch Hybridisierung an die Sequenz von HAS-15. Der Plasmidaufbau und die entsprechende Aminosäuresequenz von pET11a-HM-**P1-2A(E-S)**, dem Ausgangsplasmid, sowie die Aminosäuresequenzen der mutierten Konstrukte sind unter Punkt 2.5.3 beschrieben. In der folgenden Tabelle werden die Primersequenzen zur Herstellung der jeweiligen Konstrukte dargestellt. Die dick gedruckten und unterstrichenen Nukleotidsequenzen entsprechen den Änderungen innerhalb der Primersequenz gegenüber der Ausgangssequenz von pET11a-HM-**P1-2A(E-S)**.

Das Konstrukt pET11a-HM-**P1-2A(V-S)** wurde von Christian Probst zur Verfügung gestellt. Die Primer wurden bei MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

<b>pET11a-HM-P1-2A (V-T)</b>	
Sense-Primer	5'-GCT ATG TTG TCC ACT <u>GTT ACT</u> ATG ATG AGT AGA ATT GC-3'
Antisense-Primer	5'-GC AAT TCT ACT CAT CAT <u>AGT AAC</u> AGT GGA CAA CAT AGC-3'
<b>pET11a-HM-P1-2A (FXa/S)</b>	
Sense-Primer	5'-CCA TTA AAT TCA AAT GCT ATG <u>ATT GAA GGA AGA</u> TCC ATG ATG AGT AGA ATT GCA GC-3'
Antisense-Primer	5'-GC TGC AAT TCT ACT CAT CAT GGA <u>TCT TCC TTC AAT</u> CAT AGC ATT TGA ATT TAA TGG-3'
<b>pET11a-HM-P1-2A (E/FXa/S)</b>	
Sense-Primer	5'-GCT ATG TTG TCC ACT GAG <u>ATT GAA GGA AGA</u> TCC ATG ATG AGT AGA ATT GCA GC-3'
Antisense-Primer	5'-GC TGC AAT TCT ACT CAT CAT GGA <u>TCT TCC TTC AAT</u> CTC AGT GGA CAA CAT AGC-3'
<b>pET11a-HM-P1-2A (Th/S)</b>	
Sense-Primer	5'-CCA TTA AAT TCA AAT GCT <u>TTG GTT CCT AGA GGA</u> TCC ATG ATG AGT AGA ATT GCA GC-3'
Antisense-Primer	5'-GC TGC AAT TCT ACT CAT CAT GGA <u>TCC TCT AGG AAC CAA</u> AGC ATT TGA ATT TAA TGG-3'
<b>pET11a-HM-P1-2A (E/Th/S)</b>	
Sense-Primer	5'-GCT ATG TTG TCC ACT GAG <u>TTG GTT CCT AGA GGA</u> TCC ATG ATG AGT AGA ATT GCA GC-3'
Antisense-Primer	5'-GC TGC AAT TCT ACT CAT CAT GGA <u>TCC TCT AGG AAC CAA</u> CTC AGT GGA CAA CAT AGC-3'
<b>pET11a-HM-P1-2A (E-S)-R[278]M</b>	
Sense-Primer	5'-CC ATG ATG AGT <u>ATG</u> ATT <u>GCT</u> GCT GGA GAC TTG G-3'
Antisense-Primer	5'-C CAA GTC TCC AGC <u>AGC</u> AAT <u>CAT</u> ACT CAT CAT GG-3'
<b>pETa-HM-P1(E-S) stop[278]</b>	
Sense-Primer	5'-CC ATG ATG AGT AGA <u>TAA</u> <u>GCT</u> GCT GGA GAC TTG G-3'
Antisense-Primer	5'-C CAA GTC TCC AGC <u>AGC</u> <u>TAA</u> TCT ACT CAT CAT GG-3'

Tabelle III-1: Darstellung der Primersequenzen für die Herstellung der in Abbildung III-1c dargestellten HAV-Mutanten.



## 5 Eukaryotische Zellkultur

Als Standardkulturmedium wurde DMEM (Gibco-BRL, Bethesda, USA, [enthält L-Alanyl-L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, 4500 mg/l Glucose und Pyridoxine]) mit folgenden Zusätzen verwendet (alle Chemikalien in zellkulturgetesteter Qualität):

- 1000 U/l Streptomycin/Penicillin (Biochrom, Berlin)
- 2,5 µg/ml Amphotericin B (Biochrom, Berlin)
- 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FKS)
- pH 7,2

### 5.1 Transfektion/Lipofektion

Für die effiziente Lipofektion von COS7-Zellen wurde LipofectAmine<sup>R</sup> (Gibco-BRL, Bethesda, USA) eingesetzt. Das experimentelle Vorgehen bestand darin, pro 35 mm<sup>2</sup> Zellkulturschale 3 x 10<sup>5</sup> Zellen am Vortag der Transfektion auszusäen. Für die Herstellung des Transfektionsgemisches wurde zunächst 1 µg DNA mit OptiMEMI (Gibco-BRL, Bethesda, USA [enthält L-Alanyl-L-Glutamin]) auf 100 µl Gesamtvolumen eingestellt. Parallel dazu wurden in einem separaten Reaktionsgefäß 9 µl LipofectAmine mit 91 µl OptiMEMI versetzt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit wurden die beiden Lösungen zusammenpipettiert und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 800 µl OptiMEMI wurde das Gesamtvolumen des Transfektionsansatzes auf 1 ml eingestellt. Dieses Transfektionsgemisch wurde auf die subkonfluenten COS7-Zellen gegeben, nachdem diese mit 1 ml OptiMEMI gespült worden waren. Nach drei Stunden wurde das Transfektionsgemisch abgesaugt und die Vakziniavirus-Infektion (s.u.) durchgeführt.

### 5.2 Das Vakzinia-T7-Expressionssystem

Das Grundprinzip des Vakzinia-T7-Expressionssystems besteht darin, zunächst durch Lipofektion T7-promovierte Gene als cDNA in das Zytoplasma einer Wirtszelle einzubringen. Durch anschließende Infektion der Zellen mit dem rekombinanten Vakziniavirus kommt es zu einer hocheffizienten zytoplasmatischen Expression der T7-promovierten Gene. Die für die Transkription notwendige T7-RNA-Polymerase wird vom rekombinanten Vakziniavirus transient bereitgestellt (Fuerst et al., 1986). Bei Verwendung

geeigneter Wirtszellen, wie z.B. COS7-Zellen, scheinen alle posttranslationalen Modifikationen sowie intrazellulären Transportprozesse fehlerfrei abzulaufen.

### 5.3 Herstellung eines hochtitrigen Vakzinia-Stocks

Die Herstellung des hochtitrigen Vakzinia-Stocks erfolgte in COS7-Zellen. Hierzu wurden zehn konfluent bewachsene 175 cm<sup>2</sup>-Zellkultur-Flaschen mit PBS gespült und anschließend für 30 Minuten mit jeweils 1,5 ml eines vTF7-3-Stocks in 20 ml OptiMEMI infiziert. Nach Zugabe von 20 ml DMEM mit 10 % FKS (v/v) zu den Infektionsansätzen wurde für 48 h im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin durch Klopfen (eventuell auch durch leichtes Abschaben) von dem Flaschenboden gelöst und durch 10-minütige Zentrifugation bei 2500 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml OptiMEMI erneut abzentrifugiert. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Gefriertauen (Flüssigstickstoff-Ultraschallbad) des Pellets. Die Zelltrümmer wurden in 10 ml OptiMEMI resuspendiert und zehn Minuten bei 2500 g abzentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde als hochtitriger vTF7-3-Stock bei -20 °C gelagert.

### 5.4 Vakzinia-T7 Wirktitrermessung (nach Sambrook et al., 1989)

Um die optimale Menge eines hochtitrigen Vakzinia-Stocks für die Transinfektion von COS7-Zellen zu bestimmen, wurden  $3 \times 10^5$  COS7-Zellen mit pEXT7-lacZ transfiziert. Der Nachweis der lacZ-Genexpression (und damit der Transinfektionseffizienz) erfolgte anhand einer Enzymaktivitätsbestimmung im Zellextrakt mit Hilfe des löslichen Farbstoffes PNPG. Nach der Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Virussuspension wurden die Zellen mit 110 µl einer festgelegten Verdünnung aus der Verdünnungsreihe infiziert. Nach der Lyse der Zellen in PBS-TW, 24 h nach Infektion, erfolgte der kinetische PNPG-Test. Hierzu wurden die zu analysierenden Zellen in 250 µl Triton-Lysispuffer aufgenommen. Durch eine einminütige Zentrifugation bei etwa 13000 g und Raumtemperatur wurde ein klares Zelllysate gewonnen. 40 µl dieses Extrakts wurden nun in die entsprechenden Nüpfel einer Mikrotiterplatte überführt. Durch die Zugabe von 120 µl Reaktionspuffer wurde das Gesamtvolumen auf 160 µl aufgefüllt. Die Mikrotiterplatte wurde nun auf der Messplattform eines Photometers befestigt, um sofort nach Zugabe von jeweils 40 µl Färbelösung mit der Extinktionsmessung bei einer OD von 405 nm beginnen zu können. In geeigneten Zeitintervallen wurde die Zunahme der Extinktion der bei Zimmertemperatur

ablaufenden Reaktion bis zum Erreichen eines Wertes von etwa 1,5 gemessen. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde als Anstieg der Regressionsgraden in der Einheit  $\Delta OD_{405 \text{ nm}}$ /Minute bestimmt. Um die unspezifische  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu bestimmen, wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der nicht-transfizierte Zellen analog aufbereitet und analysiert wurden. Die Differenz zwischen der Negativkontrolle und den Testansätzen ergab die spezifische  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Die geringste Virusmenge innerhalb der geometrischen Reihe, bei welcher die maximale spezifische  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität erreicht wurde, wurde bei der Transinfektion (s.u.) eingesetzt.

<b>Verwendete Puffer und Materialien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Triton-Lysispuffer:	25 mM Tris-Phosphat pH 7,8 1 mM DTT 1 mM EDTA 15% (v/v) Glycerol 1% (v/v) Triton X-100
Reaktionspuffer:	33 mM Phosphatpuffer pH 7 1,3 mM $MgCl_2$ 133 mM 2-Mercaptoethanol
Färbepuffer:	6 mg/ml PNPG in Reaktionspuffer

**Tabelle III-2: Zusammensetzung der verwendete Puffer und Materialien für die Vakzinia-T7 Wirktitertbestimmung**

## 5.5 Die Transinfektion

Die Methode der Transinfektion setzt sich aus einer Transfektion mit anschließender Infektion zusammen. Die Transfektion mittels LipofectAmine<sup>R</sup> wurde bereits unter dem Punkt Transfektion/Lipofektion (5.1) dargestellt. An die dreistündige Transfektion schloss sich eine 30-minütige Infektion mit der optimalen vT7-Vakziniavirus-Stock-Menge an. Nach Absaugen der Transfektionslösung wurden die Zellen ( $3 \times 10^5$  pro  $35 \text{ mm}^2$  Zellkulturschale) mit 1 ml OptiMEMI gespült und anschließend mit 15  $\mu\text{l}$  der optimalen vTF7-Menge in 1 ml OptiMEMI überschichtet und 30 min inkubiert. Danach wurde die Infektionslösung abgesaugt und durch DMEM-10 % (v/v) FKS ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 18 h im Zellkulturschrank bebrütet.

## 5.6 Zellernte und Zellaufschluss

Für die Analyse der synthetisierten HAV-Proteine wurden die Zellen 18 h nach Infektion mit einem Schaber von der Unterlage gelöst und in PBS-TW (PBS + 0,05 % Tween20) lysiert. Durch Auf- und Abziehen des Zelllysates in einer 0,6 mm-Kanüle (Braun, Melsungen) sollte der Zellaufschluss durch die erhöhten Scherkräfte optimiert werden. Die auf solche Weise entstandene Lösung wird in dieser Arbeit als Totalextrakt bezeichnet. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 13500 g und Raumtemperatur wurde der Überstand (bzw. lösliche Zellextrakt) gewonnen, in dem sich die PBS-TW-löslichen Proteine und Viruspartikel befanden.

## 6 Proteinchemische Methoden

### 6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes werden mit Hilfe der PAGE geladene Moleküle (Proteine) getrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hängt von der Feldstärke und der elektrophoretischen Beweglichkeit ab. Mit Hilfe des Detergenz SDS (Natrium-Dodecylsulfat) werden Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen zerstört und diesen entsprechend ihrer Peptidkettenlänge eine äquivalente Ladung angelagert. Diese negative Ladung ermöglicht die Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel entsprechend ihrer molekularen Masse. Die SDS-PAGE wurde in dieser Arbeit zur Identifikation und Molekularmassenbestimmung von HAV-Proteinen verwendet.

Für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuche wurden ausschließlich 10 % Bis-Tricine-gepufferte NuPAGE-Gele von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Trenngele hatten folgende Dimensionen: Geldicke von 1 mm und Gelgröße von 10 cm x 10 cm. Die Probenaschen hatten eine Breite von circa 3 mm und ein Fassungsvermögen von höchstens 15 µl. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen mit ¼ Volumen NuPAGE-Probenpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 115 mA (pro Gel) über einen Zeitraum von etwa einer Stunde bei Raumtemperatur. Weiterhin wurden folgende Materialien verwendet:

- MultiMark-Proteinmarker (Novex, Frankfurt am Main)
- MOPS-SDS-Laufpuffer (Novex, Frankfurt am Main)

## 6.2 Westernblot

Für den immunologischen Nachweis wurden die Proteine nach ihrer Auftrennung im Polyacryamidgel (10 % BT-NuPAGE-Gel) zunächst bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  auf fließverstärkte Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  (Optitran BA-S83, Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert (Kyhse-Anderson, 1984). Der hierfür verwendete Blotpuffer stammte ebenfalls von Novex (Novex Blotpuffer, Novex, Frankfurt am Main). Die Qualität des Transfers wurde anschließend durch eine Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran überprüft. Hierzu wurde die Membran zehn Minuten unter leichtem Schütteln in Ponceau-S-Färbelösung (0,05 % Ponceau in 3 % Trichloressigsäure) inkubiert und anschließend mit 10 %-Essigsäure der unspezifische Hintergrund entfärbt. Nach fotografischer Dokumentation des gefärbten Blots wurde zum vollständigen Entfärben die Membran in Blotpuffer inkubiert und anschließend in TBS-T äquilibriert. Die Absättigung unspezifischer Bindungskapazitäten der Nitrozellulosemembran erfolgte durch eine 2-stündige Inkubation in TBS-T mit 5 % (w/w) Magermilchpulver unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde die Membran drei mal in TBS-T gewaschen. Nun konnte die Membran in Streifen geschnitten, getrocknet oder direkt für den immunologischen Nachweis eingesetzt werden.

Die zu analysierende Membran wurde in geeigneter Form mit dem entsprechenden Primärinterum (Tabelle III-4) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Antiserum abgesaugt und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur erneuten Verwendung (bis zu zehn mal) gelagert. Die Membran wurde nun drei mal 20 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend für circa zwei Stunden mit Schwein-anti-Kaninchen-alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:5000, DAKO, Dänemark) in Sekundärinterperverdünnungspuffer (Tabelle III-3) inkubiert. Durch drei mal 5-minütiges und drei mal 20-minütiges Waschen der Membran mit TBS-T wurde ungebundenes Konjugat entfernt.

Die Detektion des gebundenen Konjugates erfolgte durch Färbung mit einer NBT-BCIP-Färbelösung. Hierzu wurde die Membran zunächst fünf Minuten im alkalische-Phosphatase-Puffer äquilibriert und anschließend mit etwa  $0,5 \text{ ml/cm}^2$  Färbelösung überschichtet. Die Farbreaktion erfolgte bei Raumtemperatur, unter Lichtabschluss und ungeschüttelt. Nach 10-minütigem Waschen der Membran in TBS-T, Spülen in deionisiertem Wasser und anschließendem Trocknen zwischen Filterpapier wurde die Membran zur Dokumentation aufbereitet.

<b>Verwendete Puffer und Materialien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10 x TBS-T:	87,6 g NaCl 12,1 g Tris-base 5 ml Tween 20 ad 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 8
Primärantikörperverdünnungspuffer:	TBS-T + 0,3 % (v/w) Ovalbumin + 0,02 % (v/w) NaN <sub>3</sub>
Sekundärantikörperverdünnungspuffer:	TBS-T + 0,3 % (v/w) Ovalbumin
Alkalische-Phosphatase-Puffer:	100 mM Tris pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
125 x NBT-BCIP-Konzentrat:	225 Vol. NBT 75 mg/ml in 70 % (v/v) DMF + 175 Vol. BCIP 50 mg/ml in 100 % (v/v) DMF
NBT-BCIP-Färbelösung:	0,8 ml Konzentrat + 100 ml alkalische Phosphatase-Puffer

**Tabelle III-3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Materialien für die Durchführung des Westernblots**

Antiserum	Optimale Verdünnung für den Westernblot	Beschreibung des Antiserums
anti-VP0 HPLC 14.11.85	1:4000	Gerichtet gegen HPLC aufgereinigtes VP0 aus HAV-Partikeln, sehr sensitiv und spezifisch, aus dem Kaninchen.  Quelle: Gauss-Müller et al. (1986)
anti-VP1 HPLC 14.11.85	1:3000	Gerichtet gegen HPLC aufgereinigtes VP0 aus HAV-Partikeln, sehr sensitiv und spezifisch, aus dem Kaninchen.  Quelle: Gauss-Müller et al. (1986)
anti-2A-His SA 1579 13.04.95	1:2000	Gerichtet gegen rekombinantes His-2A ( <i>E. coli</i> ) in den HM175 att. VP1-2A-Aminosäuregrenzen 255-346 (S-Q). Starke BSA-Kreuzreaktivität, gute Sensitivität, aus dem Kaninchen.  Quelle: Gauss-Müller (unpubliziert)
anti-3C SA 277 30.09.93	1:4000	Gerichtet gegen rekombinantes 3C (aufgereinigt aus <i>E. coli</i> ) sehr hohe Sensitivität und Spezifität, aus dem Kaninchen.  Quelle: Schultheiß et al. (1995)

Tabelle III-4: Beschreibung der im Westernblot eingesetzten Primärantisera

### 6.3 Hepatitis A-Antigen-ELISA (HAAg-EIA)

Mit Hilfe eines neutralisierenden monoklonalen Antikörpers ist es möglich, Antigene zu detektieren, welche die Potenz besitzen, neutralisierende Antikörper zu generieren. Im Falle des neutralisierenden monoklonalen K2-4F2-Antiserums (MacGregor et al., 1983) wird ein konformationales HAV-Epitop detektiert, welches auf RNA-haltigen Virionen, Prokapsiden und 14S-Pentameren vorkommt und im Rahmen dieser Arbeit als Hepatitis A-Antigen (HAAg) bezeichnet wird. Das ungespaltene Vorläuferpolyprotein P1-2A trägt das neutralisierende Epitop nicht. Der verwendete EIA basiert auf einem Prototyp-EIA der Firma Hoffmann La Roche (Kaiseraugst). Das Detektionssystem besteht aus K2-4F2-beschichteten Maxisorb-Platten (Nunc, Wiesbaden), einem K2-4F2-Peroxidasekonjugat in Spezialverdünnungspuffer (Hoffmann La Roche, Kaiseraugst) sowie einer stabilisierten TMB-Färbelösung (Sigma, Deisenhofen). Die auf HAAg zu untersuchenden Zellen wurden zunächst in PBS-TW (PBS + 0,05 % Tween20) lysiert, wobei ein optimaler Zellaufschluss durch mehrmaliges Aufziehen des Lysates mit einer 0,6 mm Kanüle (Braun, Melsungen) erreicht wurde, und anschließend fünf Minuten bei 13500 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Jeweils 100 µl des klaren Überstands wurden in einer geeigneten PBS-TW-Verdünnung in die Näpfe einer beschichteten Maxisorb-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Primärinkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde der Zellextrakt abgesaugt, die Näpfe drei mal mit je 200 µl PBS-TW gewaschen und mit 100 µl K2-4F2-Konjugat gefüllt. Die Sekundärinkubation erfolgte wiederum über eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen der entsprechenden Näpfe mit jeweils 200 µl PBS-TW wurde die Detektionsreaktion durch Zugabe von je 100 µl TMB-Färbelösung gestartet. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C unter Schütteln wurde die Farbreaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Extinktion bei 450 nm bestimmt.

Alle in dieser Arbeit dargestellten HAAg-EIA-Daten wurden durch Doppeltransinfektion und jeweils Dreifachbestimmung, also 6-Meßwerten (n = 6) im EIA ermittelt.



Von diesen Messungen wurde der Mittelwert berechnet:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^6 X_i}{n}$$

$x_i$  = Stichprobe

Anschließend wurde die Standardabweichung  $\sigma$  mit Hilfe der Varianz ( $= \sigma^2$ ) festgelegt:

$$\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^6 (X_i - \bar{X})^2$$

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2}$$

Aus der Standardabweichung  $\sigma$  und dem Mittelwert  $\bar{X}$  der Extinktionen pro Ansatz wurde das Konfidenzintervall ( $\mu$ ) für 5 %-Irrtumswahrscheinlichkeit (KI) nach der Formel:

$$\bar{X} - z_{\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{X} + z_{\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

berechnet (1,96 = Kalibrierungsfaktor  $z_{\alpha/2}$  bei angenommener t-Verteilung).

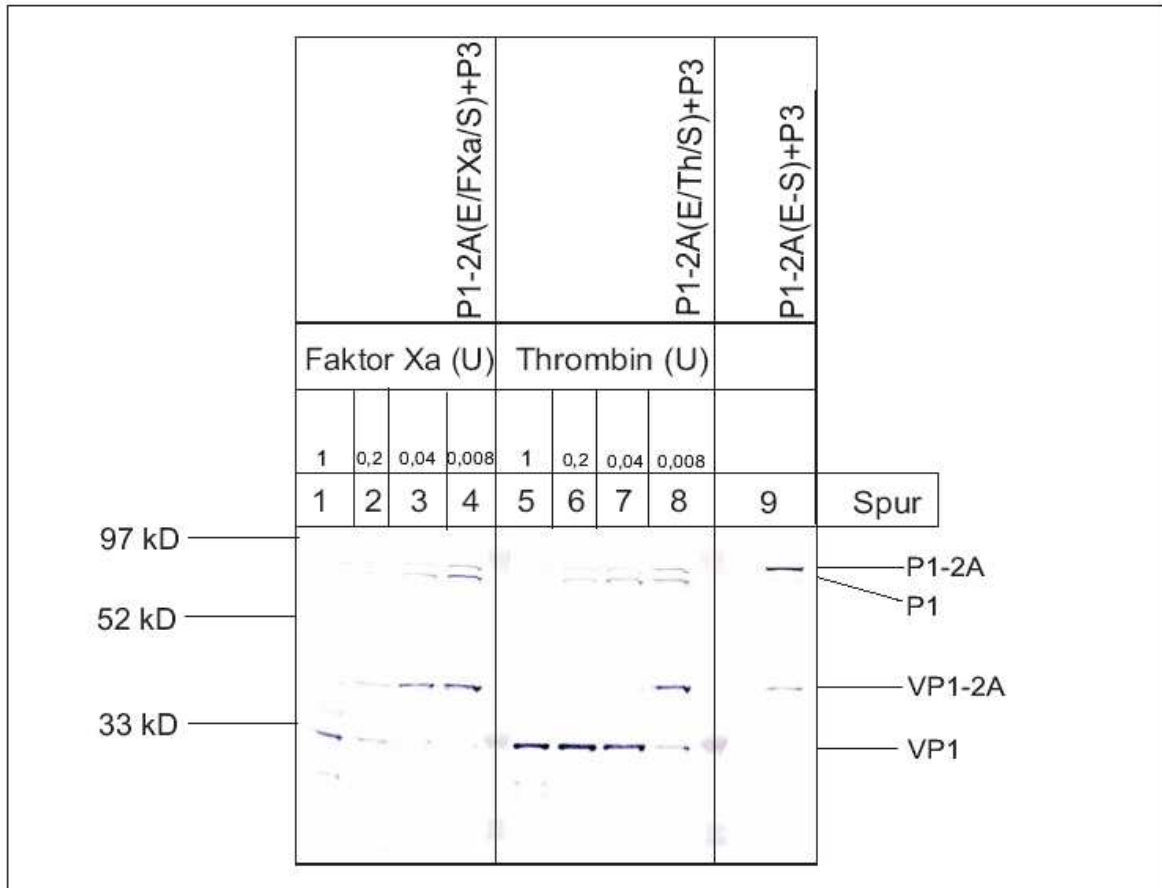
Das Konfidenzintervall wurde in den entsprechenden Grafiken als Linie eingezeichnet. Das spezifische HA-Ag-Signal wurde aus der Differenz der Mittelwerte der Extinktion des zu testenden Extrakts und der entsprechenden Negativkontrolle ermittelt. Diese Ergebnisse wurden in mindestens zwei weiteren Transinfektionsansätzen reproduziert.

