



Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Relevanz des signaltransduzierenden Adaptorproteins Paxillin für den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus

von Lisa Patzig
aus Berlin

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gerd Sutter
Angefertigt am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesinstitut für Impfstoffe
und biomedizinische Arzneimittel in Langen
Mentor: Prof. Dr. rer. nat. Eberhard Hildt

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gerd Sutter
Korreferent/en: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Meiner Familie

“VIREN SIND DIE EINZIGEN RIVALEN UM DIE HERRSCHAFT ÜBER UNSEREN PLANETEN.
WIR MÜSSEN AUF DRAHT SEIN, UM MIT IHNEN SCHRITT ZU HALTEN.”

JOSHUA LEDERBERG (MOLEKULARBIOLOGE UND GENETIKER)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	2
3 Einleitung	3
4 Literatur	4
4.1 Hepatitis B	4
4.1.1 Historischer Überblick	4
4.1.2 Taxonomie	4
4.1.3 Aufbau und Struktur von HBV-Partikeln	5
4.1.4 Genomorganisation und Proteinbiosynthese	6
4.1.5 Lebenszyklus von HBV	7
4.1.6 Epidemiologie	9
4.1.7 Transmission	10
4.1.8 Klinik	11
4.1.9 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	11
4.1.10 Diagnostik	12
4.1.11 Therapie	14
4.1.12 Prävention	15
4.2 Paxillin	15
4.2.1 Einleitung	15
4.2.2 Aufbau und Struktur	17
4.2.3 Interaktion und Funktion	18
4.2.4 Erkrankungen und Zukunft	24

5	Ansätze und Ziele der Arbeit	26
6	Material	27
6.1	Zellen	27
6.1.1	Prokaryotische Zellen	27
6.1.2	Eukaryotische Zellen	27
6.2	Mäuse	28
6.3	Gewebeschnitte	29
6.4	Plasmide	30
6.5	siRNA	30
6.6	Oligonukleotide	31
6.7	Antikörper	31
6.8	Größenstandards	33
6.9	Chemikalien	33
6.10	Enzyme	34
6.11	Kits	34
6.12	Lösungen für die Zellkultur	35
6.13	Puffer und Lösungen	35
6.14	Geräte	37
6.15	Verbrauchsmaterialien	38
6.16	Software	39
7	Methoden	40
7.1	Zellbiologie	40
7.1.1	Vorbereiten von Geräten und Lösungen	40
7.1.2	Prokaryotische Zellkultur	40
7.1.3	Eukaryotische Zellkultur	40
7.2	Molekularbiologie	43
7.2.1	Agarosegelelektrophorese	43
7.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
7.2.3	Präparation von Plasmiden (Maxi-Prep)	44
7.2.4	Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA aus dem Überstand	44
7.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA	45
7.2.6	cDNA-Synthese	45
7.2.7	<i>Real-Time</i> PCR (RT-PCR)	45
7.2.8	Northern Blot	46
7.3	Proteinbiochemie	47
7.3.1	Bradford Assay	47
7.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
7.3.3	Western Blot	48

7.3.4	Luciferase Assay	48
7.4	Immunologie	49
7.4.1	Immunochemische Färbung der Western Blot-Membran	49
7.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz	49
7.4.3	Enzym linked immunosorbent assay (ELISA)	50
7.4.4	Methoden zur Charakterisierung HBV-transgener Mäuse	50
7.4.5	Gewinnung von Mäuselebergewebeprobe	51
7.4.6	Präparation von Mäuselebergewebelysaten	51
7.4.7	Isolierung von RNA aus Mäuselebergewebeprobe	51
7.4.8	Paraffinpräparate und Färbetechniken	51
7.4.9	Immunfärbung von Paraffinschnitten aus Lebergewebeprobe	51
7.5	Mikroskopie	52
7.5.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	52
8	Ergebnisse	53
8.1	<i>In vitro</i>	53
8.1.1	Expression von HBV führt zu erhöhter Bildung von Paxillin in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien	53
8.1.2	<i>Knockdown</i> der Paxillinexpression führt zu erhöhter Bildung von LHBs auf Proteinebene und verringerter HBV-Menge auf mRNA-Ebene in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien	57
8.1.3	Intrazelluläre Paxillinverteilung: Akkumuliertes Verteilungsmuster in stabil HBV-exprimierenden Zellen	61
8.1.4	Transiente Expression von HBV führt zu erhöhter Bildung von Paxillin in transfizierten Zellen	62
8.1.5	Intrazelluläre Paxillinverteilung in transient HBV-exprimierenden Zellen	65
8.1.6	Replikation von HBV führt zu verringerter PXN-mRNA-Menge in infizierten primären Hepatozyten	67
8.2	<i>In vivo</i>	72
8.2.1	Expression von Paxillin in HBV-transgenen Mäusen	72
8.2.2	Expression von Paxillin in HBV-infizierten Patienten	76
9	Diskussion	78
	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