#### 6.4 Proteinaseverdau

Die in der Zellkultur synthetisierten und in PBS-Tween lysierten HAV-Strukturproteine bzw. -Partikel wurden in vitro gemäß den Angaben des Herstellers Novagen (Schwalbach) mit den Proteinase FXa bzw. Thrombin inkubiert. Hierzu wurde in einem Vorversuch die optimale Proteinase menge für einen vollständigen proteolytischen Verdau bei 20°C und 16 h Dauer bestimmt. Des weiteren wurde im Rahmen von Vorversuchen sichergestellt, dass die Proteinase keinen Einfluss auf den HA-Ag-EIA haben, indem sie das durch K2-4F2 erkannte Epitop modifizieren, HA-Ag kreuzreaktiv sind oder Komponenten des EIA abbauen.

#### 6.4.1 Optimierung des in vitro-Verdau mit den Proteinase FXa und Thrombin

Die HAV-Konstrukte, welche die Spaltstellen-Konsensussequenzen für die Proteinase FXa bzw. Thrombin in VP1-2A enthielten, sollten nach rekombinanter Expression durch Zugabe der entsprechenden Proteinase in vitro verdaut werden. Um mögliche Interferenzen der Proteinase mit EIA-Komponenten so gering wie möglich zu gestalten, wurde in einem Vorversuch die minimal einzusetzende proteolytische Aktivität, die für eine vollständige Spaltung der rekombinant exprimierten Substrate notwendig ist, bestimmt. Der PBS-TW-lösliche Zellextrakt von P1-2A(**E/FXa/S**) +P3- sowie P1-2A(**E/Th/S**) +P3-exprimierenden Zellen wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Proteinase bei 20°C für 16h inkubiert. Die Spaltung von VP1-2A durch FXa war auf allen vier Verdünnungsstufen partiell (Abb. III-2, Spur 1-4). Dabei waren bei der Zugabe von einem Unit FXa zu einem Reaktionsvolumen von 20 µl nur noch geringe Spuren des Vorläufers VP1-2A nachweisbar (Abb. III-2, Spur 1). Die optimale proteolytische Aktivität für die FXa-Spaltung wurde mit 50 mU/µl unter den oben genannten Bedingungen bestimmt. Der in vitro-Verdau von P1-2A(**E/Th/S**) mit Thrombin war vollständig bis zu einer Verdünnung von 0,008 Units (Abb. III-2, Spur 5-8). Daher wurden im Fall des Thrombin-Verdau immer 2 mU/µl zum Zellysat gegeben.



**Abbildung III-2: Bestimmung der optimalen Proteinasekonzentration für den FXa-/Thrombin-in vitro-Verdau**

Ein definiertes Volumen (20 µl) des PBS-TW-löslichen Lysates von P1-2A(E/FXa/S) +P3- bzw. P1-2A(E/Th/S) +P3-exprimierenden Zellen wurde mit unterschiedlichen Einheiten (1, 0,2, 0,04 und 0,008 Units) der entsprechenden Proteinase für 16 h bei 20°C inkubiert. Die Spaltprodukte wurden im anti-VP1-Westernblot dargestellt. Die anti-VP1-reaktiven Proteine des P1-2A(E-S) +P3-Lysats (Spur 9) dienten als Komigrationsstandard. Die Bezeichnung der jeweiligen Strukturproteine befindet sich auf der linken Seite des Westernblots, der Molekularmassen-Standard auf der rechten Seite.

### 6.4.2 Proteinasen und HAAG-EIA

In den meisten hier beschriebenen Versuchen verblieben die Proteinase FXa und Thrombin in der Reaktionslösung. Daher war es notwendig zu klären, ob FXa und Thrombin sowie der entsprechende Reaktionspuffer den HAAG-EIA beeinflussen.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Proteinase die Komponenten des EIA durch unspezifischen Verdau inhibieren. Der EIA-positive Extrakt von P1-2A(E-S) +P3-exprimierenden Zellen wurde entweder allein oder zusammen mit FXa bzw. Thrombin auf der Mikrotiterplatte mit dem Primärantikörper (K2-4F2) inkubiert und anschließend ein K2-4F2-EIA gemäß Standardprotokoll durchgeführt. Abbildung III-3, Spur 1-3, zeigt, dass es nach getrennter Zugabe der Proteinase zur Positivkontrolle (Spur 1) zu keiner Erniedrigung des EIA-Signals kam.

In einem weiteren Ansatz sollte dargestellt werden, ob die Proteinase FXa oder Thrombin mit den Komponenten des EIA kreuzreagieren. Zu diesem Zweck wurde die Antigenität des EIA-negativen Kontrolllysates P1-2A(E-S) nach Inkubation mit FXa oder Thrombin bestimmt. In den Spuren 4-6 (Abb. III-3) wird gezeigt, dass die Anwesenheit der Proteinase FXa und Thrombin im K2-4F2-EIA zu keiner Erhöhung der spezifischen EIA-Sensitivität führt.

Somit war erwiesen, dass die Proteinase in der einzusetzenden Konzentration nicht in Wechselwirkung mit den HAAG-EIA treten.

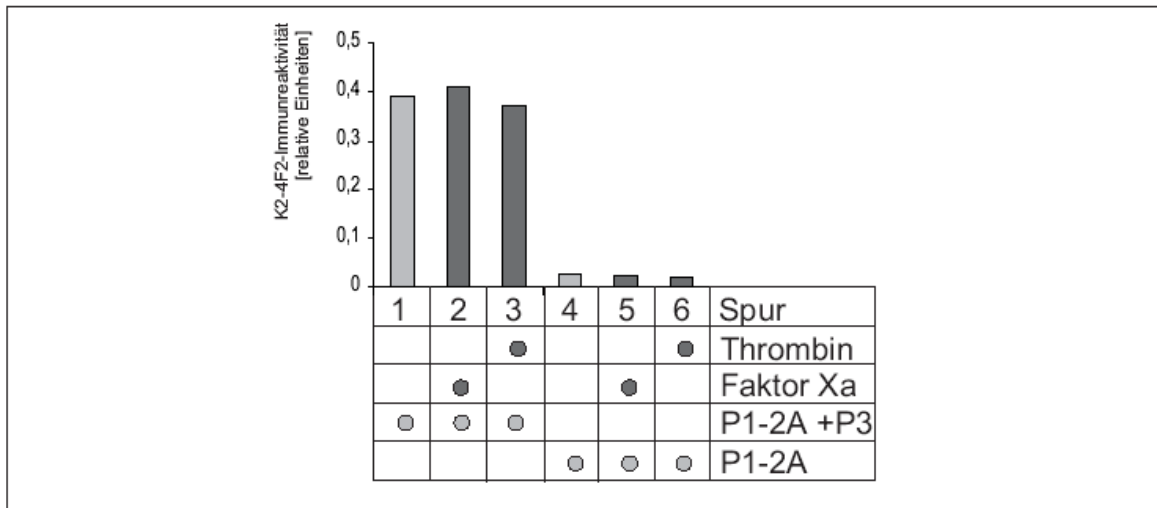


Abbildung III-3: Darstellung der Interaktionen zwischen EIA-Komponenten und den Proteinase FXa und Thrombin

## 7 Sedimentationskonstantenbestimmung durch Saccharosegradienten-Zentrifugation

Das experimentelle Vorgehen einer "rate zonal"-Zentrifugation besteht darin, die Lösung mit den zu analysierenden Partikeln auf einen vorgeformten Gradienten zu schichten. Durch die während der Zentrifugation wirkende Fliehkraft beginnen die Partikel in separaten Zonen durch den Gradienten zu wandern. Jede dieser Zonen setzt sich aus Partikeln zusammen, die durch eine gemeinsame Sedimentationskonstante charakterisiert sind. Um eine "rate zonal"-Zentrifugation zu erreichen, ist es notwendig, die Zentrifugationsparameter so zu wählen, dass keines der zu analysierenden Teilchen die Zone seiner Schwebbedichte oder den Boden des Gradienten erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein kontinuierlicher 5-30 % (w/w) Saccharosegradient in 10 mM Tris pH 7,3 verwendet, der mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt wurde. In die Mischkammer wurden 2,6 ml 5 % (w/w) Saccharoselösung, in die Vorratskammer 2,6 ml 30 % (w/w) Saccharoselösung sowie ein Magnetührstab gegeben. Mit Hilfe einer Glaskapillare wurde der Gradient vom Boden aufsteigend in ein 5 ml Polyallomerröhrchen (Beckmann) für den Rotor SW41 geschichtet. Nachdem die Kapillare entfernt worden war, wurden 500 µl des zu analysierenden PBS-TW-Zellextrakts, in dem sich die HAV-Partikel bzw. löslichen Proteine befanden, vorsichtig auf den Gradienten geschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen am vorgekühlten SW41-Rotor befestigt und die Zentrifugation gestartet. Die genutzten Laufparameter lauteten:

▪ Temperatur: 4°C	▪ Laufzeit: 3 Stunden	▪ Drehzahl: 35'000 rpm	▪ Rotor: SW41	▪ Zentrifuge: Beckmann
----------------------	--------------------------	---------------------------	------------------	---------------------------

Nach der Zentrifugation wurde der Gradient durch Anstechen des Polyallomerröhrchens von unten in 12 x 1 ml Fraktionen abgenommen. 50 µl dieser Fraktionen wurden anschließend mit 50 µl PBS-TW verdünnt im HA-Ag-EIA analysiert. Mit Hilfe eines Universal-Zuckerrefraktometers (Schmidt und Haensch) wurde die Saccharosekonzentration jeder einzelnen Fraktion bestimmt. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten erfolgte auf der Grundlage der Publikationen von Anderson und Locarni (1990) sowie Probst et al. (1999). Demnach ergab sich für die gewählten Zentrifugations- und Gradientenparameter folgende Beziehung zwischen der Saccharosekonzentration in % (w/w) und der Sedimentationskonstanten: 14S-Pentamere: 8 % (w/w) und 70S-Procapside: 17,5 % (w/w).

## **IV Ergebnisse**

### **1A: Prozessierung im HAV-Strukturprotein VP1-2A durch die virale Proteinase 3C**

HAV-2A wird als C-terminale Domäne von VP1-2A zu den Strukturproteinen gezählt. In dieser Funktion vermittelt es die Bildung von HAV-Pentameren (Probst et al., 1999). Im Gegensatz zu den Assemblierungs-Intermediaten enthalten reife HAV-Kapside kein 2A. Bis heute wird die proteolytische Abspaltung von 2A von VP1-2A kontrovers diskutiert. Sowohl die für die Spaltung verantwortliche Proteinase (Schultheiss et al., 1994; Probst et al., 1997; Martin et al., 1999; Graff et al., 1999) als auch die genaue Spaltposition (Dotzauer et al., 1995; Probst et al., 1997, Graff et al., 1999) werden strittig dargestellt.

Um die Spaltungsaktivität von 3C innerhalb des Strukturvorläuferproteins P1-2A und vor allem innerhalb von VP1-2A genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene P1-2A-Mutanten in der An- und Abwesenheit der Proteinase 3C, für welche pET11a-HM-P3 kodiert, exprimiert. Das Konstrukt pET11a-HM-P1-2A(E-S) trägt die Aminosäuresequenz des HAV-Stammes HAS15 an der potentiellen Spaltstelle in VP1-2A, während das Konstrukt pET11a-HM-P1-2A(V-S) für die Aminosäuresequenz des HAV-Stammes HM175 (attenuiert) an den Positionen [273] und [274] kodiert (siehe Abb. III-1b, 1c). Die Sequenz Glutamin[273]/Serin[274] innerhalb von VP1-2A(E-S) kann als optimale 3C-Spaltstelle betrachtet werden (Jewell et al., 1992). Probst bestätigte diese Annahme, indem mit Hilfe eines rekombinanten Systems gezeigt wurde, dass 3C das Peptid VP1 sowohl aus VP1-2A(E-S) als auch aus VP1-2A(V-S) freispaltet. VP1-2A(E-S) zeichnete sich jedoch als das geeignetere Substrat für die virale Proteinase aus, da 3C hieraus wesentlich größere Mengen an VP1 freisetzte als aus VP1-2A(V-S) (Probst et al., 1997). Um weitere Aussagen über die Spaltungsspezifität von 3C treffen zu können, wurde in dieser Arbeit auch das von pET11a-HM-P1-2A(V-T) kodierte VP1-2A(V-T)-Polyprotein (Abb. III-1c) auf seine Spaltbarkeit getestet. Ausgehend von der 3C-Konsensussequenz sollte VP1-2A mit den Aminosäuren Valin und Threonin an den Positionen [273] bzw. [274] ein schlechtes Substrat für 3C darstellen. Threonin[274] wurde ausgewählt, da es ähnliche biochemische Eigenschaften besitzt wie Serin, und somit trotz einer bedeutenden sterischen Änderung durch den Austausch der Aminosäuren nur eine minimale biochemische Abweichung innerhalb der neuen Sequenz bewirkt wurde. Alle übrigen von Cohen et al. (1987) bzw. Dotzauer et al. (1995) vorgeschlagenen potentiellen 3C-

Spaltstellen (Leu[264]/Asn[265] und Glu[285]/Ser[286]; siehe Abb.III-1b) waren in dieser Mutante unverändert.

Da die langsame und asynchrone Replikation von HAV in der infizierten Zellkultur keine detaillierte Analyse der viralen Genexpression, Polyproteinspaltung und Partikelbildung erlaubt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein rekombinantes Expressionssystem genutzt. Nach der transienten Proteinexpression in COS7-Zellen mit Hilfe des Vaxinia-T7-Systems wurden die löslichen und unlöslichen Produkte im zellulären Extrakt mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und durch einen Westernblot analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen der Gesamtheit der exprimierten HAV-Proteine, welche im PBS-TW-Totalextrakt nachweisbar waren, und den partikulierten HAV-Proteinen, die PBS-TW-löslich waren und sich im Überstand befanden, unterschieden. Darüber hinaus enthielt der Überstand (lösliche Zellextrakt) geringe Mengen von Strukturproteinen und deren Spaltprodukte, die nicht Bestandteil von HAV-Partikeln waren. Der Überstand wurde durch Zentrifugation des Totalextrakts erhalten (siehe Material und Methoden).

Zunächst wurden P1-2A(E-S), P1-2A(V-S) und P1-2A(V-T) in der Abwesenheit von 3C exprimiert. Der Totalextrakt wurde anschließend im anti-VP1-Westernblot analysiert. Die Spezifität des anti-VP1-Serums wurde anhand von Spur 7 in Abbildung IV-1 kontrolliert. Im Lysat ausschließlich P3-exprimierender Zellen konnten keine anti-VP1-reaktiven Proteine detektiert werden. In der Abwesenheit von 3C erfolgte keine Spaltung innerhalb des P1-2A-Polyproteins. Erwartungsgemäß war nur das ungespaltene P1-2A nachweisbar, welches somit kein direktes Substrat einer zellulären Proteinase zu sein scheint (Abb. IV-1, Spur 1-3).

In der Anwesenheit von 3C wurde der Strukturproteinvorläufer P1-2A spezifisch proteolytisch gespalten (Abb. IV-1, Spur 4-6). Neben den VP1-reaktiven Proteinen P1-2A, P1, VP1-2A und VP1 waren im Totalextrakt die VP0-reaktiven Proteine VP0 und VP0-VP3 nachweisbar. (Auf die Präsentation von anti-VP0-Westernblots wird in der vorliegenden Arbeit verzichtet [mit Ausnahme von Abbildung IV-7], um Wiederholungen von Sachverhalten zu vermeiden und die Aufmerksamkeit des Lesers auf die VP1-2A-Spaltung zu konzentrieren.) Außerdem war ein zelluläres Protein von ca. 60 kD nachweisbar, welches unspezifisch mit dem anti-VP1-Antikörper reagierte. Diese Daten zeigen, dass in der Anwesenheit von 3C neben den Spaltstellen VP0/VP3 und VP3/VP1 auch im Vorläufermolekül VP1-2A gespalten und das Strukturprotein VP1 freigesetzt wird (Spur 4-6). Im Hinblick auf den Einsatz der Proteinase FXa und Thrombin in

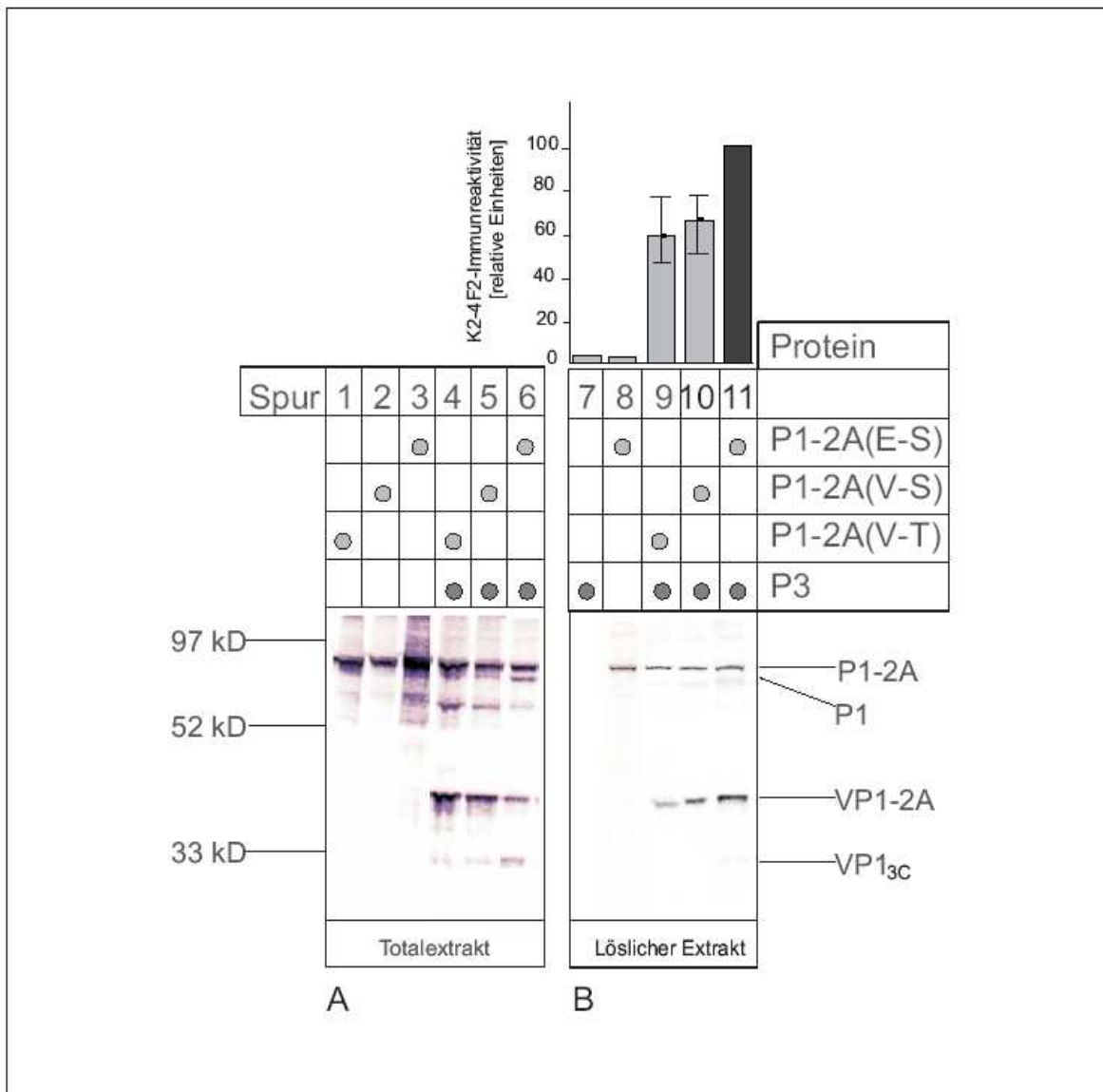
nachfolgenden Experimenten wird das durch 3C freigespaltene VP1 in Zukunft mit VP1<sub>3C</sub> bezeichnet. Das Auftreten vom ungespaltenen P1-2A-Volllängenprotein (Spur 4-6) ist möglicherweise dadurch bedingt, dass trotz Kotransfektion mit zwei Plasmiden einige Zellen ausschließlich mit dem P1-2A-kodierenden Plasmid transfiziert wurden bzw. nur dieses exprimieren, und es daher nicht zur proteolytischen Spaltung des Expressionsproduktes kam.

Da stets gleiche Anteile der Spaltprodukte VP1-2A (Spur 4-6), VP0 sowie VP0-VP3 (nicht gezeigt) gefunden wurden, kann geschlossen werden, dass die Effizienz der VP0/VP3- und VP3/VP1-Spaltung von der Aminosäuresequenz an der VP1-2A-Spaltstelle unabhängig ist. Die 3C-vermittelte Prozessierung an dieser Position in VP1-2A war jedoch unterschiedlich. Aus P1-2A(E-S) spaltete 3C wesentlich mehr VP1 frei als aus den übrigen getesteten Proteinen (Spur 4-6). Die effizientere Spaltung innerhalb der E/S-Sequenz im Vergleich zu der V/S- und V/T-Sequenz ist außerdem eindeutig anhand der relativ größeren Menge an P1 im Vergleich zum Vorläufer P1-2A zu belegen (Spur 6). Bemerkenswert ist, dass auch aus P1-2A(V-T) geringe Mengen von VP1 freigesetzt wurden (Spur 4). Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass die 3C-Substratspezifität wesentlich geringer ist, als bisher angenommen. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass 3C an einer anderen Position als vermutet in VP1-2A spaltet (Dotzauer et al., 1995; Probst et al., 1997). Aus P1-2A(E-S) wurde neben VP1 ein weiteres VP1-reaktives Protein freigespalten, welches eine geringfügig größere elektrophoretische Mobilität besitzt als VP1<sub>3C</sub> (Spur 6). Dieses Protein wurde VP1[fast] genannt (Probst et al., 1997) und entsteht vermutlich durch die 3C-vermittelte Spaltung an Position Leu[264]/Asn[265] in VP1-2A (siehe Abb. III-1b).

Neben dem Totalextrakt wurden auch die im PBS-TW-Überstand gelösten (partikulierten) HAV-Strukturproteine charakterisiert. Nach der Zentrifugation der Totalextrakte wurde der gewonnene Zelleextrakt ebenfalls auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von anti-VP1- (Abb. IV-1, Spur 9-11) sowie anti-VP0-Seren (nicht gezeigt) untersucht. Neben P1-2A war VP1-2A als Hauptspaltprodukt im anti-VP1-Westernblot nachweisbar. Während nach Koexpression von P1-2A(E-S) mit P3 im Totalextrakt sowohl VP1-2A als auch VP1 nachweisbar waren (Spur 6), konnten im Überstand desselben Lysates nur sehr geringe Mengen an VP1 nachgewiesen werden (Spur 11). Im löslichen Extrakt der P1-2A(V-S) +P3- und P1-2A(V-T) +P3-exprimierenden Zellen war kein VP1 detektierbar (Spur 9-10). Diese Daten deuten darauf hin, dass 2A-freie Strukturen mit der in dieser Arbeit genutzten



Aufschlussmethode nur sehr begrenzt in Lösung gebracht werden können. Dies belegen auch die vergleichsweise geringen Mengen an P1 in den Spuren 9-11. Aussagen zum Charakter der nicht-löslichen VP1-reaktiven HAV-Proteine können aufgrund der fehlenden experimentellen Zugänglichkeit im Rahmen dieser Studie nicht gemacht werden. Es ist denkbar, dass die unlöslichen 2A-freien Proteine (P1 und VP1) durch die unregelmäßige, d.h. assemblierungsunabhängige, 3C-Spaltung entstanden sind, und dass sie als unassemblierte und fehlgefaltete Produkte aggregierten und deshalb nicht Bestandteil der partikulierten Virusproteine im löslichen Überstand sind. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die 3C-vermittelte Spaltung an Position [273]/[274] nur teilweise von der Aminosäuresequenz abhängig ist.



**Abbildung IV-1: Protein-Spaltprodukte (Westernblot) und HAV-Partikelproduktion (EIA) nach der Expression von Konstrukten mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz an Position [273] und [274] in VP1-2A**

Wie schematisch oberhalb des Westernblots dargestellt, wurden die P1-2A-Konstrukte in der Anwesenheit (Spur 4-7 und 9-11) oder in der Abwesenheit (Spur 1-3 und 8) von HAV-P3, welches für die virale Proteinase 3C kodiert, exprimiert. In den Spuren 1-6, Abschnitt A, wurden Totalextrakte (= Gesamtheit aller exprimierten Proteine) aufgetragen, während in den Spuren 7-11, Abschnitt B, PBS-TW-lösliche Zellextrakte (= Fraktion der partikulierten Proteine) gezeigt werden. Die Proteine wurden im anti-VP1-Westernblot nachgewiesen. Die entsprechende Protein-Bezeichnung bzw. molekulare Massenangabe befindet sich am rechten oder linken Rand. Anhand der Proteine in Spur 7 (Expressionsprodukte von HAV-P3) wurde die Spezifität des VP1-Antikörpers überprüft. Oberhalb von Abschnitt B sind die Antigenitätsmengen (bestimmt durch den K2-4F2-EIA) der einzelnen Zellysate, prozentual zum Wildtyp-Lysat (Spur 11), dargestellt. Jede Bestimmung wurde in Doppeltransfektion und Dreifachmessung (n = 6) durchgeführt und in mindestens zwei weiteren experimentellen Ansätzen wiederholt. Die eingezeichneten Balken markieren das Vertrauensintervall eines Doppeltransfektionsansatzes mit n = 6. Als Negativ-Kontrollen wurden die Extrakte von P1-2A- oder P3-exprimierenden Zellen (Spur 7 und 8) genutzt.

## **1B: Beeinflussung der Partikelbildung durch die Aminosäuresequenz an Position [273]/[274] in VP1-2A**

Die 3C-vermittelte Prozessierung von VP1-2A an der Position [273]/[274] war in Abhängigkeit von der Spaltstellensequenz unterschiedlich effizient. Nun stellte sich die Frage, inwiefern der Austausch von Aminosäuren in diesem Bereich einen Einfluss auf die HAAg-Synthese besitzt. Für die Messungen im EIA wurden dieselben Lysate, die in Abbildung IV-1 in den Spuren 9-11 dargestellt sind und in denen die löslichen Proteine enthalten sind, genutzt. Die Spezifität des EIA wurde zuvor mit Hilfe der Lysate in den Spuren 7 und 8 getestet. Bei der getrennten Expression von pET11a-HM-P3 und pET11a-HM-P1-2A(E-S) war einerseits aufgrund der Abwesenheit von Strukturproteinen und andererseits aufgrund der fehlenden Prozessierung und damit verhinderten Assemblierung der Strukturproteine die Ausbildung des neutralisierenden Epitops unmöglich. Die entsprechenden Zellextrakte waren daher EIA-negativ. Dagegen wurden in den Lysaten der Koexpressionsansätze pET11a-HM-P1-2A(E-S) +P3, pET11a-HM-P1-2A(V-S) +P3 und pET11a-HM-P1-2A(V-T) +P3 mit Hilfe des EIA assemblierte Strukturen mit Ausbildung des K2-4F2-Epitops nachgewiesen, die, wie später in der Saccharosegradientenzentrifugation bewiesen (Abb. IV-6a/b), HAV-Partikeln entsprechen (Spur 9-11). Es wurden somit frühere Ergebnisse bestätigt, die zeigten, dass die Koexpression von P1-2A mit P3 eine Grundvoraussetzung für die Bildung von HAV-Partikeln darstellt (Probst et al., 1999). Die Partikelbildung war in den P1-2A(E-S) +P3-exprimierenden Zellen um ca. 40% effizienter als in den anderen Zellen (Abb. IV-1, Spur 9-11, Säulendiagramm). Die Verringerung des EIA-Signals in den Mutanten P1-2A(V-S) und P1-2A(V-T) könnte darauf hinweisen, dass der C-Terminus von VP1 entweder direkt an der Ausbildung des neutralisierenden Epitops beteiligt ist, oder dass die eingefügten Punktmutationen an den Positionen [273] und [274] durch Einfluss auf die Tertiärstruktur von VP1 die Zugänglichkeit des Epitops für neutralisierende Antikörper verändern.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Versuche, dass P1-2A durch die virale Proteinase 3C effizient prozessiert wird. Als Prozessierungsintermediate und Endprodukte konnten P1, VP1-2A, VP1 und VP0-reaktive Proteine eindeutig identifiziert werden. Die unterschiedliche Effizienz der VP1-2A-Spaltung in mutierten Vorläuferproteinen beweist, dass die Substratspezifität der viralen Proteinase 3C in VP1-2A gering ist, und dass 3C an der von Dotzauer et al. (1995) sowie von Probst et al. (1997) vorgeschlagenen Spaltstelle

Glu[273]/Ser[274] oder in ihrer unmittelbaren Umgebung spaltet. Der Nachweis geringer Mengen von P1 sowie VP1 bei Prozessierung von P1-2A(V-S) und P1-2A(V-T) ist ein eindeutiger Beweis für die partielle, 3C-vermittelte Spaltung dieser Sequenzen. Die gezeigten Versuche erlauben nicht, zu unterscheiden, ob die Abspaltung von 2A direkt oder indirekt durch 3C katalysiert wird. Da, wie später durch die Saccharosegradientenzentrifugation bestätigt wird (Abb. IV-6a/b), das freigesetzte VP1<sub>3C</sub> nicht in HAV Partikeln enthalten ist, kann davon ausgegangen werden, dass die 3C-vermittelte Abspaltung von 2A unabhängig von der HAV-Partikelbildung ist und vermutlich im ungefalteten Vorläuferprotein stattfindet. Die fehlende Prozessierung von P1-2A in der Abwesenheit von P3 deutet darauf hin, dass P1-2A kein Substrat einer intrazellulären Proteinasen in COS7-Zellen ist. Außerdem kommt es zu einer Abnahme der EIA-Aktivität innerhalb von P1-2A(V-S) und P1-2A(V-T) im Vergleich zur Originalsequenz.

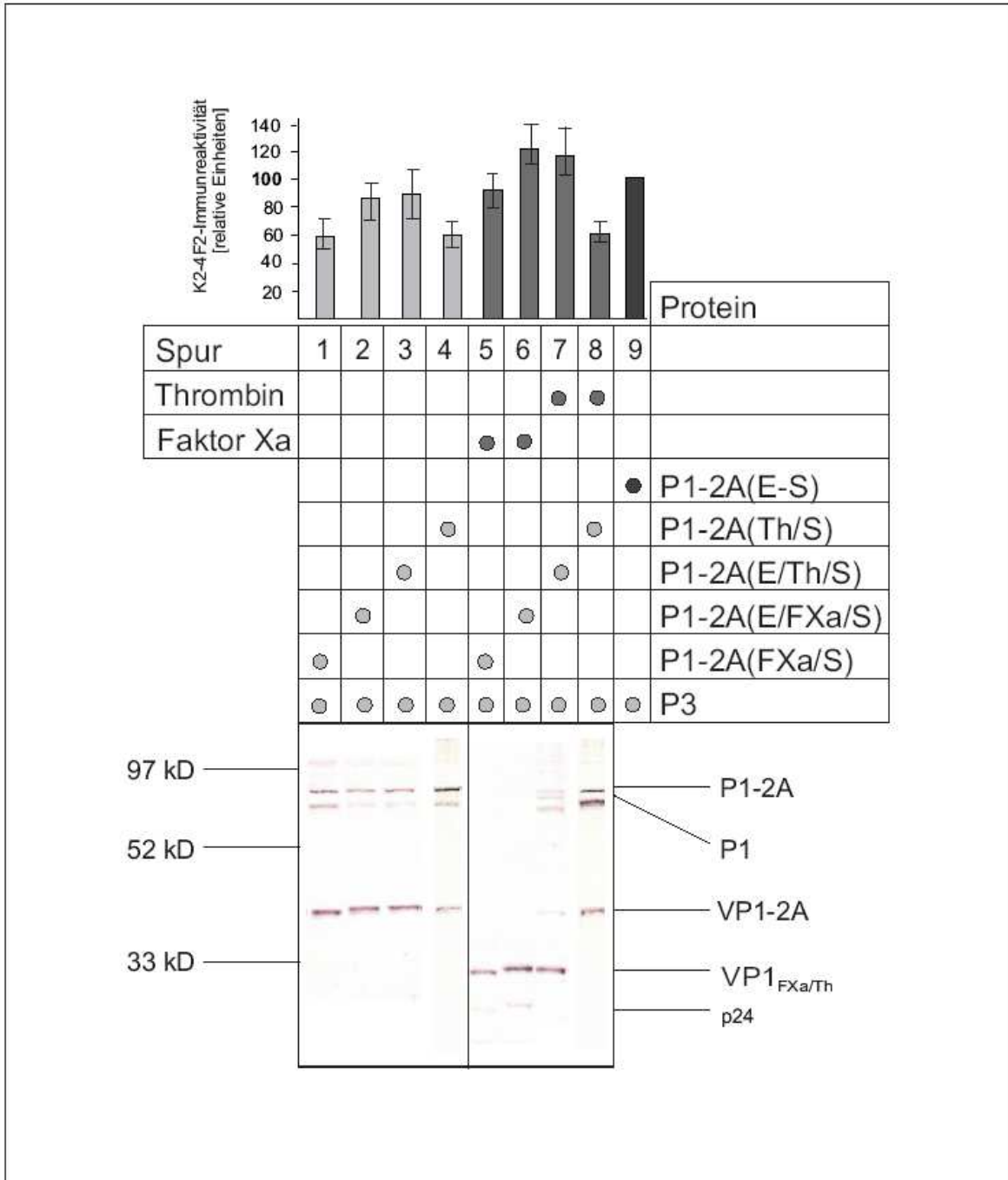
## **2A: 3C-vermittelte Prozessierung von P1-2A mit modifizierter Spaltstelle zwischen VP1 und 2A**

Die in infizierten Zellen produzierten HAV-Partikel sind heterogen, da die VP1-Moleküle unterschiedliche C-Termini tragen (Graff et al., 1999). Auch die verzögerte VP0-Spaltung kann ein Grund für die Heterogenität von reifen HAV Partikel sein, welche die Kristallisierung der Partikel bis zum heutigen Zeitpunkt verhindert hat (Bishop et al., 2000). Ziel der im Folgenden beschriebenen Versuche war die rekombinante Produktion von homogenen HAV-Partikeln, die entweder VP1-2A oder VP1 enthalten. Es wurde nach einer einfachen Möglichkeit gesucht, rekombinante VP1-2A-haltige HAV-Partikel zu erzeugen, von denen *in vitro* gezielt und vollständig 2A abgespalten werden kann. Grundlage der Überlegungen war die Annahme, dass die VP1-2A-Spaltstelle an der Oberfläche der HAV-Partikel exponiert und damit für Proteinasen zugänglich ist (Beneduce et al. 2002).

In das Konstrukt pET11a-HM-P1-2A(E-S) wurde durch ortsspezifische Mutagenese zwischen VP1 und 2A die Konsensussequenz der Spaltstelle der Proteinasen FXa oder Thrombin eingefügt. Da FXa und Thrombin sehr spezifisch spalten, werden sie häufig insbesondere im Rahmen rekombinanter Proteinaufreinigungsverfahren genutzt. Wie aus der Abbildung III-1c ersichtlich wird, wurde entweder die Konsensussequenz zusätzlich zwischen die Aminosäuren Glu[273] und Ser[274] (Insertionsmutanten) oder anstelle der HAV-Aminosäuren vor der Position Ser[274] (Substitutionsmutante) eingefügt. Diese

doppelte Strategie wurde verwendet, da es nicht möglich war, im Voraus abzuschätzen, ob entweder die zusätzlich eingefügten Aminosäuren oder die Mutationen im VP1-C-Terminus die HAV-Partikelsynthese bzw. –Prozessierung verhindern würden. Auf diese Weise entstanden die potentiell durch FXa-spaltbaren Konstrukte pET11a-HM-**P1-2A(E/FXa/S)** (Insertionsmutante) und pET11a-HM-**P1-2A(FXa/S)** (Substitutionsmutante) sowie die Thrombin-Spaltstellen-Insertionsmutante pET11a-HM-**P1-2A(E/Th/S)** und die Substitutionsmutante pET11a-HM-**P1-2A(Th/S)**. Durch das Einfügen dieser Mutationen sollte die VP1-2A-Spaltung unabhängig von der viralen Proteinase sein, da die an Position [273]/[274] gelegene 3C-Spaltstelle zerstört und gegen die für FXa und Thrombin ausgetauscht war.

Gemäß des Standardprotokolls wurden diese Konstrukte mit und ohne P3 koexprimiert. In Abwesenheit von P3 fand, wie erwartet, keine Prozessierung innerhalb des Strukturvorläuferproteins P1-2A statt (nicht gezeigt). Die veränderten P1-2A-Moleküle waren also, ebenso wie P1-2A(**E-S**), im COS7-Zelllysat stabil und dienten nicht als Substrat für virusfremde, zelluläre Proteinase. Die im Überstand enthaltenen löslichen Proteine, die durch Koexpression gebildet wurden, sind in Abbildung IV-2 dargestellt. In Anwesenheit der viralen Proteinase 3C wurden die VP1-reaktiven Proteine P1 und VP1-2A in den Spuren 1-4 sowie alle VP0-reaktiven Proteine VP0, VP0-VP3 (nicht gezeigt) nachgewiesen. Da VP0, VP0-VP3 sowie VP1-2A in gleichem Maße aus den mutierten Polyproteinen entstanden, kann geschlossen werden, dass trotz der eingefügten Mutationen die Struktur des HAV-Polyproteins und seine 3C-Spaltbarkeit an den bekannten Positionen (VP0/VP3 und VP3/VP1) erhalten blieb. Das Auftreten von P1 in diesen Zellextrakten ist erstaunlich und erfordert einigen Erklärungsbedarf: Da die 3C-Spaltsequenz E-S an Position [273]/[274] in den Mutanten abwesend ist, muss vermutet werden, dass das mutierte P1 durch 3C-Spaltung an einer alternativen Position (Leu[264]/Asn[265] (Probst et al., 1997)) weiter „upstream“ innerhalb von VP1 entstanden ist. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem anti-VP1-reaktiven Protein um das Dimer von VP1-2A handelt, auf welches an anderer Stelle noch vertiefend eingegangen wird (s.u.). Beim Vergleich der löslichen Proteinfractionen fiel auf, dass VP1-2A aus P1-2A(**E/FXa/S**) und P1-2A(**E/Th/S**) (Spur 2 und 3) etwas langsamer migrierte als das aus P1-2A(**FXa/S**) und P1-2A(**Th/S**) (Spur 1 und 4). Diese Veränderung im Laufverhalten der VP1-2A-Polyproteine (der Insertionsmutanten) ist durch das Einfügen der Thrombin- bzw. FXa-Spaltstellensequenz (in Form von fünf bzw. vier zusätzlichen Aminosäuren) zu erklären.



**Abbildung IV-2: Proteolytische Spaltung durch FXa und Thrombin von HAV-Partikeln mit entsprechenden Konsensussequenzen in VP1-2A**

Die mutierten P1-2A-Konstrukte wurden mit P3 koexprimiert. Die löslichen Proteine wurden im anti-VP1-Westernblot und K2-4F2-EIA vor (Spur 1-4) und nach in vitro-Proteinaseverdau (Spur 5-8) analysiert. Die Prozessierungsprodukte und der entsprechende Molekulargewichtsmarker sind am linken bzw. rechten Rand markiert. Die Antigenitätsmenge wurde prozentual zum Wildtyp (P1-2A(E-S) +P3-Lysat) ausgedrückt. Die Messung erfolgte nach doppelter Transfektion und in Form von einer Dreifachbestimmung jedes Ansatzes. Die eingezeichneten Balken markieren das Vertrauensintervall.

## **2B: Partikelbildung von P1-2A mit modifizierter Spaltstelle zwischen VP1 und 2A**

Um zu untersuchen, ob die eingefügten Mutationen die HAV-Partikelbildung beeinflussen, wurde die partikelspezifische Antigenität der löslichen Fraktionen im EIA bestimmt. In allen vier Fällen wurden HAV-Strukturen nachgewiesen, die das K2-4F2-Epitop tragen (Abb. IV-2, Spur 1-4, Säulendiagramm). Auffallend war, dass bei allen untersuchten Mutanten die Gesamtantigenität niedriger war als beim Kontrollextrakt aus P1-2A(E-S) +P3-exprimierenden Zellen (Spur 9). Die Antigenität der Substitutionsmutanten P1-2A(FXa/S) und P1-2A(Th/S) (Spur 1 und 4) war wiederum deutlich geringer als die der Insertionsmutanten P1-2A(E/FXa/S) und P1-2A(E/Th/S) (Spur 2 und 3). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die C-terminalen Aminosäuren von VP1 direkt oder indirekt eine wichtige Rolle bei der Bildung des neutralisierenden Epitops spielen.

Zusammenfassend zeigen die unter 2A und 2B dargestellten Versuche, dass es möglich ist, zwischen VP1 und 2A Fremdepitope von vier bis fünf Aminosäuren einzufügen, ohne die 3C-vermittelte P1-2A-Prozessierung außerhalb der VP1-2A-Spaltstelle zu beeinträchtigen. Die mutierten Strukturproteine können EIA-positive HAV-Partikel bilden, deren Gesamtantigenität im Vergleich zur Originalsequenz reduziert ist.

## **3A: FXa- und Thrombin-vermittelte Abspaltung von 2A**

Um die Funktionalität der eingefügten FXa- bzw. Thrombinspaltstellen zu analysieren, wurden die löslichen Zellextrakte aus Abbildung IV-2 (Spur 1-4) mit der entsprechenden aufgereinigten Proteinase über 16 h bei 20°C inkubiert. Die entstandenen Produkte wurden anschließend in einem anti-VP1-Westernblot hinsichtlich einer Spaltung zwischen VP1 und 2A analysiert (Abb. IV-2, Spur 5-8). Aus P1-2A(FXa/S) und P1-2A(E/FXa/S), mit der in VP1-2A inserierten FXa-Spaltstelle, wurde VP1<sub>FXa</sub> durch die Proteinase FXa spezifisch freigespalten (Spur 5 und 6). VP1<sub>FXa</sub> aus dem Protein VP1-2A(E/FXa/S) (Spur 6) war aufgrund der zusätzlich eingefügten vier Aminosäuren der FXa-Spaltstellensequenz wie erwartet größer als VP1<sub>FXa</sub> aus der Substitutionsmutante VP1-2A(FXa/S) (Spur 5), da diese vier Aminosäuren nach der Spaltung durch FXa am C-Terminus von VP1 verbleiben. Analog konnte Thrombin VP1<sub>Th</sub> aus VP1-2A(E/Th/S) freispalten (Spur 7). Das freigesetzte VP1<sub>Th</sub> war auch hier aufgrund der zusätzlich

eingefügten Aminosäuren erwartungsgemäß größer als VP1<sub>FXa</sub> der Substitutionsmutante P1-2A(FXa/S) (Spur 5). Die in P1-2A(Th/S) eingefügte Spaltstelle erwies sich als nicht funktionell, da Thrombin kein VP1 freispalten konnte (Spur 8). Obwohl P1-2A(Th/S) zur Partikelbildung fähig war (Abb. IV-2, Spur 4, Säulendiagramm), scheint die Thrombin-Spaltstelle aufgrund von Konformationsänderungen, die auf die Substitution der Thrombinspaltstellensequenz zurückzuführen sind, für die Proteinase nicht mehr zugänglich zu sein. Als Erklärung für die fehlende Spaltbarkeit scheiden unerwünschte Sekundärmutationen aus, da die mutierten Konstrukte sequenziert wurden.

FXa wie auch Thrombin spalteten aus den mutierten P1-2A-Polypeptiden ebenfalls P1 frei (Abb. IV-2, Spur 7-8 für Thrombin und in Abb. III-2, Spur 3-4 für FXa gezeigt). Auffallend ist, dass Thrombin aus der Substitutionsmutante P1-2A(Th/S) nicht VP1 aus VP1-2A, dennoch aber P1 aus P1-2A freispaltete. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass die eingefügte Thrombin-Spaltstelle zwischen VP1 und 2A im ungespaltenen Strukturvorläuferprotein P1-2A für die Proteinase zunächst noch zugänglich ist. Erst die mit der 3C-vermittelten Prozessierung der Strukturproteine auftretenden Konformationsänderungen (Smyth et al., 2000) machen möglicherweise die an der Partikeloberfläche in VP1-2A liegende Spaltstelle für Thrombin unzugänglich. Neben VP1 wurde durch FXa aus P1-2A(FXa/S) sowie P1-2A(E/FXa/S) ein weiteres VP1-reaktives Protein mit größerer elektrophoretischer Mobilität und einem geschätzten Molekulargewicht von 24 kD freigespalten (Spur 5-6). Auf dieses zusätzliche Spaltprodukt wird im Folgenden noch genauer eingegangen (s.u.).

### **3B: Einfluss der FXa- oder Thrombin-vermittelten 2A-Abspaltung auf die Antigenität rekombinanter HAV-Partikel**

Um festzustellen, welchen Einfluss die *in vitro*-2A-Abspaltung durch FXa oder Thrombin auf die subvirale HAV-Partikelbildung ausübt, wurde die virale Antigenität in den Lysaten 5-8 mit Hilfe des K2-4F2-EIA bestimmt (Abb. IV-2, Spur 5-8, Säulendiagramm). Nach Proteinaseverdau waren alle Lysate EIA-positiv. In allen Fällen konnte eine Zunahme der EIA-Aktivität beobachtet werden. Aus unbekanntem Gründen schwankte die Antigenitätszunahme beim Vergleich der Daten aus den einzelnen Transfektionsansätzen zwischen 50% und 300%, wenn das EIA-Signal der unbehandelten Zellextrakte als 100% gesetzt wurde. Während bei zwei voneinander unabhängigen Expressionsansätzen das EIA-Signal nach 2A-Abspaltung eine Zunahme von ca. 50%



erfuhr (Ergebnisse sind in Abb. IV-2 dargestellt), wurde bei zwei weiteren Versuchen eine EIA-Signalzunahme nach dem in vitro-Proteinaseverdau von bis zu 300% gemessen. Trotz umfangreicher Experimente, wie z.B. Stabilitätstests mit den HAV-Kapsiden, konnte die Ursache dieser Schwankungen nicht identifiziert werden. Die möglichen Gründe für die Abweichungen innerhalb der Antigenität von 2A-freien Partikeln werden im anschließenden Teil der Arbeit diskutiert.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die VP1-2A-Spaltstelle auf der Partikeloberfläche des HAV-Prokapsids exponiert und für den in vitro-Verdau mit fremden Proteinase wie z.B. Faktor Xa und Thrombin zugänglich ist. Nach 2A-Abspaltung vom HAV-Prokapsid kommt es zu einer Zunahme der Antigenität der Partikel. Aufgrund seiner Größe und Position an der 5-fach-Achse des Partikels (Beneduce et al., 2002) ist es denkbar, dass 2A das neutralisierende Epitop partiell verdeckt, welches erst nach proteolytischer Entfernung von 2A optimal präsentiert wird. Darüber hinaus ist es möglich, dass die 2A-Abspaltung, ähnlich wie die VP0-Reifung (Bishop und Anderson, 1993; 1997), zu einer Zunahme der spezifischen Antigenität der Partikel führt.

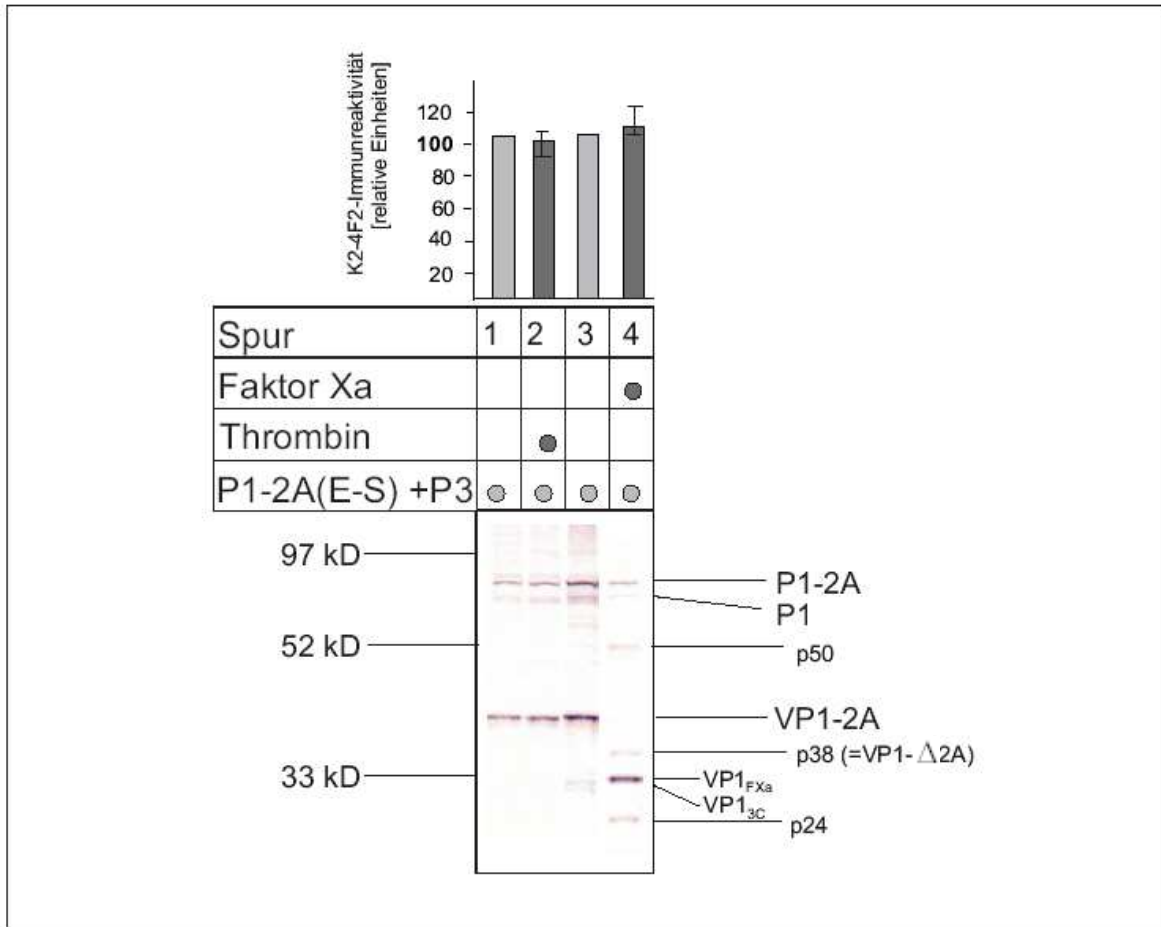
#### **4: FXa- bzw. Thrombin-Spaltung von Wildtyp-VP1-2A in HAV-Prokapsiden**

Da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass assemblierte HAV-Strukturproteine durch verschiedene eukaryotische Proteinase spaltbar sind (Mihalyi et al., 1979; Stapleton et al., 1988; Lemon et al., 1991), sollte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet werden, inwieweit FXa oder Thrombin die Strukturproteine im HAV-Prokapsid vom Wildtyp spalten. Dazu wurden die Partikel (und Proteine) im löslichen Extrakt von P1-2A(E-S) +P3-exprimierenden Zellen mit FXa bzw. Thrombin behandelt (Abb. IV-3). Überraschenderweise wurde das Wildtyp-VP1-2A-Polyprotein, welches keine FXa-Spaltstellenkonsensussequenz enthält, hocheffizient durch FXa gespalten (Spur 4). Aufgrund seines elektrophoretischen Laufverhaltens scheint das durch FXa freigesetzte VP1<sub>FXa</sub> durch Spaltung in unmittelbarer Umgebung der Position [273]/[274] in VP1-2A entstanden zu sein. Dort befindet sich jedoch keine klassische FXa-Konsensussequenz. In der Literatur werden für FXa in Abhängigkeit von der sterischen Zugänglichkeit alternative Spaltstellen beschrieben, die sich auf basische Aminosäuren, wie z.B. Arginin, beschränken (Invitrogen, 1999; Brenda - The Comprehensive Enzyme Information System). An Position [278] befindet sich in VP1-2A ein Arginin-Rest. Für die spezifische

FXa-Spaltung in VP1-2A(**E-S**) C-terminal der Position [273]/[274] spricht, dass das durch FXa freigespaltene VP1<sub>FXa</sub> (Spur 4) langsamer migriert als das durch 3C freigespaltene VP1[273]<sub>3C</sub>, welches (nur in geringen Mengen in Spur 3) in den unbehandelten Kontrollen nachweisbar ist (siehe auch Abb. IV-1, Spur 4).

Neben VP1<sub>FXa</sub> wurden noch weitere VP1-reaktive (p50, p38, p24) und VP0-reaktive Proteine (nicht gezeigt) freigespalten. Da diese Polypeptide jedoch nur in geringer Menge produziert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass FXa an keiner dieser zusätzlichen Spaltstellen im assemblierten Polyprotein so effizient spaltet wie zwischen VP1 und 2A. Die FXa-behandelten HAV-Prokapside waren wie das unbehandelte Lysat EIA-positiv, wobei die Antigenität nach Zugabe der Proteinase nur gering anstieg. Im Wildtyp-HAV-Prokapsid kam es also nicht, wie bei den chimären Prokapsiden mit zusätzlicher FXa-Spaltstelle zwischen VP1 und 2A, zu einer deutlichen Zunahme der Antigenität nach 2A-Abspaltung. In der anschließenden Diskussion werden die möglichen Gründe für diese Beobachtung analysiert.

Für Thrombin konnten keine Spaltungsaktivitäten innerhalb der HAV-Wildtyp-Strukturproteine und deshalb auch kein Einfluss auf die EIA-Reaktivität nachgewiesen werden (Spur 2).



**Abbildung IV-3: Proteolytische Spaltung von HAV-Wildtyppartikeln durch FXa und Thrombin**

Die Wildtypsequenz von HAV-P1-2A wurde in der Anwesenheit von HAV-P3 exprimiert, und der lösliche Extrakt wurde einem in vitro-Verdau mit FXa bzw. Thrombin ausgesetzt. Die Spaltprodukte wurden im anti-VP1-Westernblot und im EIA vor (Spur 1, 3) und nach (Spur 2, 4) Proteinaseverdau charakterisiert. Die Bezeichnung und die molekulare Masse der einzelnen Proteine befindet sich am Rand des Blots. Das P1-2A(E-S) +P3-Lysat diente als Positivkontrolle im EIA und wurde gleich 100% gesetzt. Die Berechnung der Antigenität erfolgte wie in Material und Methoden (6.3) beschrieben.

## 5: FXa-Spaltung in P1-2A in Abhängigkeit von der Konformation der Strukturproteine

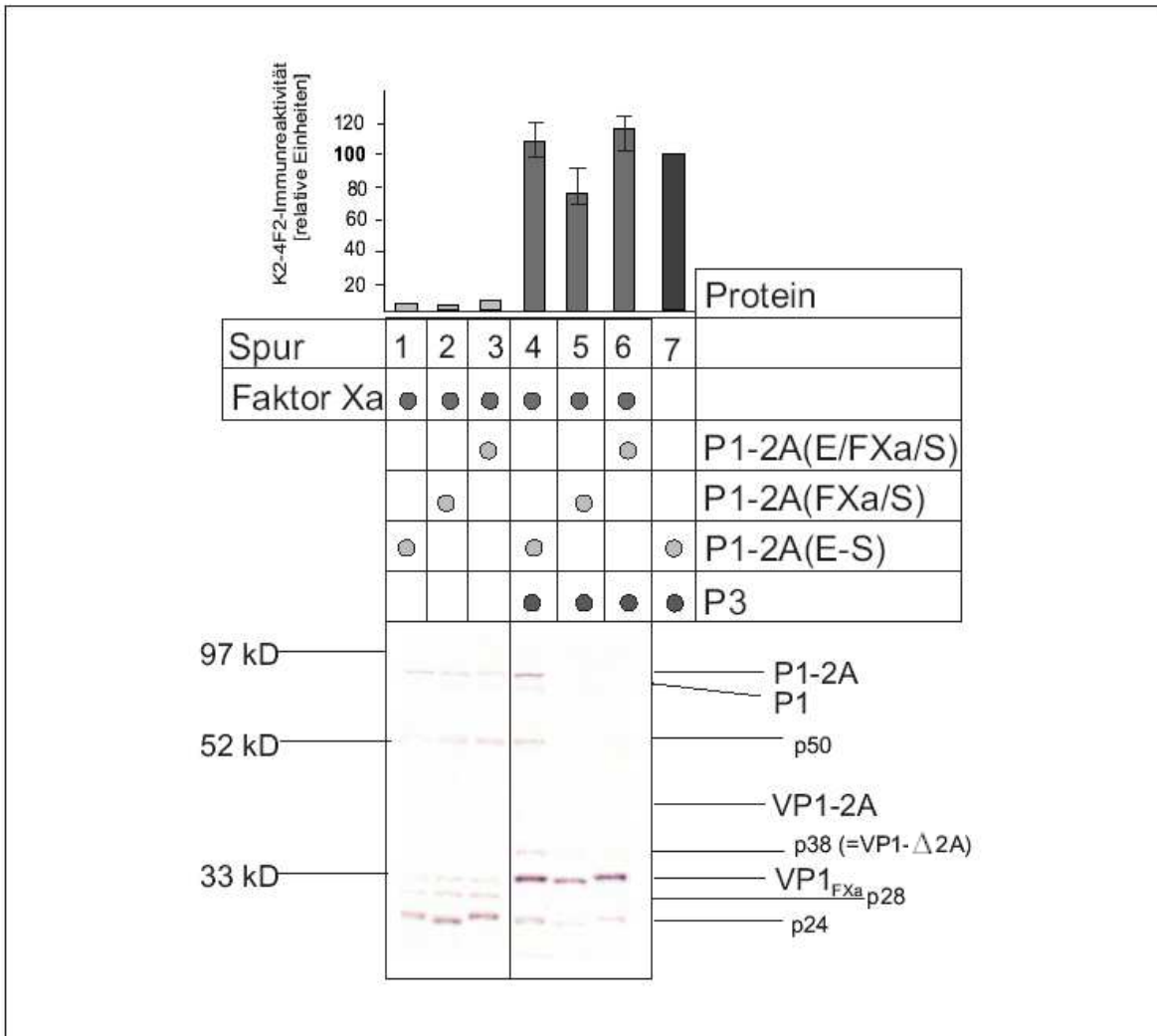
Die Erkenntnis, dass FXa auch ohne das Vorhandensein einer spezifischen Spaltstellensequenz in VP1-2A spaltet und im Wesentlichen VP1<sub>FXa</sub> freisetzt, ist außergewöhnlich. Dieser Befund kontrastiert mit der Tatsache, dass zahlreiche basische Aminosäuren innerhalb der Strukturproteine vorliegen, und somit mehrere potentielle FXa-Spaltstellen vorhanden sind. Es wurde daher vermutet, dass die beobachteten Spaltungen durch die Tertiärstruktur bedingt sind. Basierend auf dieser Annahme sollte geprüft werden, ob das Auftreten spezifischer Spaltprodukte (Markerprodukte) Hinweise auf die Faltung und Assemblierung der HAV-Strukturproteine zulässt.

Um die Konformationsabhängigkeit der FXa-Spaltung direkt zu zeigen, wurden P1-2A(E/FXa/S) und P1-2A(FXa/S) wie auch P1-2A(E-S) sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit der viralen Proteinase 3C exprimiert und anschließend mit FXa *in vitro* gedaut. Wie durch die Antigenitätsbestimmungen im EIA (Abb. IV-2, Spur 1,2 und 9) und der Saccharosegradientenzentrifugation (s.u.) gezeigt, wurden bei der Koexpression von 3C mit mutierten sowie mit Wildtyp-Vorläuferproteinen 70S-Prokapside gebildet. Nach dem *in vitro*-FXa-Verdau der Prokapside-enthaltenen Zellextrakte wurde VP1<sub>FXa</sub> nachgewiesen (Abb. IV-4, Spur 4-6). Im Fall der chimären Prokapside wurde vermutlich innerhalb der eingefügten FXa-Konsensussequenz gespalten und innerhalb der Wildtyp-Prokapside am C-Terminus des Arg[278] in VP1-2A. Dies konnte aus der molekularen Masse der freigesetzten VP1-Moleküle geschlossen werden. VP1<sub>FXa</sub>, das aus Wildtyp-VP1-2A freigespalten wurde, migrierte im SDS-Gel langsamer als VP1<sub>3C</sub>, das höchstwahrscheinlich durch Spaltung an Position Glu[273]/Ser[274] entstand (vgl. Spur 3 und 4 in Abb. IV-3). Dies weist darauf hin, dass sich die FXa-Spaltstelle C-terminal von der 3C-Spaltstelle in VP1-2A befindet. VP1<sub>FXa</sub>, welches aus der VP1-2A(FXa/S)-Sequenz freigesetzt wurde (Abb. IV-4, Spur 5), migriert schneller als VP1<sub>FXa</sub>, aus VP1-2A(E-S) (Spur 4). Hätte FXa im mutierten Konstrukt an der nativen (Arg[278]) und nicht an der substituierten Spaltstelle gespalten, würde VP1<sub>FXa</sub> aus VP1-2A(FXa/S) (Spur 5) mit VP1<sub>FXa</sub> der Wildtypsequenz (Spur 4) komigrieren, da beide Konstrukte über die gleiche Anzahl von Aminosäuren verfügen. Auch im Fall von VP1-2A(E/FXa/S) ist anzunehmen, dass FXa hinter der spezifischen Konsensussequenz spaltet, da das freigespaltene VP1<sub>FXa</sub>, das im Vergleich zur Originalsequenz vier zusätzliche Aminosäuren enthält (Spur 6), mit VP1<sub>FXa</sub> aus der Wildtypsequenz komigriert (Spur 4). Hätte FXa an der nativen

Spaltposition prozessiert, wäre  $VP1_{FXa}$  aus  $VP1-2A(E/FXa/S)$  deutlich größer als  $VP1_{FXa}$ , welches aus  $VP1-2A(E-S)$  freigespalten wurde.

Neben dem Hauptprodukt des FXa-Verdau ( $VP1_{FXa}$ ) und P1-2A wurden im anti-VP1-Westernblot weitere Polypeptide mit einer molekularen Masse von etwa 50 kD, 38 kD und 24 kD entdeckt (Spur 4-6). Das Molekulargewicht und die immunogenen Eigenschaften deuten an, dass p38 ( $VP1-\Delta 2A$ ) durch Spaltung an einer weiteren FXa-Spaltstelle C-terminal der Position Arg[278] entstand. Dagegen entsteht p24 durch Spaltung innerhalb von VP1. Da im Vergleich zu P1-2A(E-S) in den Extrakten der P1-2A(E/FXa/S)- und P1-2A(FXa/S)-exprimierenden Zellen weniger Expressions- und Spaltprodukte gebildet wurden, waren die Spaltprodukte p50 und p38 hier nur in kaum sichtbaren Mengen nachweisbar (Spur 5-6). In anderen Versuchen und in Abbildung III-2, Spur 1, (Proteinaseverdau-Vorversuch) konnte gezeigt werden, dass FXa auch aus diesen Konstrukten p50 und p38 freispaltet. Wie bereits an anderer Stelle in dieser Arbeit gezeigt wurde, enthielten die beschriebenen Zellextrakte virale Partikel, was der positive Antigenitätsnachweis beweist (Abb. IV-4, Spur 4-6, Säulendiagramm).

Nach Expression derselben Konstrukte in Abwesenheit der viralen Proteinase wurden vor (nicht gezeigt) und nach FXa-Verdau (Abb. IV-4, Spur 1-3, Säulendiagramm) keine viralen Partikel im EIA detektiert, da 3C für die Partikelbildung essentiell ist (s.o.). Dennoch waren im Überstand Proteine von 50 kD und 24 kD gelöst (Abb. IV-4, Spur 1-3), die nicht Bestandteil viraler Prokapside waren. Darüber hinaus war ein weiteres anti-VP1-reaktives Protein von 28 kD nachweisbar, welches zuvor nicht aus assemblierten HAV-Proteinen durch FXa-Spaltung freigesetzt wurde (Spur 4-6). Der Nachweis von anti-VP1-reaktiven Proteinen im EIA-negativen löslichen Zellextrakt (Überstand) in Spur 1-3 zeigt, dass die partikulierten viralen Proteine im Totalextrakt durch Zentrifugation nicht vollständig von den nicht partikulierten Proteinen getrennt werden können, sondern dies nur mit Hilfe der Saccharosegradientenzentrifugation möglich ist (s.u.). Der direkte Vergleich der FXa-Spaltprodukte von assemblierten (Spur 4-6) mit den FXa-Spaltprodukten von nicht assemblierten (Spur 1-3) HAV-Strukturproteinen zeigt eine unterschiedliche FXa-Spaltungsaktivität. Während in beiden Lysaten p50 und p24 enthalten sind, werden nur aus assemblierten HAV-Prokapsiden  $VP1_{FXa}$  und p38 durch FXa freigespalten. Im Gegensatz dazu spaltet die Proteinase p28 ausschließlich aus nicht partikulierten HAV-P1-2A frei. Die Ergebnisse indizieren, dass die Spezifität der FXa-Spaltung wesentlich von der Assemblierung der Strukturproteine abhängt und daher konformationsabhängig ist.



**Abbildung IV-4: Konformationsabhängigkeit der FXa-Spaltung**

P1-2A(E/FXa/S), P1-2A(FXa/S) und P1-2A(E-S) wurden in Abwesenheit (Spur 1-3) und in Anwesenheit (Spur 4-6) der viralen Proteinase 3C exprimiert. Das lösliche Zelllysate wurde mit FXa inkubiert und anschließend im anti-VP1-Westernblot sowie im EIA untersucht. Die Protein-Bezeichnung und der Molekulargewichtsmarker sind am Rand des Blots eingezeichnet. Die Antigenitätsbestimmung erfolgte gemäß Material und Methoden (6.3). Die Positivkontrolle (P1-2A(E-S) +P3-Lysat) ist in Spur 7 eingezeichnet.

Zusammenfassend zeigen die unter 4 und 5 dargestellten Versuche, dass FXa aus partikuliertem VP1-2A(E-S), trotz fehlender FXa-Spaltstellenkonsensussequenz, hocheffizient VP1 freispaltet, vermutlich an der Dipeptid-Position Arg[278]/Ile[279]. Darüber hinaus spaltet FXa an weiteren Positionen innerhalb P1-2A. Wie effizient und an welchen Positionen FXa prozessiert, hängt neben der Proteinasekonzentration (je mehr FXa vorhanden ist, desto vermehrt erfolgt die alternative Spaltung [siehe Proteinase-Verdau Abb. III-2]), der Substratkonzentration und der Inkubationszeit (Mihalyi et al., 1979) entscheidend davon ab, ob die HAV-Proteine assembliert sind oder nicht. Es ist also mit Hilfe eines FXa-Verdau und anschließender Darstellung des Spaltproduktemusters im anti-VP1-Westernblot möglich, assemblierte HAV-Proteine von unassemblierten zu unterscheiden.

## **6A: Identifizierung der nativen FXa-Spaltstelle in VP1-2A**

Die Proteinase FXa kann in Abhängigkeit von der sterischen Zugänglichkeit auch an Positionen spalten, die nicht der Konsensussequenz entsprechen. Minimale Voraussetzung für diese Spaltung ist eine basische Aminosäure an der zu spaltenden Position. Daher, und aufgrund bereits vorausgegangener Beschreibungen des Migrationsverhaltens von VP1<sub>FXa</sub>, wurde vermutet, dass FXa am Arg[278] in VP1-2A(E-S) spaltet. Um diese These zu überprüfen, wurde die putative FXa-Spaltstelle durch Austausch der Aminosäure Arginin an Position [278] durch Methionin verändert. Das erhaltene Konstrukt wurde mit pET11a-HM-P1-2A(E-S)-R[278]M bezeichnet (Abb. III-1c). Weiterhin wurde die Mutante P1(E-S)-[278] hergestellt, deren offener Leserahmen mit einem Stopkodon an Position Arg[278] endet (Abb. III-1c). Die Expressions- und Prozessierungsprodukte dieser Mutante sollten aufgrund der Freisetzung von VP1[278]<sub>3C</sub> als Komigrationsstandard dienen und somit die Zuordnung des durch FXa freigesetzten VP1<sub>FXa</sub> aus der E-S-Sequenz ermöglichen. Um die Funktionalität der Mutanten P1-2A(E-S)-R[278]M und P1(E-S)-[278] hinsichtlich ihrer 3C-Spaltbarkeit zu überprüfen, wurden sie, wie auch das Wildtyppolyprotein, zusammen mit P3 exprimiert. Im anti-VP1-Westernblot wurde der lösliche Zellextrakt hinsichtlich der 3C-vermittelten Prozessierung überprüft (Abb. IV-5). Wie bereits beschrieben, waren im Fall von P1-2A(E-S) die VP1-reaktiven Proteine P1-2A, P1, VP1-2A und VP1 im Totalextrakt nachweisbar (Abb. IV-1, Spur 6), wobei VP1 im löslichen Überstand wiederum nur in Spuren sichtbar war (Abb. IV-5, Spur 1). Aus P1(E-S)-[278] wurden erwartungsgemäß nur die beiden Proteine P1 und VP1 freigespalten

(Abb. IV-5, Spur 2). Diese besaßen eine geringere elektrophoretische Mobilität als die P1<sub>3C</sub>- und VP1<sub>3C</sub>-Proteine, welche durch 3C aus der E-S-Sequenz an der Position [273]/[274] freigespalten wurden (vgl. VP1[278] in Spur 2 mit VP1<sub>3C</sub> in Spur 9). Dies deutet darauf hin, dass sowohl P1 als auch VP1 aus P1(E-S)-[278] Arg[278] als C-Terminus besitzen und 3C nicht an der Position [273]/[274] in VP1 spaltete. Neben dem Laufverhalten, das die VP1-Proteine im SDS-Gel zeigen, gründet diese Annahme auch auf kürzlich gewonnene Daten (Cohen et al., 2002), die zeigen, dass eine Deletion von C-terminalen Aminosäuren in 2A die 3C-vermittelte Prozessierung innerhalb der HAV-Strukturproteine stört, und es zur Akkumulierung von ungespaltenen Strukturprotein-Intermediaten u.a. auch von VP1-2A kommt.

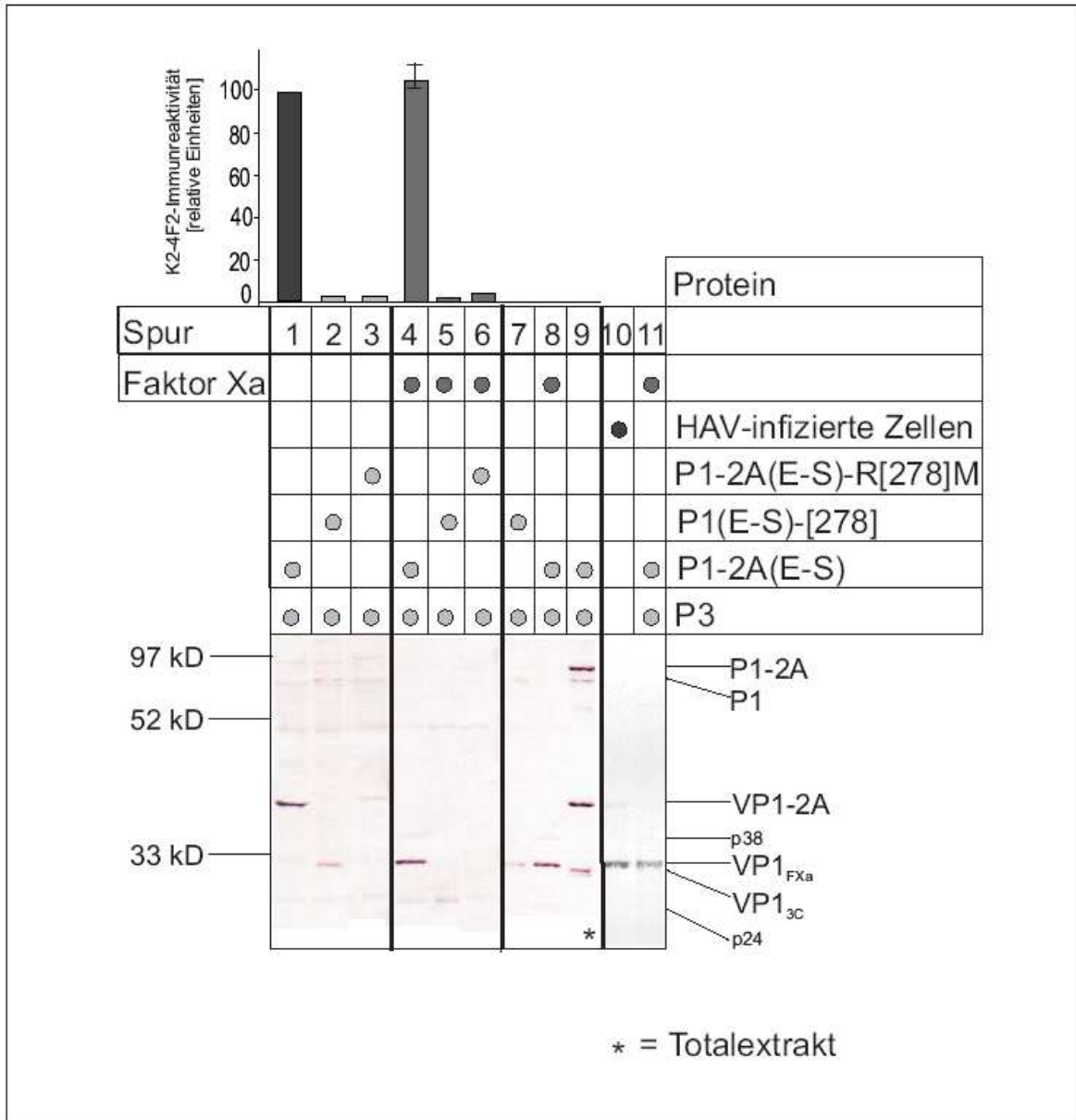
Trotz mehrerer Wiederholungen gelang es nicht, aus den Extrakten von P1-2A(E-S)-R[278]M und P1(E-S)-[278] größere Mengen an Strukturproteinen in Lösung zu bringen (Spur 2-3). Im Gegensatz zum Totalextrakt von P1-2A(E-S)-R[278]M +P3-exprimierenden Zellen, in welchem neben P1-2A die 3C-Spaltprodukte P1, VP1-2A und VP1 nachweisbar waren (nicht gezeigt), war im löslichen Überstand ausschließlich VP1-2A nachweisbar (Spur 3). Das Auftreten aller möglichen Spaltprodukte im Totalextrakt und von VP1-2A im Überstand zeigt, dass weder das Einfügen eines Stoppcodons noch die Punktmutation an Position [278] einen Einfluss auf die 3C-Spaltung innerhalb des Strukturproteinvorläufers P1-2A besitzen.

Um die konformationsabhängige Spaltbarkeit zu testen, wurden die löslichen Extrakte *in vitro* mit FXa behandelt. Nach dem FXa-Verdau wurden die Lysate im Westernblot hinsichtlich einer Spaltung zwischen VP1 und 2A analysiert (Abb. IV-5, Spur 4-6). Im P1-2A(E-S) +P3-Lysat konnte, wie erwartet, die FXa-vermittelte Spaltung von VP1-2A zu VP1 beobachtet werden (vgl. Spur 1 und 4). Neben VP1<sub>FXa</sub> waren die im vorherigen Abschnitt bereits beschriebenen VP1-reaktiven Proteine p38 und p24 nachweisbar. Im löslichen Extrakt von P1(E-S)-[278] +P3-exprimierenden Zellen konnte im Anschluss an den FXa-Verdau kein anti-VP1-reaktives Protein außer p24 detektiert werden (Spur 5). Die geringen Mengen an löslichen Expressionsprodukten von P1-2A(E-S)-R[278]M waren nach FXa-Verdau nicht mehr nachweisbar (Spur 6). Daher ist es nicht möglich, eine Aussage bezüglich der eventuell verhinderten FXa-Spaltung an Position [278]/[279] zu treffen.

Aufgrund der Tatsache, dass mit Hilfe der P1-2A(E-S)-R[278]M-Mutante die FXa-Spaltung an Position [278] nicht bewiesen werden konnten, sollten durch den Molekulargewichtvergleich von VP1<sub>FXa</sub> und VP1[278]<sub>3C</sub> Rückschlüsse auf die FXa-



Spaltstelle gezogen werden. In den Spuren 7-8 in Abbildung IV-5 wird gezeigt, dass VP1-Arg[278]<sub>3C</sub>, welches durch 3C aus der P1(E-S)-[278]-Mutante freigesetzt wurde, mit dem durch FXa freigespaltenen VP1<sub>FXa</sub> aus der E-S-Sequenz komigriert. Darüber hinaus komigriert VP1<sub>FXa</sub> mit reifem VP1, welches aus der HAV-infizierten Zellkultur gewonnen wurde (Spur 10-11). Der direkte Vergleich zeigte, dass durch 3C freigespaltenes VP1<sub>3C</sub> aus P1-2A(E-S) (Spur 9) kleiner ist als durch FXa freigespaltenes VP1<sub>FXa</sub> (Spur 8) und reifes VP1 (Spur 10). Diese Daten liefern starke Hinweise darauf, dass FXa in P1-2A(E-S) tatsächlich hinter Arginin an der Position [278] in VP1-2A spaltet.



**Abbildung IV-5: Bestimmung der FXa-Spaltstelle in Wildtyp-VP1-2A**

P1-2A(E-S), P1-2A(E-S)-R[278]M und P1(E-S)-[278] wurden mit P3 koexprimiert, und der lösliche Zellextrakt wurde gemäß Schema mit FXa gedaut. Die Proteine wurden im anti-VP1-Westernblot analysiert. Der Totalextrakt von P1-2A(E-S) +P3-exprimierenden Zellen (Spur 9) und das Lysat von HAV-infizierten Huh-7-Zellen (Spur 10) wurden als Komigrationsstandards aufgetragen. Die Prozessierungsprodukte und der entsprechende Molekulargewichtsmarker sind am linken bzw. rechten Rand markiert. Im Säulendiagramm oberhalb der Spuren 1-6 ist die Antigenitätsmenge (K2-4F2-EIA) der entsprechenden Lysate dargestellt. Die Positivkontrolle stellt das P1-2A(E-S) +P3-Lysat (Spur 9) dar.

## **6B: Partikelbildung der Konstrukte pET11a-HM-P1-2A(E-S)-R[278]M und pET11a-HM-P1(E-S)-[278]**

Wie zuvor beschrieben, wurde auch bei P1-2A(E-S)-R[278]M und P1(E-S)-[278] die Fähigkeit, antigene Strukturen zu bilden, untersucht. Gemäß des Standardprotokolls wurde von den Lysaten der Koexpressionsansätze P1-2A(E-S), P1-2A(E-S)-R[278]M und P1(E-S)-[278] mit P3 der lösliche Extrakt angefertigt. Mit dem K2-4F2-EIA konnte gezeigt werden, dass weder die P1-2A(E-S)-R[278]M-Mutante, noch die P1(E-S)-[278]-Mutante nach Koexpression mit P3 antigene Strukturen bilden (Abb. IV-5, Säulendiagramm). Die Unfähigkeit dieser Konstrukte Partikel zu bilden, ist vermutlich die Ursache für die schlechte Löslichkeit der exprimierten Strukturproteine (Abb. IV-5). Die Ergebnisse bezüglich der Mutante P1(E-S)-[278] bestätigen, dass in der Abwesenheit von 2A die Assemblierung von HAV-Partikeln bereits auf Ebene der Pentamerbildung inhibiert wird (Probst et al., 1999). Die fehlende Assemblierung des P1-2A(E-S)-R[278]M-Konstrukts hingegen ist erstaunlich und weist darauf hin, dass die Aminosäure an Position [278] innerhalb VP1-2A eine dominante Determinante für die HAV-Partikelbildung zu sein scheint.

Da die Expressionsprodukte von P1-2A(E-S)-R[278]M und P1(E-S)-[278] unlöslich waren und keine Antigenität besaßen, kann vermutet werden, dass 2A bzw. die Aminosäuren an oder um die Position [278] in VP1-2A entscheidend die Faltung und damit die Löslichkeit der HAV-Strukturproteine bestimmen. Wie oben gezeigt, ist die spezifische FXa-Spaltung in VP1-2A konformationsabhängig. Aufgrund ihrer Fehlfaltung spaltete FXa in P1-2A(E-S)-R[278]M und in P1(E-S)-[278] nicht zwischen VP1 und 2A sondern an anderen Positionen, und es entstand das für unassemblierte Strukturproteine charakteristische VP1-reaktive Spaltungsmuster.

Die Inhibition der Assemblierung von P1-2A(E-S)-R[278]M ist die Ursache dafür, dass die konformationsabhängige FXa-Spaltung an diesem Konstrukt nicht untersucht werden konnte.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Versuche, dass sich in partikuliertem VP1-2A eine putative, konformationsabhängige FXa-Spaltstelle an Position Arg[278]/Ile[279] befindet. Durch die proteolytische Spaltung an dieser Stelle kommt es zur hocheffizienten Entfernung von 2A an der Oberfläche von HAV-Prokapsiden. Mit Hilfe der P1(E-S)-[278]-Mutante konnte das von Probst et al. (1999) aufgestellte Modell der HAV-Partikelbildung bestätigt werden, welches beinhaltet, dass es in Abwesenheit von 2A nicht

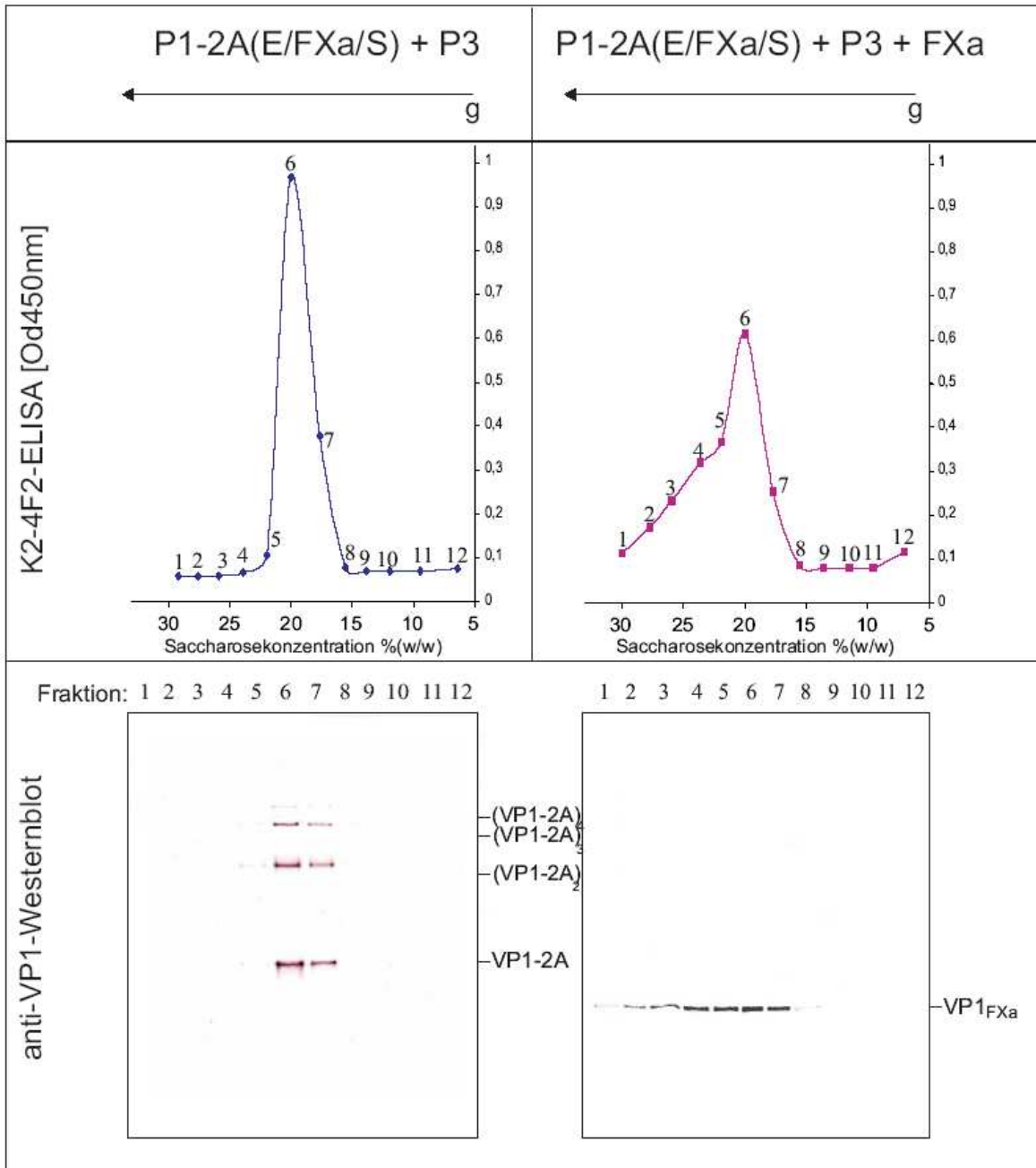
zur Bildung von HAV-Prokapsiden kommt. Erweiternd dazu ist es gelungen, zu zeigen, dass bereits eine Punktmutation an der Position Arg[278] ebenfalls zur Inhibition der HAV-Assemblierung führt. Dies unterstreicht die herausragende Bedeutung der Aminosäure Arginin[278] in VP1-2A für die Partikelbildung von HAV.

## **7: Charakterisierung VP1-2A- und VP1-haltiger HAV-Prokapside durch die Saccharosegradientenzentrifugation**

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass durch Koexpression von P1-2A(E/FXa/S), P1-2A(FXa/S), P1-2A(E/Th/S) und P1-2A(Th/S) mit der viralen Proteinase 3C antigene Strukturen gebildet werden, die von neutralisierenden Antikörpern erkannt werden. In den Arbeiten von Anderson und Probst (Anderson und Ross 1990; Probst et al., 1999) wurde gezeigt, dass das neutralisierende Epitop auf Pentameren, Prokapsiden und reifen Virionen ausgebildet wird, jedoch nicht auf Protomeren, 13S Prokapsiden und ungespaltenen Vorläuferproteinen. Die physikalische Charakterisierung der rekombinanten Expressionsprodukte und die Abhängigkeit der Partikelbildung und -stabilität von der 2A-Anwesenheit war daher von großem Interesse und wurde durch die Saccharosedichtegradientenzentrifugation realisiert. Aufgrund der Antigenität sowie der von der Partikelkonformation abhängigen Sedimentationskonstante ist eine Zuordnung der Partikel zu den natürlich vorkommenden HAV-"Assembly"-Intermediaten und Produkten möglich. Wie im Material- und Methodenteil beschrieben, wurde vom löslichen Zellextrakt nach Koexpression von P1-2A(E/FXa/S), P1-2A(FXa/S) und P1-2A(E-S) mit P3 eine Sedimentationsanalyse vor und nach einem *in vitro*-Verdau mit FXa durchgeführt. Zunächst wurde die exakte Saccharosekonzentration der einzelnen Gradientfraktionen bestimmt. Anschließend wurde jede Fraktion im EIA auf das Vorhandensein von antigenen Strukturen analysiert. Die in den Fraktionen enthaltenen anti-VP1-reaktiven Strukturproteine wurden im Westernblot dargestellt. Die Ergebnisse der FXa-Spaltstelleninsertionsmutante P1-2A(E/FXa/S) und des Wildtypproteins P1-2A(E-S) nach Koexpression mit P3 werden in den Abbildungen IV-6a und IV-6b gezeigt. Es konnte eindeutig dargestellt werden, dass sowohl die VP1-2A-haltigen als auch die 2A-freien Prokapside mit 70S sedimentieren und im genutzten Gradienten bei einer Saccharosekonzentration von ca. 20% (w/w) bandieren (Abb. 11a/b), (Probst et al., 1999). Vor dem FXa-Verdau war im Westernblot der Fraktionen 6 und 7 VP1-2A nachweisbar, welches nach Proteinase-Verdau in VP1 umgewandelt wurde. Die Gesamtantigenität blieb entweder konstant (Abb. IV-6a) oder erhöhte sich nach 2A-Abspaltung vom Wildtyp-

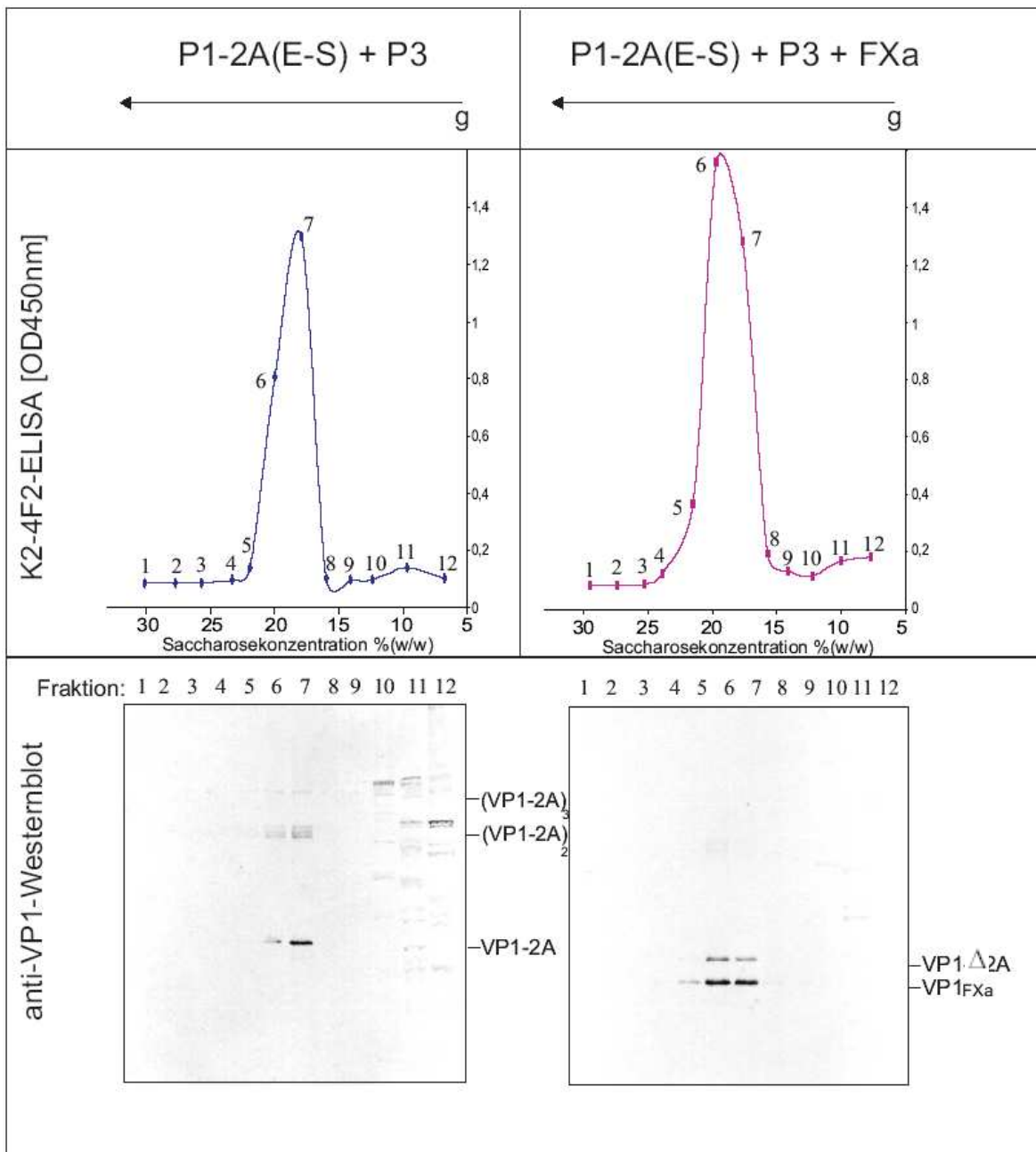
Prokapsid. Das Verhalten der Antigenität nach 2A-Abspaltung von P1-2A(E/FXa/S) ist überraschend, da es stets zu einer Zunahme der EIA-Aktivität nach VP1-2A-Spaltung innerhalb der FXa-Spaltstellenmutanten kam, wenngleich die bereits beschriebenen Schwankungen auftraten. Neben 70S-Prokapsiden bildeten sich bei P1-2A(E/FXa/S) nach 2A-Abspaltung VP1-haltige Partikel mit höherer Sedimentationskonstante (Abb. IV-6a, Fraktionen 1-5). Es ist unklar, ob es sich um Aggregate von 2A-freien Partikeln handelt, die unter anderem auch für die Schwankungen im EIA nach 2A-Abspaltung verantwortlich sein könnten. Es ist denkbar, dass durch die enge Zusammenlagerung der 2A-freien HAV-Partikel das neutralisierende Epitop unterschiedlich gut exponiert wurde. In Abbildung IV-6b, Fraktionen 6 und 7, war das bereits beschriebene VP1-reaktive Protein p38 nachweisbar, welches einen typischen Bestandteil des FXa-Spaltungsmusters assemblierter Proteine darstellt. Die Abwesenheit dieses Proteins und anderer typischer Spaltprodukte in den Fraktionen 6 und 7 der Abbildung IV-6a könnte mit einer eventuell niedrigeren FXa-Enzymkonzentration oder größeren Substratmenge erklärt werden, da höhere Proteinasekonzentrationen zu einer effizienteren Spaltung an alternativen Positionen in HAV-P1-2A führen (Mihalyi et al., 1979; Lemon et al., 1991).

Bemerkenswert war die Anwesenheit von geringen Mengen unprozessierten P1-2A in den Fraktionen 10-12 des Wildtyp-Extrakts, die nach dem FXa-Verdau nicht mehr nachweisbar waren (Abb. IV-6b). Es kann davon ausgegangen werden, dass diese höhermolekularen Proteine Bestandteile von 13S-Pentameren sind, die aus fünf ungespaltenen P1-2A-Vorläufern bestehen und daher K2-4F2-EIA-negativ sind (Anderson et al., 1990).



**Abbildung IV-6a: Analyse von HAV-Prokapsiden mit der P1-2A(E/FXa/S)-Sequenz in der Saccharosegradientenzentrifugation und dem anti-VP1-Westernblot**

Nach der Expression von P1-2A(E/FXa/S) mit P3 wurden die löslichen Extrakte vor und nach FXa-Verdau der Saccharosegradientenzentrifugation zugeführt. Der Gradient wurde in 12 Fraktionen aufgeteilt, die im K2-4F2-EIA und im anti-VP1-Westernblot analysiert wurden. Die Saccharosekonzentration (5-30% w/w) der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt. Die Bezeichnung der Proteine ist am rechten Rand der einzelnen Westernblots aufgetragen.



**Abbildung IV-6b: Analyse von HAV-Prokapsiden vom Wildtyp in der Saccharosegradientenzentrifugation und dem anti-VP1-Westernblot**

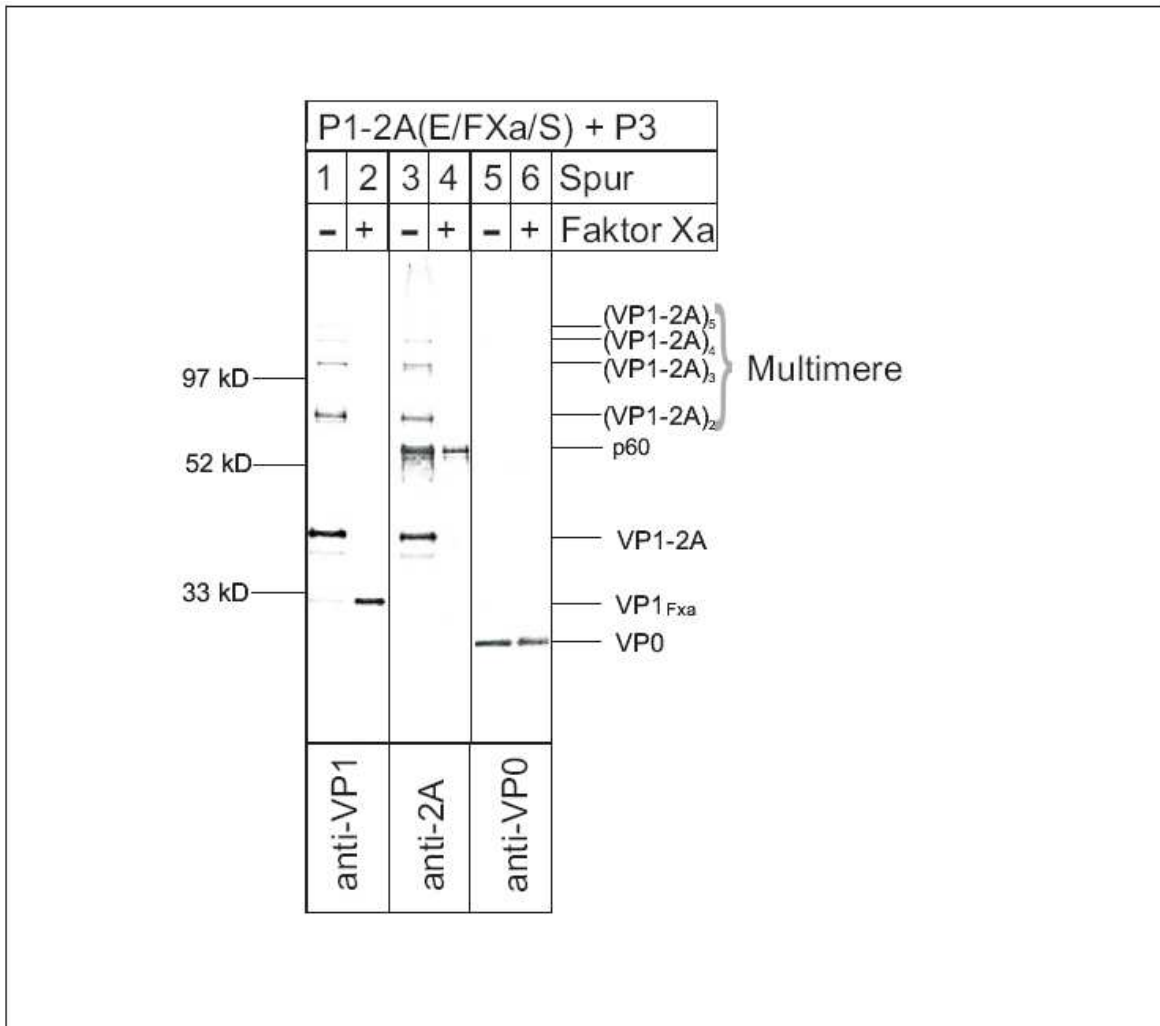
Nach der Expression von P1-2A(E-S) mit P3 wurden die löslichen Extrakte vor und nach FXa-Verdau der Saccharosegradientenzentrifugation zugeführt. Der Gradient wurde in 12 Fraktionen aufgeteilt, die im K2-4F2-EIA und im anti-VP1-Westernblot analysiert wurden. Die Saccharosekonzentration (5-30% w/w) der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt. Die Bezeichnung der Proteine ist am rechten Rand der einzelnen Westernblots aufgetragen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die rekombinant produzierten HAV-Partikel Prokapside sind, deren Hauptstrukturprotein VP1-2A ist. Die Analyse der löslichen Extrakte durch die Saccharosezentrifugation bestätigte die Partikelbildung, die im vorderen Teil der Arbeit aufgrund der K2-4F2-Antigenität angenommen wurde. Durch eine FXa-Behandlung wurde 2A vollständig von der Virusoberfläche entfernt, ohne die Integrität des Prokapsids zu verändern. Somit ist es in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen, rekombinante VP1-2A-haltige HAV-Partikel herzustellen, von denen in vitro durch eine gezielte 2A-Abspaltung homogene VP1-haltige HAV-Partikel abgeleitet werden können. Innerhalb der von P1-2A(E/FXa/S), P1-2A(FXa/S) und P1-2A(E/Th/S) gebildeten Partikel scheint es nach 2A-Abspaltung eine gewisse Instabilität zu geben, die sich u.a. in den Schwankungen der Antigenität im EIA und der Entstehung VP1-haltiger Partikel mit größerer Sedimentationskonstante äußert.

## 8: VP1-2A-Multimere

Neben VP1-2A waren im anti-VP1 Westernblot (Abb. IV-6a/b) der Gradientfraktionen 6 und 7 vor dem Proteinase-Verdau weitere VP1-reaktive Proteine nachweisbar, bei denen es sich aufgrund der Größe nicht um bekannte HAV-Strukturproteine handeln kann. Um diese Polypeptide in ihrer Zusammensetzung genauer zu charakterisieren, wurden die Prokapside im P1-2A(E/FXa/S) +P3-Lysat aus Abbildung IV-6b, Fraktion 6, einem FXa-Verdau unterworfen und die Spaltprodukte vor und nach dem proteolytischen Verdau in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteinbestimmung erfolgte sowohl mit anti-VP1- als auch mit anti-VP0- und anti-2A-Seren. Wie Abbildung IV-7 zeigt, enthielten die 70S-Prokapside vor den Proteinase-Verdau neben VP1-2A mehr als drei weitere größere anti-VP1-reaktive Proteine (Spur 1). Diese höhermolekularen Polypeptide waren auch mit anti-2A Antikörpern in Spur 3 nachweisbar, jedoch aber nicht mit anti-VP0-Antikörpern in Spur 6. Die anti-VP1- und anti-2A-reaktiven Polyproteine sowie VP1-2A waren nach 2A-Abspaltung nicht mehr nachweisbar (Spur 2 und 4). Mit Hilfe des anti-VP1-Serums wurde VP1 nach 2A-Abspaltung nachgewiesen (Spur 2). Im anti-VP0-Westernblot konnte, wie erwartet, vor und nach 2A-Abspaltung ausschließlich VP0 detektiert werden. Weiterhin wurde im anti-2A-Westernblot ein zelluläres Protein detektiert, welches unspezifisch mit den Antikörpern reagierte und kein Substrat von FXa darstellte (Spur 3 und 4).





**Abbildung IV-7: VP1-2A-Multimere in HAV-70S-Prokapsiden**

Die 70S-Prokapside, die sich nach der Expression von P1-2A(E/FXa/S) mit P3 bildeten (Abb. IV-6a, Fraktion 6), wurden mit FXa gedaut und entsprechend des angegebenen Schemas im Westernblot mit anti-VP1-, anti-2A- und anti-VP0-Serum charakterisiert. Die Bezeichnung der immunologisch identifizierten Proteine wurde auf der linken Seite, die entsprechenden Molekulargewichte auf der rechten Seite der Abbildung eingezeichnet.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten und ausschließlich VP1- und 2A-reaktiven Proteinen um VP1-2A-Multimere (Dimer, Trimer, Tetramer und Pentamer) handelt, welche auch noch im denaturierenden SDS-Gel stabil sind. Da diese Multimere nach 2A-Abspaltung nicht mehr nachweisbar sind, muss die Multimerisation 2A-vermittelt sein. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass es sich bei der Domäne 2A im HAV-Strukturprotein VP1-2A um ein wichtiges primäres Assemblysignal handelt. Sie deuten zudem darauf hin, dass 2A an der 5-fach Achse als Stabilisator der HAV-Prokapside während der verzögerten Partikelreifung fungieren könnte.

## **V Diskussion**

### **1 Prozessierung von VP1-2A - Virale Proteinase oder Wirtsproteinase?**

Die Partikelbildung und –reifung stellen den finalen Schritt im viralen Replikationszyklus dar. Beide Prozesse sind von unterschiedlichen viralen und zellulären Faktoren abhängig und finden an verschiedenen Orten innerhalb (oder außerhalb) der Wirtszelle statt. Soweit bekannt, werden die Kapside der Picornaviren durch die Zusammenlagerung der Strukturproteine VP1-VP4 innerhalb der infizierten Zelle gebildet. Die meisten Picornaviren erhalten ihre vollständige Infektiösität während der Reifungsspaltung von VP0 zu VP2 und VP4, ein RNA-abhängiger Prozess, der begleitet wird von einer Konformationsänderung der Kapsidstruktur. Im Fall von HAV jedoch unterscheiden sich die unreifen von den reifen HAV-Partikeln in einem weiteren Punkt, da die unreifen Partikel neben VP0 zusätzlich das Vorläuferprotein von VP1, VP1-2A, enthalten. Jüngst konnte gezeigt werden, dass 2A-freie HAV-Kapside über eine höhere Infektiosität verfügen als VP1-2A-haltige (Cohen et al., 2002). Somit findet innerhalb des HAV-Replikationszyklus neben der VP0-Spaltung eine weitere Reifungsspaltung, namentlich die von VP1-2A zu VP1, statt. Die Frage nach dem genauen Ablauf, der exakten Spaltstellenposition sowie der verantwortlichen Proteinase ist u.a. Mittelpunkt der aktuellen Hepatitis A-Forschung und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Prinzipiell katalysiert die virale Proteinase 3C alle proteolytischen Spaltungen innerhalb des HAV-Polyproteins (Kusov et al., 1992<sub>a</sub>; Jia et al., 1991; Schultheiss et al., 1994; Schultheiss et al., 1995; Martin et al., 1995; Gosert et al., 1996). Ausgenommen sind die „beiden“ Reifungsspaltungen, die 3C-unabhängig sind. Bei der Prozessierung von VP0 zu VP2 und VP4 handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen RNA-abhängigen autoproteolytischen Prozess. Dieser Mechanismus wurde kürzlich auch für ein Tetravirus vorgeschlagen (Taylor et al., 2002). Die zweite Reifungsspaltung von VP1-2A zu reifem VP1 ist ebenfalls in ihren Einzelheiten unbekannt. Da HAV-2A, im Gegensatz zu den übrigen Picornaviren, keine Proteinasefunktion besitzt, kommt für diese Spaltung neben 3C nur eine Wirtsproteinase in Betracht.

Zunächst wurde versucht, den C-Terminus von VP1 anhand von Homologien zu anderen Picornaviren (Cohen et al., 1987; Paul et al., 1987) sowie anhand der Präsenz von potentiellen 3C-Spaltstellen in der Region (Palmenberg 1990; Jewell et al., 1992) zu bestimmen. Dabei kamen unter anderem die Positionen Gln[254]/Ser[255],

Glu[273]/[Ser[274] sowie Glu[285]/Ser[286] in VP1-2A (Abb. III-1b), bezogen auf das Genom des HAV-Stammes HAS15, in VP1-2A als Spaltstellen für die virale Proteinase in Betracht. Dotzauer et al. (1995) und Probst et al. (1997) bestätigten die 3C-vermittelte VP1-2A-Spaltung und zeigten in Komigrationsstudien und vergleichenden Analysen von HAV-Stämmen, welche die Sequenzen Glu[273]/Ser[274] bzw. Val[273]/Ser[274] in VP1-2A trugen, dass in unmittelbarer Umgebung der Position [273] der C-Terminus von VP1 lokalisiert ist. Es zeigte sich, dass die E-S-Sequenz ein geeigneteres Substrat für die virale Proteinase darstellt als die V-S-Sequenz, die ebenfalls, jedoch wesentlich ineffizienter, prozessiert wird (Probst et al., 1999).

Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. IV-1, Spuren 5-6). Erweiternd dazu wurde die Spaltbarkeit der V-T-Sequenz, welche nicht der 3C-Konsensussequenz entspricht, an der Position [273]/[274] geprüft. Auch diese Sequenz war 3C-spaltbar. Die beobachtete Spaltungsaktivität von 3C war mit der in der V-S-Sequenz vergleichbar (Abb. IV-1, Spur 4). Das durch 3C freigespaltene VP1<sub>3C</sub> war bei allen drei Proteinsequenzen nur in geringen Mengen Bestandteil des löslichen Extrakts, der fast ausschließlich assemblierte HAV-Prokapside oder Pentamere enthielt (Abb. IV-1, Spur 9-11). Im Rahmen dieser Studie konnten keine Verfahren etabliert werden, mit denen das durch die virale Proteinase freigespaltene VP1<sub>3C</sub> in Lösung gebracht werden konnte. Alle verfügbaren Daten weisen darauf hin, dass VP1<sub>3C</sub> nicht Bestandteil intakter HAV-Prokapside ist. Die vorliegenden Ergebnisse geben Anlass zu der Spekulation, dass VP1<sub>3C</sub> das Produkt aberranter 3C-Spaltung innerhalb des HAV-Vorläuferproteins P1-2A ist und durch seine unassemblierte Fehlfaltung nicht in Lösung gebracht werden kann.

Aufgrund der biochemischen Ähnlichkeit der Aminosäuren Serin und Threonin ist es nicht überraschend, dass sich die V-S- und die V-T-Sequenz als ähnlich ungeeignete Substrate für 3C erweisen. Die unterschiedliche Effizienz der Prozessierung von VP1-2A mit verschiedenen Sequenzen an Position [273]/[274] spricht einerseits für eine 3C-vermittelte Spaltung an dieser Stelle oder in ihrer unmittelbaren Umgebung und andererseits für eine relativ geringe Substratspezifität von 3C. Anderen Arbeitsgruppen (Graff et al., 1999; Martin et al., 1999), die eine Beteiligung von 3C an der VP1-2A-Spaltung ausschließen, war es nicht gelungen, durch 3C generiertes VP1 im rekombinanten System nachzuweisen. Dieser negative Befund ist möglicherweise bedingt durch die vergleichsweise geringere Transfektions- und Proteinsyntheserate des eingesetzten transienten Expressionssystems (BS-C-1-Zellen) sowie die Verwendung des als schlecht spaltbar beschriebenen V-S-Substrates. Auf der anderen Seite wurde ausschließlich die

PBS-TW-lösliche Proteinfraktion analysiert, von der hier gezeigt wurde, dass sie kein VP1<sub>3C</sub> enthält.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten deuten stark darauf hin, dass die virale Proteinase prinzipiell in der Lage ist, zwischen VP1 und 2A zu prozessieren. Die genutzte Spaltstelle liegt höchstwahrscheinlich an der Position Glu[273]/Ser[274]. Die Tatsache, dass das durch 3C freigespaltene VP1<sub>3C</sub> überwiegend nicht Bestandteil assemblierter HAV-Prokapside ist, deutet an, dass die virale Proteinase nicht in der Lage ist, effizient partikuliertes VP1-2A zu spalten. Um diese These zu überprüfen, müssen in weiterführenden Experimenten aufgereinigte 70S-HAV-Prokapside mit gut charakterisierter 3C-Proteinase *in vitro* inkubiert werden.

Die in Abbildung IV-3, Spur 4, dargestellten Ergebnisse zeigen klar, dass 2A nicht nur aus den mutierten Prokapsiden (P1-2A(E/FXa/S) und P1-2A(FXa/S)) sondern auch aus Wildtyp-Prokapsiden (P1-2A(E-S)) durch die Proteinase FXa freigesetzt wurde. Dies bestätigt die These, dass für eine FXa-Aktivität die beschriebene Konsensussequenz nicht unabdingbare Voraussetzung ist. Es ist bekannt, dass FXa in der Lage ist, hinter basischen Aminosäuren, wie z.B. Arginin, in Abhängigkeit von deren sterischer Zugänglichkeit zu spalten. Basierend auf Komigrationsstudien (Abb. IV-5) wird davon ausgegangen, dass FXa an Position Arg[278] im partikulierten VP1-2A prozessiert. Das aus der Wildtypsequenz freigespaltene VP1<sub>FXa</sub> komigrierte mit reifem VP1, welches in der infizierten Zellkultur produziert wurde (Abb. IV-5, Spur 10-11). Mit Hilfe der Saccharosegradientenzentrifugation konnte sichergestellt werden, dass das durch FXa freigespaltene VP1<sub>FXa</sub> Bestandteil korrekt assemblierter HAV-Partikel ist (Abb. IV-6a).

Die Erkenntnis, dass neben der viralen Proteinase eine andere Wirtszellproteinase in der Lage ist, spezifisch proteolytisch zwischen VP1 und 2A zu spalten, wirft ein neues Licht auf die derzeitige Diskussion zur VP1-Reifung. Obwohl die 3C-vermittelte, jedoch inkomplette, Spaltung von VP1-2A hier direkt gezeigt wurde, sprechen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten für die Beteiligung einer Wirtszellproteinase bei der HAV-Kapsidreifung *in vivo*. Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, dass nur FXa in der Lage ist, innerhalb assemblierter Strukturen zu spalten, während das durch die virale Proteinase freigesetzte VP1<sub>3C</sub> kein Teilprotein von 70S-Prokapsiden darstellt. Außerdem wurde anhand von Komigrationsstudien nachgewiesen, dass VP1<sub>3C</sub> kleiner ist als VP1 innerhalb reifer HAV-Partikel (Abb. IV-5, Spur 9-10).

Kürzlich wurde die C-terminale Sequenz von VP1 veröffentlicht, das Bestandteil zellassoziierter HAV-Partikel war (Graff et al., 1999). Es konnten multiple C-terminale

Aminosäuren bestimmt und Glu[273] als möglicher Terminus bestätigt werden. Als weitere VP1-Termini wurden Thr[272] bzw. Ser[274] nachgewiesen. Im Fall eines HAV-Isolates mit der V-S-Sequenz wurden Thr[272] und Ser[274] als C-Terminus von VP1 bestimmt. Bei beiden Sequenzanalysen wurde Ser[274] als häufigste Aminosäure detektiert. Graff et al. (1999) schlussfolgerten aus dieser Aminosäureheterogenität am C-Terminus von reifem VP1, dass 3C nicht für die Spaltung zwischen VP1 und 2A verantwortlich sein könne, weil für HAV-3C die Generierung heterogener Spaltstellen bisher nicht beschrieben wurde. Andererseits entsprechen die von Graff genannten Aminosäuren auch nicht der FXa-Konsensussequenz bzw. der indirekt bestimmten FXa-Spaltstelle an Position Arg[278]/[Ile[279]. Da FXa befähigt ist, 2A nach abgeschlossener Partikelbildung aus HAV-Prokapsiden zu entfernen, kann davon ausgegangen werden, dass die VP1-2A-Spaltstellenregion an der HAV-Partikeloberfläche positioniert ist. Es ist naheliegend anzunehmen, dass der durch FXa- bzw. durch eine andere Wirtspoteinase freigespaltene VP1-C-Terminus anschließend durch Carboxypeptidasen „getrimmt“ wird, und somit die Heterogenität des VP1-C-Terminus verursacht wird. Der Nachweis VP1-reaktiver Proteine mit variablen molekularen Massen, die zwischen denen von VP1 und VP1-2A liegen, gelang bereits anderen Arbeitsgruppen (Anderson und Ross 1990; Cho und Ehrenfeld 1991; Updike et al., 1991; Kusov et al., 1992<sub>b</sub>; Jia et al., 1993; Dotzauer et al., 1995; Schultheiss et al., 1995; Graff et al., 1999) und untermauert diese These. Die Existenz dieser Proteine war abhängig vom genutzten Expressionssystem sowie dem verwendeten HAV-Stamm (Dotzauer et al. 1995; Harmon et al., 1995), was indirekt auf die Rolle einer Wirtspoteinase bei der VP1-Reifung hinweisen könnte. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein Protein detektiert, dessen molekulare Masse größer als die von VP1 und kleiner als die von VP1-2A ist (siehe VP1- $\Delta$ 2A, Abb. IV-3, Spur 4). Interessanterweise konnte ebenfalls für das Mengovirus, ein Vertreter der Gattung *Cardioviren* innerhalb der Familie der *Picornaviren*, die Existenz von heterogenen VP1-C-Termini nachgewiesen werden (Boege und Scraba, 1989). Durch Kristallstrukturanalyse wurde klar gezeigt, dass der VP1-C-Terminus des Mengovirus an der Partikeloberfläche positioniert ist (Krishnaswamy und Rossmann, 1990) und daher für Wirtspoteinasen bzw. Carboxypeptidasen zugänglich wäre.

Auch wenn die FXa-vermittelte Abspaltung von 2A aus rekombinanten HAV-Prokapsiden sehr effizient ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beschriebenen VP1-reaktiven Proteine auch durch die virale Proteinase generiert wurden. Der Befund, dass 3C partiell die theoretisch sehr schlechte (Jewell et al., 1992) V-T-Spaltstelle

prozessiert, läßt den Analogieschluss zu, dass 3C auch an anderen suboptimalen Spaltstellen schneiden kann. Die Nutzung der alternativen Spaltstellen ist abhängig von deren sterischer Zugänglichkeit und Primärstruktur. Eine hohe Sensitivität des Detektionssystems, gekoppelt mit einer starken Expression des zu analysierenden Antigens ist notwendig für die Detektion der Produkte seltener Spaltungsreaktionen. Es ist unklar, ob diese seltenen Proteine eine biologische Funktion erfüllen oder "Abfallprodukte" der Prozessierung darstellen. Es ist vorstellbar, dass sie durch Degradation fehlgefalteter Vorläuferproteine entstanden sind.

## **2 Die Bedeutung der leberspezifischen Replikation für das Hepatitis A Virus unter Berücksichtigung der Beteiligung einer Wirtszellproteinase**

Der maßgebliche Replikationsort eines Virus befindet sich in einem Gewebe, welches entlang des Infektionswegs lokalisiert ist. So gelangen z.B. Polioviren nach der oralen Aufnahme in den Magen-Darm-Trakt, wo sie sich in den Intestinalzellen vermehren. Am Replikationsort werden große Mengen von Virusnachkommen produziert, welche, nachdem sie ausgeschieden wurden, den Infektionszyklus schließen. Die Reproduktion an einem Ort innerhalb des natürlichen Infektionswegs garantiert dem Virus eine ausreichende Anzahl an Nachkommen. Ähnlich wie die Enteroviren wird HAV über den fäkal-oralen Infektionsweg übertragen. Jedoch repliziert HAV nicht auf seinem natürlichen Infektionsweg durch den Körper. Nach Aufnahme durch die Dünndarmzellen gelangt das Virus in die Leber, dem bislang einzigen nachgewiesenen Replikationsort. Die Mechanismen, derer sich HAV bedient, um aus dem Intestinaltrakt mit dem Blutstrom in die Leber transportiert und dort von den Hepatozyten aufgenommen zu werden, sind bislang unbekannt. Dotzauer et al. (2002) vermuten, dass HAV im Darm mit spezifischem IgA komplexiert und diese Komplexe über ein spezielles Transportsystem von der Leberzelle aufgenommen werden und damit den Infektionszyklus in der Leber beginnen. Nach abgeschlossener Kapsidreifung gelangt das Virus über die Gallesekretion zurück in den Intestinaltrakt, über den es ausgeschieden wird. Warum „wählt“ HAV diesen Umweg über die Leber? Welche Faktoren benötigt es für eine erfolgreiche Replikation, die in anderen Geweben des menschlichen Organismus im Gegensatz zur Leber abwesend sind?

Die in der vorliegenden Arbeit erlangte Erkenntnis, dass die Wirtszellproteinase FXa in der Lage ist, die Domäne 2A des HAV-Strukturproteins VP1-2A im unreifen Prokapsid spezifisch proteolytisch abzuspalten, ist bemerkenswert vor dem Hintergrund der

leberspezifischen HAV-Replikation. FXa wird als Mitglied der Vitamin K-abhängigen Serin-Proteinase der Prothrombinfamilie und als Bestandteil der Gerinnungskaskade ausschließlich von Hepatozyten zunächst in Form des inaktiven Vorläufers FX synthetisiert. Nach der Ausschleusung aus den Hepatozyten wird FX intravasal durch Proteolyse von anderen Komponenten des extrinsischen (Faktor VIIa, Gewebethromboplastin) sowie des intrinsischen (Faktor IXa, Faktor VIIIa) Gerinnungssystems zu FXa aktiviert.

Bereits für Paramyxo- und Orthomyxoviren konnte ein FXa-abhängiger Wirtszelltropismus gezeigt werden (Gotoh et al., 1990; Ogasawara et al., 1992). Dort spaltet FXa spezifisch in einem Oberflächen-Glykoprotein des Virus, welches dadurch aktiviert wird und die Fusion zwischen der viralen Hülle und der Wirtszellmembran vermittelt. Ähnlich wie im HAV-Strukturprotein VP1-2A weist auch dort die Zielsequenz ein einzelnes Arginin auf (Suzuki et al., 1991). Die Tatsache, dass FXa innerhalb von assembliertem VP1-2A hocheffizient spaltet, stützt die These, dass diese oder eine andere ähnliche Wirtszellproteinase für die leberspezifische HAV-Replikation verantwortlich und somit unverzichtbar ist. Da FXa sowie andere Wirtszellproteinasen nur extrazellulär aktiv sind, liefern die Daten neue Hinweise auf eine eventuelle extrazelluläre Kapsidreifung bei HAV. Diese Annahme wird untermauert durch den Nachweis von VP1-2A-haltigen Pre-Propovirionen im Überstand einer mit HAV-infizierten Zellkultur (Bishop und Anderson, 1997). Dies würde bedeuten, dass die Ausschleusung des Virus aus der Wirtszelle und die Virusreifung durch die Abspaltung des primären Assemblierungssignals 2A sowohl zeitlich als auch örtlich unabhängig voneinander sind. In diesem Zusammenhang findet sich ausreichend Anlass für frühere Spekulationen über die Beteiligung von 2A am Austritt von HAV aus den Hepatozyten (Harmon et al., 1995), ein Prozess, der bis heute nicht aufgeklärt wurde. Nicht nur die Reifung durch eine eukaryotische Proteinase sondern auch der Extrazellularraum als Ort der Reifung sind somit weitere Eigenschaften, durch die sich HAV möglicherweise von den übrigen Picornaviren abheben würde.

Im Gegensatz zu den meisten Picornaviren repliziert HAV in der Zellkultur sehr langsam, ohne einen zytopathogenen Effekt zu bewirken (Glass und Summers, 1993). Obwohl nicht sicher ist, ob sich HAV im infizierten Organismus ähnlich verhält, wurde die Abwesenheit eines zytopathogenen Effektes mit dem Umstand erklärt, dass das Virus für seine Ausbreitung auf die intakte Gallesekretion der Hepatozyten angewiesen ist (Lemon et al., 1992). Dies mag sicher eine mögliche Erklärung sein. Darüber hinaus könnte jedoch auch die anzunehmende Abhängigkeit der HAV-Replikation von der Anwesenheit einer



Wirtszellproteinase, wie z.B. FXa, ein weiterer Grund dafür sein, dass die Virusreifung und –verbreitung ohne Lyse der HAV-infizierten Wirtszelle stattfinden.

Von experimentell genutzten Zelllinien nicht-hepatischen Ursprungs ist wenig über deren Fähigkeit zur Synthese von FXa oder Proteinase mit ähnlicher Spezifität bekannt. Auf jeden Fall scheint die Aktivität von FXa oder anderen eukaryotischen Proteinase von den in dieser Studie genutzten Affennierenzellen (COS-7-Zellen) nicht ausreichend zu sein, da sie nicht in der Lage waren, während der transienten Expression 2A entweder von mutierten oder Wildtyp-Kapsiden abzuspalten (siehe Abb. IV-2, Spur 1-4 und Abb. IV-3, Spur 1-3). Auch während der transienten Expression in Leberzellen (Huh7-Zellen) erfolgte keine VP1-Reifung (Gauss-Müller et al., unveröffentlichte Daten). Da jedoch in infizierten Huh7-Zellen, in welchen der vollständige virale Infektionszyklus durchlaufen wird, reife VP1-haltige HAV-Partikel entstehen (Graff et al., 1999; Martin et al., 1999), kann vermutet werden, dass, ähnlich wie bei der VP0-Reifungsspaltung, 2A nur von RNA-tragenden Kapsiden abgespalten werden kann. Denkbar wäre außerdem, dass die 2A-Abspaltung nur extrazellulär sehr effizient erfolgt, da 2A neben der Kapsidassemblierung weitere Funktionen innerhalb des Replikationszyklus erfüllt und eine Abspaltung im Zytoplasma verhindert bzw. verzögert wird. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, den Zellüberstand der infizierten Zellkultur, der normalerweise vor dem Zellaufschluss verworfen wird, in zukünftigen Experimenten auf das Vorhandensein von HAV-Virionen und entsprechenden Wirtszellproteinase zu überprüfen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in vivo eine andere Proteinase als FXa für die Reifung von HAV verantwortlich ist, zumal die Aminosäuresequenz an Position [278] in VP1-2A nicht sehr spezifisch ist. Für Trypsin und Chymotrypsin, beides Proteinase mit ähnlicher proteolytischer Spezifität, wurde gezeigt, dass sie 2A von Prokapsiden entfernen können (Gauss-Müller et al., unveröffentlichte Daten). Es wird abzuwarten sein, ob auch die ubiquitär vorkommenden lysosomalen Proteinase (z.B. Cathepsine oder Furin) 2A spezifisch von der Oberfläche von HAV-Prokapsiden abspalten. Interessant wäre es, durch Experimente mit FXa-„knock out“-Zellen oder spezifischen Proteinaseinhibitoren festzustellen, inwiefern die HAV-Kapsidreifung in der infizierten Leberzellkultur tatsächlich von der Anwesenheit FXa's oder anderer Wirtszellproteinase abhängig ist. Weiterhin müsste untersucht werden, ob die virale Proteinase 3C oder andere HAV-Komponenten in der Lage sind, den Vorläufer FX zu FXa intrazellulär zu aktivieren, oder aber ob im Kulturmedium aktiviertes FXa enthalten ist. Die Abhängigkeit der HAV-Partikelsynthese von Wirtszellproteinase bietet darüber hinaus interessante Ansatzpunkte

für die Verbesserung der derzeit ineffizienten Anzucht einer HAV-Vakzinie in der Säugerzellkultur sowie für die Entwicklung einer zur Zeit nicht vorhandenen antiviralen Therapie.

### **3 Homogene rekombinante HAV-Partikel vor und nach 2A-Abspaltung**

Das reife HAV-Kapsid wird von den Strukturproteinen VP1, VP2, VP3 sowie VP4 gebildet, die durch Prozessierung aus dem Vorläufer P1-2A freigesetzt werden. Während der Prozessierung und Partikelbildung werden unterschiedliche Assemblierungsstadien durchlaufen. Aufgrund der Antigenität im EIA sowie des von der Partikelkonformation abhängigen Sedimentationsverhaltens im Saccharosegradienten (Sedimentationskonstante) ist eine Zuordnung der antigenen Strukturen zu den natürlich vorkommenden HAV-Assemblierungsintermediaten und -produkten möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle im rekombinanten System exprimierten HAV-Konstrukte auf ihre Fähigkeit zur Assemblierung und zur Ausbildung des neutralisierenden Epitops untersucht. Für alle P1-2A-Mutanten mit eingefügter Spaltstellensequenz konnte nach Koexpression mit P3 die Bildung von 70S-Prokapsiden nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Wildtypsequenz wiesen diese Prokapside eine geringere Antigenität auf (Abb. IV-2). Hierfür kommen mehrere Gründe in Betracht. Zum einen ist es möglich, dass die veränderten oder zusätzlich eingefügten Aminosäuren direkt oder indirekt die Bildung des konformationsabhängigen Epitops unterbinden. Die Beteiligung von Aminosäuren in VP3 und VP1 bei der Bildung des Neutralisationsepitops wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt (Ping et al., 1988; Ping und Lemon 1992; Bosch et al., 1998; Khudyakov et al., 1999). Bisher wurde jedoch nicht von einer direkten Beteiligung des C-Terminus von VP1 am neutralisierenden Epitop berichtet. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch Einfügen zusätzlicher Aminosäuren am C-Terminus von VP1 die Partikelkonformation so verändert wird, dass die Ausbildung des K2-4F2-Epitops beeinträchtigt wird, und dies zu einer Senkung der spezifischen Antigenität dieser Partikel führt.

Im Gegensatz zu den Wildtyp-Prokapsiden wurde in Partikeln mit eingefügten FXa- bzw. Thrombinkonsensussequenzen die 3C-vermittelte Spaltung zwischen VP1 und 2A vollständig verhindert (Abb. IV-2, Spur 1-4). Die neuen Konstrukte eröffneten die Möglichkeit, durch den gezielten Verdau mit der entsprechenden Proteinase das Teilprotein 2A kontrolliert und hocheffektiv von HAV-Prokapsiden abzuspalten (Abb. IV-2, 5-8). Auf diesem Weg gelang es, homogene VP1-haltige HAV-Prokapside im

rekombinanten System herzustellen (Abb. IV-6a). Dies war bisher im rekombinanten System, trotz der fehlenden Reifungsspaltung (VP0 -> VP2 und VP4) und des daher homogenen VP0-Gehalts, aufgrund der ineffizienten VP1-2A Spaltung nicht möglich. Auch aus den Inokulaten HAV-infizierter Zellen konnte, trotz vollständiger VP1-Reifung, lediglich eine Mischung inhomogener HAV-Partikel (Virionen und Provirionen) gewonnen werden, die auf die verzögerte Reifungsspaltung von VP0 zu VP2 und VP4 zurückzuführen ist (Bishop und Anderson 1993). Die Inhomogenität der bisher zur Verfügung stehenden HAV-Partikel ist ein möglicher Grund für vergangene erfolglose Kristallisationsversuche (Probst et al., 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit darstellbaren 2A-freien bzw. 2A-haltigen rekombinanten HAV-Prokapside besitzen gegenüber dem aktuellen Stand der Technik eine wesentlich höhere Homogenität in Bezug auf ihre Proteinzusammensetzung und sind daher als gute Kandidaten für zukünftige 3D-Strukturaufklärung anzusehen.

2A-freie Prokapside zeigen eine höhere spezifische Antigenität als Partikel, die an ihrer Oberfläche 2A tragen (Abb. IV-2). Dies beweist einerseits, dass 2A kein Bestandteil des neutralisierenden Epitops ist, andererseits scheint 2A das Neutralisationsepitop partiell zu maskieren. Eine weitere Ursache für die Antigenitätssteigerung der Prokapside nach 2A-Abspaltung könnte sein, dass durch die 2A-Abspaltung eine Konformationsänderung der Strukturproteine induziert wird (Bishop und Anderson 1993, 1997; Smyth et al., 2000), die zur Steigerung der spezifischen Antigenität der HAV-Prokapside führt. Die Zunahme der Antigenität, die im Rahmen unserer Versuche gemessen wurde, war großen Schwankungen unterworfen, wenn unterschiedliche Koexpressionsansätze verglichen wurden. Diese Beobachtung traf vor allem auf die P1-2A-Mutanten mit eingefügter Spaltstellensequenz zu. Trotz umfangreichster Untersuchungen und Stabilitätstestungen konnte die Ursache für diese großen Abweichungen nicht identifiziert werden. Die im Antigenitätstest sowie in der Gradientenzentrifugation gewonnenen Daten deuten auf eine „Instabilität“ der HAV-Partikel nach 2A-Abspaltung hin. Dies zeigte sich qualitativ darin, dass P1-2A(E/FXa/S) nach 2A-Abspaltung neben 70S-Prokapsiden zusätzliche Partikel mit größerer Sedimentationskonstante bildete (Abb. IV-6a, Fraktion 1-5). Als Ursache kann die Bildung von Aggregaten aus 2A-freien Prokapsiden vermutet werden. Diese unkontrollierte und in ihrem Ausmaß nicht beeinflussbare Aggregation der Partikel könnte zur Folge haben, dass weniger antigenes Epitop präsentiert wird und somit die Antigenität trotz 2A-Abspaltung nicht immer um den gleichen Wert zunimmt, sondern entsprechend der Aggregationsstärke schwankt.

## **4 HAV-Partikelscreening mit Hilfe des FXa-Verdaus**

Neben der konformationsabhängigen und spezifischen Abspaltung von 2A spaltet FXa unterschiedlich effizient an anderen Positionen innerhalb der Strukturproteine. Das Ausmaß dieser „alternativen“ Spaltungen ist abhängig von der Enzymkonzentration (Abb. III-2, Proteinase-Verdau), der Substratkonzentration und der Dauer des Enzymverdaus (Mihalyi et al., 1979; Lemon et al., 1991) sowie der Konformation der Kapsidproteine. Innerhalb partikulierter HAV-Strukturproteine spaltet FXa an verschiedenen Positionen, die sich von den FXa-Spaltstellen innerhalb nicht partikulierter Proteine unterscheiden. Während aus 70S-Prokapsiden vor allem reifes VP1 und ein Protein mit einer Größe von 38 kD freigespalten werden, können diese Proteine im VP1-Spaltungsmuster nicht partikulierter HAV-Proteine nicht gefunden werden (Abb. IV-4). Vielmehr ist ein VP1-reaktives Spaltprodukt von 28 kD typisch, das nicht Produkt der konformationsabhängigen Spaltung ist. Basierend auf diesen unterschiedlichen FXa-Spaltungsmustern ist es möglich, z.B. im Rahmen eines Screeningverfahrens schnell und zuverlässig zwischen assemblierten und fehlgefalteten HAV-Strukturproteinen zu differenzieren.

## **5 Die Rolle von 2A im HAV-Replikationszyklus**

### **5.1 Lage und Flexibilität von 2A im HAV-Prokapsid**

HAV-2A wird zusammen mit dem Strukturvorläuferprotein P1 aus dem HAV-Polyprotein freigespalten und stellt die C-terminale Domäne von VP1 unreifer Viruskapside dar. In der vorliegenden Arbeit gelang es, durch einen in vitro FXa-Verdau 2A gezielt und hocheffizient aus VP1-2A-haltigen HAV-Prokapsiden abzuspalten (Abb. IV-3). Analysen mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie (Beneduce et al., 2002) und die vorliegenden Daten unterstützen die These, dass 2A sowie auch die VP1-2A-Spaltstellenregion an der Oberfläche der HAV-Kapside exponiert und damit zugänglich für eukaryotische Proteinasen sind (Probst et al., 1999). Im Rahmen von Antigenitätstests konnte hier gezeigt werden, dass es nach 2A-Abspaltung stets zu einer Zunahme der Antigenität der Prokapside kommt (Abb. IV-2, IV-3). Aufgrund seiner im Vergleich zu den übrigen Picornaviren außergewöhnlichen Größe (71 Aminosäuren) kann angenommen werden, dass 2A die optimale Präsentation des neutralisierenden Epitops im Prokapsid vor seiner Abspaltung verhindert.

Die Flexibilität der 2A-Domäne gegenüber Fremdepitopen aus bis zu sieben Aminosäuren (Beneduce et al., 2002) und gegenüber Deletionen von 10 oder 15 Aminosäuren (Harmon et al., 1995) steht im strengen Gegensatz zu der Unfähigkeit von P1-2A(E-S)-R[278]M zu assemblieren, obwohl nur eine Aminosäure in VP1-2A ausgetauscht wurde. Dieses Ergebnis deutet an, dass es sich bei der Position Arg[278] um eine dominante Determinante in 2A handelt, die sowohl bei der Partikelbildung als auch bei der Partikelreifung eine bedeutende Rolle spielt.

Eine Toleranz gegenüber fremden Aminosäuresequenzen konnte in dieser Arbeit auch für die VP1-2A-Spaltstellenregion anhand der erfolgreichen Insertion bzw. Substitution von bis zu fünf Aminosäuren nachgewiesen werden. Darüber hinaus besaßen die viralen Expressionsprodukte infektiöser HAV-Vollängen-cDNA, welche die FXa- bzw. Thrombinspaltstellensequenz in VP1-2A enthielten, die vollständige Infektiösität im Vergleich zu HAV-Wildtyp-Viren (Rachow et al., 2003). Diese Resultate beweisen, dass Insertionen sowie Substitutionen von Aminosäuren in der VP1-2A-Domäne weder die Proteinprozessierung und Partikelassemblierung von HAV verhindern noch andere Prozesse des viralen Replikationszyklus wie z.B. Ein- bzw. Ausschleusung der infektiösen Erreger in oder aus der Wirtszelle beeinträchtigen.

Zur Zeit besteht ein beträchtliches Interesse an der Entwicklung von „Carrier“-Systemen, die mit einer anderen antigenen Peptidsequenz fusioniert werden und somit zwei verschiedene Epitope präsentieren. Auch unterschiedliche Mitglieder aus der Familie der Picornaviren wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, als Vektor für ein fremdes Gen zu fungieren (Altmeyer et al., 1995; Arnold et al., 1996; Obuchi et al., 1999, Beneduce et al., 2002). Beneduce und Mitarbeitern ist es gelungen, ein infektiöses, chimäres HAV-Partikel zu synthetisieren, welches sowohl die Bildung von HAV-Antikörpern als auch von gp41-Antikörpern generierte. Das HIV-1-Hüllprotein gp41 wurde durch sieben Aminosäuren, die in die zentrale HAV-2A-Region hineinmutiert worden waren, kodiert (Beneduce et al., 2002). Die Tatsache, dass auch 2A und die VP1-2A-Spaltstellenregion flexibel gegenüber der Insertion von Fremdepitopen sind und die Infektiösität dieser mutierten Partikel vollständig erhalten ist, macht HAV zu einem attraktiven Kandidaten für die Verwendung bei der Entwicklung von chimären Impfstoffen.

## **5.2 Funktion von 2A bei der HAV-Kapsidsynthese**

Im Gegensatz zu anderen Picornaviren konnte für HAV-2A keine eigenständige Proteinasenfunktion identifiziert werden (Jia et al., 1991; Kusov et al., 1992<sub>a</sub>). Auch wurde das Protein in freier Form bisher nicht nachgewiesen. Als C-terminaler Anteil des Vorläufers der Strukturproteine, P1-2A, wird 2A für den ersten Schritt der Partikelassemblierung benötigt (Probst et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der P1(E-S)-[278]-Mutante bestätigt, dass die Abwesenheit von 2A im Strukturvorläuferprotein die Bildung von HAV-Prokapsiden verhindert (Abb. IV-5). Basierend auf der Charakterisierung von Deletionsmutanten konnte kürzlich gezeigt werden, dass der N-Terminus von 2A die Pentamerisierung von Strukturproteinen initiiert, während der C-Terminus für die Reifung von VP1 verantwortlich zu sein scheint (Cohen et al., 2002). Cohen und Mitarbeiter zeigten, dass bei einer Deletion des 2A-N-Terminus von 40% die Partikelbildung verhindert ist. Die vorliegenden Daten beweisen, dass allein bei einer Punktmutation an Position [278] in VP1-2A keine Assemblierung von HAV-Prokapsiden möglich ist. Erstaunlich ist, dass sich in HAV-2A an der Position Arg[278]/Ile[279] zusätzlich eine native FXa-Spaltstelle befindet. Dies lässt darauf schließen, dass der Region um Arg[278] innerhalb der N-terminalen Domäne von 2A eine Schlüsselrolle sowohl bei der HAV-Partikelbildung als auch bei der VP1-Reifung zukommt. Weiterführende genetische Analysen sind notwendig, um die für Assemblierung und Kapsidreifung verantwortlichen Aminosäurepositionen genau zu bestimmen.

In ihrer Arbeit haben Cohen et al. (2002) die Frage aufgegriffen, ob 2A direkt oder indirekt die Partikelassemblierung beeinflusst. Anhand der eigenen Daten zeigten sie, dass eine N-terminale Deletion von 2A die 3C-vermittelte Prozessierung im HAV-P1-2A-Strukturvorläuferprotein vor allem an Position VP3/VP1 behindert. Dies werteten sie als Hinweis auf eine eher indirekte Beteiligung von 2A bei der Partikelbildung. Die Daten anderer Arbeitsgruppen und die vorliegenden Ergebnisse deuten in eine andere Richtung: Im Gegensatz zu anderen Picornaviren war es bisher nicht möglich, HAV-Protomere im Saccharosegradienten nachzuweisen (Anderson und Ross 1990). Aufgrund der Existenz von 13S-Pentameren, die von fünf ungespaltenen P1-2A-Molekülen gebildet werden, schlossen Borovec und Mitarbeiter auf eine höchst effektive Pentamerisation der HAV-Strukturproteine, ohne die Ursache dafür näher beschreiben zu können (Borovec und Anderson 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten neben 13S-Pentameren (Abb. IV-6b, Fraktion 10-12) erstmals VP1-2A-Multimere (Abb. IV-2, Spur 1-4, Abb. IV-6a, Fraktionen 6-7; Abb. IV-7) nachgewiesen werden, deren Existenz von der Anwesenheit

von 2A abhängig ist. Diese Multimere besitzen eine außergewöhnliche Stabilität, da sie den denaturierenden und reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE widerstehen. Diese ungewöhnlich starke, durch 2A-vermittelte Zusammenlagerung von VP1-2A könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich das Gleichgewicht der Strukturproteine auf Seiten der höheren Strukturen befindet, und keine P1-2A-Protomere nachgewiesen werden können. Außerdem ist die 2A-vermittelte Pentamerisierung von VP1-2A ein eindeutiger Hinweis auf eine direkte Beteiligung von 2A bei der HAV-Partikelsynthese.

### **5.3 Weitere Funktionen von HAV-2A innerhalb des HAV-Replikationszyklus**

Da 2A im reifen Virion nicht mehr nachweisbar ist, stellt sich die Frage, ob der 2A-Domäne außerhalb der Assemblierung eine weitere Funktion innerhalb des HAV-Replikationszyklus zukommt. Erst nach Vollendung der Kapsidbildung wird 2A vom HAV-Partikel intra- oder extrazellulär abgespalten (Martin et al., 1999; Cohen et al., 2002), wobei neben der Zunahme der Antigenität auch eine Steigerung der Infektiosität der Partikel erreicht wird (Cohen et al., 2002). Für ein spätes VP1-Reifung innerhalb des Replikationszyklus von HAV spricht der Nachweis von VP1-2A-haltigen Prokapsiden und Pre-Providionen (Anderson und Ross 1990, Borovec und Anderson 1993; Bishop und Anderson 1997). Darüber hinaus gelang es Bishop und Anderson (1997) VP1-2A-haltige HAV-Partikel im Überstand einer mit HAV infizierten Zellkultur nachzuweisen. Auch die vorliegenden Daten, wonach die Wirtspolypeptidase FXa in der Lage ist, reifes VP1 aus assemblierten HAV-Prokapsiden vom Wildtyp zu generieren, unterstützen die These einer späten, vielleicht sogar im extrazellulären Raum stattfindenden, 2A-Abspaltung. Dass 2A neben Vermittlung der Partikelassemblierung und der Partikelreifung noch weitere Aufgaben wie z.B. Ausschleusung oder Eindringen der HAV-Partikel aus der bzw. in die Wirtszelle besitzt, ist aufgrund der Datenlage nicht ausgeschlossen. Harmon et al. (1995) zeigten zwar, dass es bei der Deletion von 10-15 Aminosäuren in 2A zu keiner Störung der Partikelsynthese und Ausbildung der Antigenität innerhalb der HAV-Virionen kommt, dennoch konnte im RIFA eine Reduktion der Vermehrungsfähigkeit dieser Viren festgestellt werden. Cohen et al. bestätigten diese Beobachtung 2002. Anhand der Bestimmung der Menge von partikelassoziiierter RNA im Verhältnis zur Anzahl infektiöser Partikel wurde dargestellt, dass 2A-haltige HAV-Partikel eine bis zu fünffach geringere spezifische Infektiosität besaßen als 2A-freie (Cohen et al., 2002). Kürzlich konnte für ein weiteres Picornavirus der Gattung *Cardiovirus* gezeigt werden, dass Deletionen im 2A-Polypeptid zu einer Inhibierung der Ausbreitung des Virus in der Zellkultur sowie im

infizierten natürlichen Wirt führen (Michiels et al., 1997). Da eine HAV-Infektion, im Gegensatz zu der mit den übrigen Picornaviren, nicht zur Lyse der Wirtszelle führt, braucht das Virus eine Funktion, welche die Ausschleusung der neu synthetisierten Virusnachkommen vermittelt, damit die Ausbreitung von HAV im Wirt garantiert wird. Der Nachweis von VP1-2A-haltigen Preprovirionen außerhalb von HAV-infizierten Zellen (Bishop und Anderson 1997), die Anwesenheit von extrazellulären Wirtsproteinasen, die wie z.B. FXa potentiell in der Lage sind, 2A aus den Viruskapsiden abzuspalten, sowie die kürzlich von Harmon sowie Michiels veröffentlichten Daten lassen die Vermutung zu, dass HAV-2A an der Ausschleusung der viralen Partikel aus der Wirtszelle beteiligt sein könnte. Um diese These zu überprüfen, müsste anhand von weiteren 2A-Deletionsmutanten, bei denen Prozessierung und Partikelsynthese fehlerfrei erhalten sind, das Wachstum und die Verbreitung von HAV in der Zellkultur und im natürlichen Wirtsorganismus untersucht werden.

Die Entschlüsselung der Funktionen von HAV-2A ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis des HAV-Replikationszyklus. Die gewonnenen Erkenntnisse, besonders im Bereich der Infektiositätsentwicklung, sind von großer Bedeutung, einerseits für die Entwicklung neuer rekombinanter Impfstoffe, die zur Zeit nur unter hohem materiellen Aufwand und dennoch unbefriedigender Wirksamkeit realisierbar ist, zum anderen für eine etwaige antivirale Therapie der Hepatitis A-Infektion. Die bisherigen Erkenntnisse über den einzigartigen Replikationsmechanismus von HAV und die außergewöhnliche Rolle von 2A bestätigen die gesonderte Position von HAV innerhalb der Familie der Picornaviren.



## VI Zusammenfassung

Das Hepatitis A Virus ist einzigartig unter den Picornaviren insofern, dass die Partikelassemblierung von der Domäne 2A des Strukturvorläuferproteins P1-2A vermittelt wird. Während infizierte Individuen reife HAV-Kapside ausscheiden, in denen VP1 das Hauptstrukturprotein darstellt, ist VP1-2A die Hauptkomponente von unreifen Pre-Provirionen und Prokapsiden, die in der infizierten Zellkultur nachgewiesen wurden. Offensichtlich wird ein Post-Assemblierungs-Schritt innerhalb der HAV-Partikelreifung benötigt, der die Domäne 2A von VP1-2A freispaltet. Die für diese Spaltung verantwortliche Proteinase, die genaue Spaltposition sowie der Ort und die Funktion der 2A-Abspaltung innerhalb des Replikationszyklus von HAV sind nicht bekannt und werden in der Literatur kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit, deren Ergebnisse im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht worden sind (Rachow et al., 2003), wurden in einem rekombinanten System HAV-Prokapside exprimiert, in denen entweder die potentielle Spaltstelle für die virale Proteinase 3C in VP1-2A verändert war oder die Spaltstellenkonsensussequenz von FXa bzw. Thrombin eingefügt wurde. Die Analyse der Kapsidproteine erfolgte im Westernblot, im K2-4F2-EIA und mit Hilfe der Saccharose-Gradientenzentrifugation.

Die 3C-vermittelte Prozessierung zwischen VP1 und 2A konnte bewiesen und damit frühere Ergebnisse bestätigt werden. Allerdings war das freigespaltene VP1<sub>3C</sub> nicht Bestandteil von HAV-Prokapsiden.

Die konformationsabhängige spezifische 2A-Abspaltung durch FXa bzw. Thrombin von rekombinanten HAV-Prokapsiden, welche die entsprechende Konsensussequenz enthielten, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Die entstandenen VP1-haltigen Prokapside stellen homogene HAV-Partikel dar, die erstmals experimentell gewonnen werden konnten, und dürften geeignete Kandidaten für zukünftige Kristallisationsstudien sein. Die Zugänglichkeit für Wirtsproteinasen zeigt, dass die VP1-2A-Spaltstellenregion an der Partikeloberfläche positioniert sein muss. Die vorliegenden Daten beweisen, dass die VP1-2A-Spaltstellenregion flexibel gegenüber Fremdepitopen ist, und HAV potentiell als Vektor bei der Entwicklung chimärer Impfstoffe dienen kann.

Interessanterweise spaltete FXa auch aus HAV-Wildtypkapsiden die Domäne 2A konformationsabhängig und spezifisch frei. Die genutzte Spaltstelle befindet sich vermutlich in der Nähe von Arg[278], ein Bereich von VP1-2A, der ebenfalls als Assemblierungssignal dient. Die FXa-vermittelte Spaltung in assemblierten Strukturproteinen zeigte eine andere Spezifität als in nicht assemblierten Proteinen. Möglicherweise kann der FXa-in vitro-Verdau zukünftig für das Screening von korrekt assemblierten HAV-Prokapsiden genutzt werden. Die hier erzielten Ergebnisse beweisen, dass eine virusfremde Proteinase in der Lage ist, 2A spezifisch und hocheffizient aus HAV-Prokapsiden freizuspalten, und unterstützen die These, dass eine Wirtsproteinase für die Reifung von VP1 verantwortlich ist.

2A-haltige Prokapside zeigten eine geringere spezifische Antigenität als 2A-freie Prokapside. Wahrscheinlich kommt es durch die 2A-Abspaltung erstens zur einer verbesserten räumlichen Zugänglichkeit des neutralisierenden Epitops, und zweitens zu einer Konformationsänderung an der Kapsidoberfläche, welche für die Zunahme der Antigenität der Partikel verantwortlich ist.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass HAV-2A neben der Vermittlung der Partikelassemblierung durch Bildung von P1-2A-Pentameren weitere Funktionen innerhalb des viralen Replikationszyklus erfüllt, wie z.B. die Ausschleusung der Viren aus der Wirtszelle. Die außergewöhnlichen Eigenschaften der Domäne 2A als Bestandteil des unreifen HAV-Kapsids und seine proteolytische Abspaltung von der Partikeloberfläche durch eine Wirtsproteinase bestätigen die gesonderte Stellung von HAV innerhalb der Familie der Picornaviren.

## Literaturverzeichnis

- Altmeyer, R., Girard, M., van der Werf, S., Mimic, V., Seigneur, L., Saron, M. F.:** Attenuated mengovirus: a new vector for live recombinant vaccines. 1995. *J Virol* **69**: 3193-96.
- Anderson, D. A. und Locarni, S.:** Single-cycle growth kinetics of hepatitis A virus in BSC-1 cells. In: Brinton M.A., Rueckert R.R., eds. *Positive strand RNA viruses*. New York: Alan R. Liss, 1987: 497-507.
- Anderson, D. A. und Ross, B. C.:** Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. 1990. *J Virol* **64**: 5284-89.
- Arnold, G. F., Resnick, B. A., Smith, A. D., Geisler, S. C., Holmes, A. K., Arnold, E.:** Chimeric rhinoviruses as tools for vaccine development and characterization of protein epitopes. 1996. *Intervirology* **39**: 72-78.
- Barin, F., Denis, F., Chotard, J., Paulin, R., Chiron, J. P., Mauspas, P., Goudeau, A., Coursaget, P.:** Early asymptomatic hepatitis A in Senegalese children. 1980. *Lancet* **I**: 212-13.
- Basavappa, R., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J. P., Filman, D. J., Hogle, J. M.:** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2,9 Å resolution. 1994. *Protein Sciences* **3**: 1651-69.
- Beneduce, F., Kusov, Y. Y., Klinger, M., Gauss-Muller, V., Morace, G.:** Chimeric hepatitis A virus particles presenting a foreign epitope (HIV gp41) at their surface. 2002. *Antiviral Res* **55**: 369-77.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.:** A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. 1979. *Nucl Acid Res* **7**: 1513.
- Bishop, N. E. und Anderson, D. A.:** RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. 1993. *Virology* **197**: 616-23.
- Bishop, N. E. und Anderson, D. A.:** Hepatitis A virus subviral particles: purification, accumulation, and relative infectivity of virions, provirions and procapsids. 1997. *Arch Virol* **142**: 2147-60.
- Bishop, N. E. und Anderson, D. A.:** Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. 2000. *J Virol* **74**: 3423-26.
- Boege, U. und Scraba, D. G.:** Mengo virus maturation is accompanied by C-terminal modification of capsid protein VP1. 1989. *Virology* **168**: 409-12.
- Borovec, S. V. und Anderson, D. A.:** Synthesis and assembly of hepatitis A virus-specific proteins in BS-C-1 cells. 1993. *J Virol* **67**: 3095-102.

- Bosch, A., Gonzalez-Dankaart, J. F., Haro, I., Gajardo, R., Perez, J. A., Pinto, R. M.:** A new continuous epitope of hepatitis A virus. 1998. *J Med Virol* **54**: 95-102.
- Brenda-The comprehensive Enzyme Information System:** <http://www.brenda.uni-koeln.de>.
- Cho, M. W. und Ehrenfeld, E.:** Rapid completion of the replication cycle of hepatitis A virus subsequent to reversal of guanidine inhibition. 1991. *Virology* **180**: 770-80.
- Chow, M., Newman, J. F., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands, D. J., Brown, F.:** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. 1987. *Nature* **327**: 482-86.
- Cockayne, E. A.:** Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. 1912. *Q J Med* **6**: 1-28.
- Cohen, J. I., Ticehurst, J. R., Feinstone, S. M., Rosenblum, B., Purcell, R. H.:** Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. 1987. *J Virol* **61**: 50-59.
- Cohen, L., Benichou, D., Martin, A.:** Analysis of Deletion Mutants Indicates that the 2A Polypeptide of Hepatitis A Virus Participates in Virion Morphogenesis. 2002. *J Virol* **76**: 7495-505.
- Dotzauer, A., Feinstone, S. M., Kaplan, G.:** Susceptibility of non-primate cell lines to hepatitis A virus infection. 1994. *J Virol* **68**: 6064-68.
- Dotzauer, A., Vallbracht, A., Keil, G. M.:** The proposed gene for VP1 of HAV encodes for a larger protein than that observed in HAV-infected cells and virions. 1995. *Virology* **213**: 671-75.
- Dotzauer, A., Gebhardt, U., Bieback, K., Göttke, U., Kracke, A., Magnes, J., Lemon, S. M., Vallbracht, A.:** Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. 2000. *J Virol* **74**: 10950-57.
- Drake, M. E. und Ming, C.:** Gamma globulin in epidemic hepatitis: Comparative value of two dosage levels, apparently near the minimal effective level. 1994. *JAMA* **155**: 1302-05.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H.:** Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. 1973. *Science* **182**: 1026-28.
- Flehming, B., Vallbracht, A., Wurster, G.:** Hepatitis A in cell culture. III. Propagation of hepatitis A virus in human embryo kidney cells and human embryo fibroblast strain. 1981. *Med Microbiol Immunol* **170**: 83-89.

- Francki, R. I., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., Brown, F.:** Classification and nomenclature of viruses, Fifth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. 1991. *Arch Virol* **2**: 320-26.
- Frings, W. und Dotzauer, A.:** Adaption of primate cell-adapted hepatitis A virus strain HM175 to growth in guinea pig cells is independent of mutations in the 5' nontranslated region. 2001. *J Gen Virol* **82**: 597-602.
- Fuerst, T. R., Nilis, E. G., Studier, F. W., Moss, B.:** Eucaryotic expression system based on a recombinant vaccinia virus that sythezise bacteriophage T7 RNA polymerase. 1986. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8122-26.
- Gauss-Müller, V., Lottspeich, F., Deinhardt, F.:** Characterisation of hepatitis A virus structural proteins. 1986. *Virology* **155**: 732-36.
- Gauss-Müller, V., Jurgensen, D., Deutzmann, R.:** Autoproteolytic cleavage of recombinant 3C proteinase of hepatitis A virus. 1991. *Virology* **182**: 861-64.
- Glass, M. J. und Summers, D. F.:** Identification of a trans-acting activity from liver that stimulates hepatitis A virus translation in vitro. 1993. *Virology* **193**: 1047-50.
- Gosert, R., Cassinotti, P., Siegl, G., Weitz, M.:** Identification of hepatitis A virus non-structural protein 2B and its release by the major virus protease 3C. 1996. *J Gen Virol* **77**: 247-55.
- Gotoh, B., Ogasawara, T., Toyoda, T., Inocencio, N. M., Hamaguchi, M., Nagai, Y.:** An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. 1990. *Embo J* **9**: 4189-95.
- Graff, J., Richards, O. C., Swiderek, K. M., Davis, M.T., Rusnak, F., Harmon, S. A., Jia, X. Y., Summers, D. F., Ehrenfeld, E.:** Hepatitis A virus capsid protein VP1 has a heterogeneous C terminus. 1999. *J Virol* **73**: 6015-23.
- Gust, I. D., Lehmann, N. I., Dimitrakakis, M.:** A seroepidemiologic study of infection with HAV and HBV in five Pacific Islands. 1979. *Am J Epidemiol* **110**: 237-42.
- Hadler, S. C.:** Global impact of hepatitis A virus infection changing patterns. In: Hollinger, F.B., Lemon, S.M., Margolis, H.S., eds. *Viral Hepatitis and liver disease*. Baltimore. 1991. Williams & Wilkins. 14-20.
- Hall, W. T., Madden, D. L., Mundon, F. K., Brandt, D. E., Clarke, N. A.:** Protective effect of immune serum globulin (ISG) against hepatitis A infection in a natural epidemic. 1977. *Am J Epidemiol* **106**: 72-75.
- Harmon, S. A., Emerson, S. U., Huang, Y. K., Summers, D. F., Ehrenfeld, E.:** Hepatitis A viruses with deletions in the 2A gene are infectious in cultured cells and marmosets. 1995. *J Virol* **69**: 5576-81.
- Havens, W. P.:** The etiology of infectious hepatitis. 1947. *JAMA* **134**: 653-55.

- Hughes, J. V., Stanton, L. W., Tomassini, J. E., Long, W. J., Scolnik, E. M.:** Neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis A virus: partial localization of a neutralizing antigenic site. 1984. *J Virol* **52**: 465-73.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.:** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. 1990. *Gene* **96**: 23-28.
- Invitrogen-Katalog:** *Protein Tools*. 1999. Seite 155.
- Jewell, D. A., Swietnicki, W., Dunn, B. M., Malcom, B. A.:** Hepatitis A virus 3C proteinase substrate specificity. 1992. *Biochemistry* **31**: 7862-69.
- Jia, X. Y., Ehrenfeld, E., Summers, D. F.:** Proteolytic activity of hepatitis A virus 3C protein. 1991. *J Virol* **65**: 2595-600.
- Jia, X. Y., Summers, D. F., Ehrenfeld, E.:** Primary cleavage of the HAV capsid protein precursor in the middle of the proposed 2A coding region. 1993. *Virology* **193**: 515-19.
- Khudyakov, Y. E., Lopareva, E. N., Jue, D. L., Fang, S., Spelbring, J., Krawczynski, K. H., Margolis, S., Fields, H. A.:** Antigenic epitopes of the hepatitis A virus polyprotein. 1999. *Virology* **260**: 260-72.
- Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Toyoda, H., Etchison, D., Wimmer, E.:** Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. 1987. *J Virol* **61**: 2711-18.
- Krishnaswamy, S. und Rossmann, M. G.:** Structural refinement and analysis of Mengo virus. 1990. *J Mol Biol* **211**: 803-44.
- Kusov, Y. Y., Sommergruber, W., Schreiber, M., Gauss-Müller, V.:** Intermolecular cleavage of hepatitis A virus (HAV) precursor protein P1- P2 by recombinant HAV proteinase 3C. 1992<sub>a</sub>. *J Virol* **66**: 6794-96.
- Kusov, Y. Y., Kazachkov, Y. A., Dzagurov, G. K., Khozinskaya, G. A., Balayan, M. S., Gauss-Müller, V.:** Identification of precursors of structural proteins VP1 and VP2 of hepatitis A virus. 1992<sub>b</sub>. *J Med Virol* **37**: 220-27.
- Kyhse-Anderson, J.:** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. 1984. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-09.
- Lednar, W. M., Lemon, S. M., Kirkpatrick, J. W., Redfield, R. R., Fields, M. L., Kelley, P. W.:** Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. 1985. *Am J Epidemiol* **122**: 226-33.
- Lemon, S. M. und Binn, L. N.:** Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization. 1983. *Infect Immun* **42**: 418-20.
- Lemon, S. M.:** Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. 1985. *N Engl J Med* **313**: 1059-67.

- Lemon, S. M., Chao, S. F., Jansen, R. W., Binn, L. N., LeDuc, J. W.:** Genomic heterogeneity among human and nonhuman strains of hepatitis A virus. 1987. *J Virol* **61**: 735-42.
- Lemon, S. M., Amphlett, E., Sangar, D.:** Protease digestion of hepatitis A virus: disparate effects on capsid proteins, antigenicity, and infectivity. 1991. *J Virol* **65**: 5636-40.
- Lemon, S. M., Whetter, L., Chang, K. H., Brown, E. A.:** Why do human hepatitis viruses replicate so poorly in cell cultures? 1992. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 455-59.
- MacCallum, F. O., Bradley, W. H.:** Transmission of infective hepatitis to human volunteers. 1944. *Lancet* **2**: 228.
- MacCallum, F.O. :** Homologous serum jaundice. 1947. *Lancet* **2**: 691-92.
- MacCallum, F. O., Bradley, W. H., Van Rooyen, C. E.:** Infective hepatitis and allied Conditions. In: Cope Z, ed. *History of the Second World War: Medicine and pathology. Vol. 2.* London. 1952. HMSO: 257-67.
- MacGregor, A. W., Kornitschuk, M., Hurrell, J. G. R., Lehmann, N. I., Coulepis, A. G., Locarnini, S. A., Gust, I. D.:** Monoclonal antibodies against hepatitis A virus. 1983. *J Clin Microbiology* **18**: 1237-43.
- Martin, A., Escriou, N., Chao, S. F., Girard, M., Lemon, S. M., Wychowski, C.:** Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts. 1995. *Virology* **213**: 213-22.
- Martin, A., Benichou, D., Chao, S. F., Cohen, L. M., Lemon, S. M.:** Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 is not dependent on processing by the 3Cpro proteinase. 1999. *J Virol* **73**: 6220-27.
- McDonald, S.:** Acute yellow atrophy. 1908. *Edinburgh Med J* **15**: 208.
- Medical Research Council:** Infective Hepatitis: Studies in East Anglia during the period 1943-47. 1951. London: *Special Report Series, No 273*, HMSO.
- Michiels, T., Dejong, V., Rodrigus, R., Shaw-Jackson, C.:** Protein 2A is not required for Theiler's virus replication. 1997. *J Virol* **71**: 9549-56.
- Mihalyi, E.:** *Application of proteolytic enzymes to protein structure studies.* 1979. CRC Press, Inc., West Palm Beach, Fla. p. 68-73.
- Obuchi, M., Odagiri, T., Lizuka, H., Ohara, Y.:** Expression of lymphotoxin gene inserted into Theiler's murine encephalomyelitis virus. 1999. *Microbiol Immunol* **43**: 83-86.

- Ogasawara, T., Gotoh, B., Suzuki, H., Asaka, J., Shimokata, K., Rott, R., Nagai, Y.:** Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. 1992. *Embo J* **11**: 467-72.
- Palmenberg, A. C.:** Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. 1990. *Annu Rev Microbiol* **44**: 603-23.
- Paul, A. V., Tada, H., Van der Helm, K., Wissel, T., Kiehn, R., Wimmer, E., Deinhardt, F.:** The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis A virus (isolate MBB) 1987. *Virus Res* **88**: 153-71.
- Ping, L. H., Jansen, R. W., Stapleton, J. T., Cohen, J. I., Lemon, S. M.:** Identification of an immunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. 1988. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8281-85.
- Ping, L. H. und Lemon, S. M.:** Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. 1992. *J Virol* **66**: 2208-16.
- Probst, C., Jecht, M., Gauss-Müller, V.:** Proteinase 3C-mediated processing of VP1-2A of two hepatitis A virus strains: in vivo evidence for cleavage at amino acid position 273/274 of VP1. 1997. *J Virol* **71**: 3288-92.
- Probst, C., Jecht, M., Gauss-Müller, V.:** Processing of proteinase precursors and their effect on hepatitis A virus particle formation. 1998. *J Virol* **72**: 8013-20.
- Probst, C., Jecht, M., Gauss-Müller, V.:** Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. 1999. *J Biol Chem* **274**: 4527-31.
- Rachow, A., Gauss-Müller, V., Probst, C.:** Homogenous hepatitis A virus particles. Proteolytic release of the assembly signal 2A from procapsids by factor Xa. 2003. *J Biol Chem* **278**: 29744-51.
- Robertson, B. H., Brown, V. K., Holloway, B. P., Khanna, B., Chan, E.:** Structure of the hepatitis A virion: identification of potential surface-exposed regions. 1989. *Arch Virol* **104**: 117-28.
- Rosen, E., Stapleton, J. T., McLinden, J.:** Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. 1993. *Vaccine* **11**: 706-12.
- Ruchti, F., Siegl, G., Weitz, M.:** Identification and characterization of incomplete hepatitis A virus particles. 1991. *J Gen Virol* **72**: 2159-66.
- Rueckert, R. R. und Wimmer, E.:** Systematic nomenclature of picornavirus proteins. 1984. *J Virol* **50**: 957-59.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.:** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 New York: Cold Spring Harbor Laboratory.



- Scholz, E., Heinrich, U., Flehming, B.:** Acid stability of hepatitis A virus. 1989. *J Gen Virol* **70**: 2481-85.
- Schulman, A. N., Dienstag, J. L., Jackson, D. R., Hoofnagle, J. H., Gerety, R. J., Purcell, R. H., Barker, L. F.:** Hepatitis A antigen particles in liver, bile, and stool of chimpanzees. 1976. *J Infect Dis* **134**: 80-84.
- Schultheiss, T., Kusov, Y. Y., Gauss-Muller, V.:** Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2- P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. 1994. *Virology* **198**: 275-81.
- Schultheiss, T., Sommergruber, W., Kusov, Y. Y., Gauss-Muller, V.:** Cleavage specificity of purified recombinant hepatitis A virus 3C proteinase on natural substrates. 1995. *J Virol* **69**: 1727-33.
- Shimizu, Y. K., Mathiesen, L. R., Lorenz, D., Drucker, J., Feinstone, S. M., Wagner, J. A., Purcell, R. H.:** Localization of hepatitis A antigen in liver tissue by peroxidase- conjugated antibody method: light and electron microscopic studies. 1978. *J Immunol* **12**: 1671-79.
- Siegl, G., Weitz, M., Kronauer, G.:** Stability of hepatitis A virus. 1984. *Intervirology* **22**: 218-26.
- Smyth, M. S., Trudgett, A., Martin, J. H., Hoey, E. M., Martin, S. J.:** Conformational changes during proteolytic processing of a picornavirus capsid protein. 2000. *Arch Virol* **145**: 1473-79.
- Stapleton, J. T. und Lange, D. K.:** *Trypsin sensitivity of hepatitis A virus*. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 235-39.
- Stapleton, J. T., Rosen, E., Linden, J.:** Detection of hepatitis A virus capsid proteins in insect cells infected with recombinant baculoviruses encoding the entire hepatitis A open reading frame. 1991. In Hollinger, F. B., Lemon, S. M., Margolis, H. S. (Ed.). *Viral hepatitis and liver disease*. 50-54. The William & Wilkins Co., Baltimore.
- Suzuki, H., Harada, A., Hayashi, Y., Wada, K., Asaka, J., Gotoh, B., Ogasawara, T., Nagai, Y.:** Primary structure of the virus activating protease from chick embryo. Its identity with the blood clotting factor Xa. 1991. *FEBS Lett* **283**: 281-85.
- Taylor, D. J., Krishna, N. K., Canady, M. A., Schneemann A., Johnson, J. E.:** Large-scale, pH-dependent, quaternary structure changes in an RNA virus capsid are reversible in the absence of subunit autoproteolysis. 2002. *J Virol* **76**: 9972-80.
- Tesar, M., Harmon, S. A., Summers, D. F., Ehrenfeld, E.:** Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons. 1992. *Virology* **186**: 609-18.
- Tesar, M., Jia, X. Y., Summers, D. F., Ehrenfeld, E.:** Analysis of a potential myristoylation site in hepatitis A virus capsid protein VP4. 1993. *Virology* **194**: 616-26.

- Uddike, W. S., Tesar, M., Ehrenfeld, E.** Detection of hepatitis A virus proteins in infected BS-C-1 cells. 1991. *Virology* **185**: 411-18.
- Voegt, H.:** Zur Ätiologie der hepatitis epidemica. 1942. *Munich Med Wochenschr* **83**: 76-79.
- Wang, W. und Malcom, B. A.:** Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. 1999. *BioTechniques* **26**: 680-82.
- World Health Organization:** Viral Hepatitis: Report of WHO Scientific Group. 1973. *WHO Tech Rep Ser* **512**: 7-52.
- Winokur, P. L., McLinden, J. H., Stapleton, J. T.:** The hepatitis A virus polyprotein expressed by a recombinant vaccinia virus undergoes proteolytic processing and assembly into viruslike particles. 1991. *J Virol* **65**: 5029-36.
- Yousef, G. E., Brown, I. N., Mowbray, J. F.:** Derivation and biochemical characterization of an enterovirus group-specific monoclonal antibody. 1987. *Intervirology* **28**: 163-70.
- Zahn, J., Vallbracht, A., Flehming, B.:** Hepatitis A-virus in cell culture. V. Neutralizing antibodies against hepatitis A-virus. 1984. *Med Microbiol Immunol* **173**: 9-17.
- Zhu, N. L., Li, G. D., Wang, Y.:** Physiochemical and immunological characterization of hepatitis A virus nucleocapsids expressed in a vaccinia virus/T7/EMCV system. 1994. *Arch Virol* **135**: 443-49.

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung I-1: Kaskade der Polyproteinprozessierung von HAV.....</b>	<b>5</b>
<b>Abbildung I-2: HAV-Assemblierungsmodell.....</b>	<b>7</b>
<b>Abbildung III-2: Bestimmung der optimalen Proteinasekonzentration für den FXa-/Thrombin-in vitro-Verdau .....</b>	<b>29</b>
<b>Abbildung III-3: Darstellung der Interaktionen zwischen EIA-Komponenten und den Proteinase FXa und Thrombin.....</b>	<b>30</b>
<b>Abbildung IV-1: Protein-Spaltprodukte (Westernblot) und HAV-Partikelproduktion (EIA) nach der Expression von Konstrukten mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz an Position [273] und [274] in VP1-2A .....</b>	<b>36</b>
<b>Abbildung IV-2: Proteolytische Spaltung durch FXa und Thrombin von HAV-Partikeln mit entsprechenden Konsensussequenzen in VP1-2A.....</b>	<b>40</b>
<b>Abbildung IV-3: Proteolytische Spaltung von HAV-Wildtyppartikeln durch FXa und Thrombin .....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung IV-4: Konformationsabhängigkeit der FXa-Spaltung .....</b>	<b>48</b>
<b>Abbildung IV-5: Bestimmung der FXa-Spaltstelle in Wildtyp-VP1-2A .....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung IV-6a: Analyse von HAV-Prokapsiden mit der P1-2A(E/FXa/S)-Sequenz in der Saccharosegradientenzentrifugation und dem anti-VP1-Westernblot .....</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung IV-6b: Analyse von HAV-Prokapsiden vom Wildtyp in der Saccharosegradientenzentrifugation und dem anti-VP1-Westernblot .....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung IV-7: VP1-2A-Multimere in HAV-70S-Prokapsiden .....</b>	<b>59</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle III-1: Darstellung der Primersequenzen für die Klonierung der in Abbildung III-1c dargestellten HAV-Konstrukte.....</b>	<b>17</b>
<b>Tabelle III-2: Zusammensetzung der verwendete Puffer und Materialien für die Vakzinia-T7 Wirktiterbestimmung.....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle III-3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Materialien für die Durchführung des Westernblots.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle III-4: Beschreibung der im Westernblot eingesetzten Antiseren.....</b>	<b>24</b>

## **Danksagungen**

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. V. Gauss-Müller für die sehr engagierte und interessierte Betreuung, die stete Bereitschaft zur Diskussion und Auseinandersetzung mit den gewonnenen Daten und die zahlreichen Anregungen zur Veröffentlichung der Ergebnisse sowie zur Ausarbeitung dieser Dissertation bedanken. Mein Dank gilt außerdem Dr. Ch. Probst für die Unterstützung bei der Entwicklung der Ideen und Strategien zur Durchführung dieser Doktorarbeit und für die interessanten, und von mir sehr geschätzten, Einführungen in das Fach Molekularbiologie. Ich danke Prof. Dr. P. Müller für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Instrumente sowie für das Interesse an meiner Arbeit im Institut. Weiterhin möchte ich dankend Dr. Sanâa Noubir sowie alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe erwähnen, die mit zahlreichen fachlichen Diskussionen einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit leisteten.

# Lebenslauf

<b>Persönliches</b>	
<b>Name</b>	Andrea Rachow
<b>Geburtsdatum/-ort</b>	30.06.1978 in Ludwigslust
<b>Nationalität</b>	Deutsch
<b>Familienstand</b>	Ledig
<b>Schulbildung</b>	
<b>1985 - 1989</b>	Grundschule in Ludwigslust
<b>1989 - 1997</b>	Gymnasium in Ludwigslust
<b>1997</b>	Deutsche Allgemeine Hochschulreife
<b>Universität</b>	
<b>10/1997-05/2004</b>	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
<b>10/1997-03/2004</b>	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
<b>09/1999</b>	Physikum
<b>09/2000</b>	1. Staatsexamen
<b>03/2003</b>	2. Staatsexamen
<b>04/2003 – 04/2004</b>	Praktisches Jahr 1. Terial: <i>Chirurgie</i> , Sana Klinik (Lübeck) 2. Terial: <i>Pädiatrie</i> , Universitätsspital (Zürich) 3. Terial: <i>Innere Medizin</i> , St. George's Medical School (London)
<b>05/2004</b>	3. Staatsexamen

---

## Dissertation und Präsentationen

---

<b>06/2000</b>	Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Institut für Molekularbiologie  Thema: „Die Rolle von viralen Proteinasen und Wirtszellproteinasen bei der Reifung des Hepatitis A-Viruskapsids“  Betreuer: Prof. Dr. V. Gauss-Müller
<b>10/2001</b>	Abschluss der experimentellen Tätigkeit
<b>05/2003</b>	Veröffentlichung der experimentellen Daten im <i>Journal of Biological Chemistry</i> unter dem Titel: "Homogenous Hepatitis A Virus Particles-Proteolytic Release Of The Assembly Signal 2A From Procapsids By Factor Xa"; (Rachow et al., 2003)
<b>12/2003</b>	Abschluss der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation
<b>06/2002</b>	Vortrag zum Thema: „Partikelbildung des Hepatitis A Virus - Rolle von Wirtsproteasen“ im Rahmen des <i>Institutseminars der Molekularbiologie</i>
<b>05/2002</b>	Poster-Präsentation auf dem Kongress <i>EuropicAmerica</i> , Woods Hole (USA)
<b>03/2003</b>	Poster-Präsentation auf der <i>Jahrestagung der Gesellschaft für Virology</i> , Berlin
<b>09/2003</b>	Poster-Präsentation auf dem Kongress <i>Viral Assembly</i> , Sardinien (Italien)
<b>03/2004</b>	Poster-Präsentation auf der <i>Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie</i> , Tübingen
<b>05/2004</b>	Poster-Präsentation auf den <i>Blancenese Conferences</i> mit dem Thema: „From Genes to Therapie“, Hamburg