4.1	Aufbau des infektiösen Dane-Partikels	5
4.2	Struktur der nicht-infektiösen subviralen Partikel des Hepatitis-B-Virus	6
4.3	Schematische Darstellung des HBV-Genomes	7
4.4	Schematische Darstellung des HBV-Replikationszyklus	8
4.5	Globale Hepatitis-B-Prävalenz	9
4.6	Vorkommen der Hepatitis-B-Genotypen auf den Kontinenten	10
4.7	Klinischer Verlauf und serologisches Profil einer akuten Hepatitis-B-Infektion	13
4.8	Klinischer Verlauf und serologisches Profil einer chronischen Hepatitis-B-Infektion	14
4.9	Aufbau von fokalen Adhäsionen	16
4.10	Struktur und Aufbau der Paxillinfamilie	18
4.11	Paxillinbindungspartner	19
4.12	Anatomie eines Leberlappens	25
7.1	Schematischer Aufbau des Western Blot-Verfahrens	48
8.1	Northern Blot-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen	53
8.2	Western Blot-Analyse: Erhöhte Paxillinexpression in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen	54
8.3	PCR-Analyse: Erhöhte Paxillin-cDNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen	55
8.4	RT-PCR-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (V.1)	56
8.5	RT-PCR-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (V.2)	56
8.6	RT-PCR-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (V.3)	57
8.7	Western Blot-Analyse: Bei Paxillin- <i>Knockdown</i> verstärkte LHBs-Expression in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien	58
8.8	Paxillin- <i>Knockdown</i> in stabil HBV-exprimierenden HepG2 2.2.15-Zellen	59
8.9	Paxillin- <i>Knockdown</i> in stabil HBV-exprimierenden HepG AD38-Zellen	60

8.10 Immunfluoreszenzanalyse: Verstärkte PXN-Expression in stabil HBV-exprimierenden HepG2 2.2.15-Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Hep G2-Zellen	61
8.11 Western Blot-Analyse: Erhöhte Paxillinexpression in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (V.1)	62
8.12 Western Blot-Analyse: Erhöhte Paxillinexpression in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (V.2)	63
8.13 Luziferase-Assay: Erhöhte PXN-Promotoraktivität in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen	63
8.14 RT-PCR-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen	64
8.15 Immunfluoreszenzanalyse von transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (1)	65
8.16 Immunfluoreszenzanalyse von transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (2)	66
8.17 HBsAg-ELISA zeigt erfolgte Infektion im PHH-Modell (V.1)	67
8.18 RT-PCR-Analyse: Verringerte PXN-mRNA-Menge in infizierten im Vergleich zu uninfizierten PHHs (V.1)	68
8.19 HBsAg-ELISA zeigt erfolgte Infektion im PHH-Modell (V.2)	69
8.20 RT-PCR-Analyse: Verringerte PXN-mRNA-Menge in infizierten im Vergleich zu uninfizierten PHHs (V.2)	70
8.21 Western Blot- und RT-PCR-Analyse: Verringerte PXN-mRNA-Menge in infizierten im Vergleich zu uninfizierten PHHs (V.3)	71
8.22 Western Blot-Analyse von männlichen HBV-transgenen im Vergleich zu HBV-negativen Mäusen	72
8.23 Western Blot-Analyse von weiblichen HBV-transgenen im Vergleich zu HBV-negativen Mäusen	73
8.24 RT-PCR-Analyse: Verringerte PXN-mRNA-Menge in männlichen HBV-transgenen im Vergleich zu HBV-negativen Mäusen	73
8.25 HE-Färbung männlicher Mäuseleberschnitte	74
8.26 Immunfluoreszenzanalyse: Verstärkte PXN-Expression in männlichen HBV-transgenen Mäusen im Vergleich zu HBV-negativen Kontrolltieren	75
8.27 Immunfluoreszenzanalyse: Verstärkte PXN-Expression in Gewebeproben von Patienten mit HBV-assoziiertem hepatozellulärem Karzinom im Vergleich zu Kontrollgewebe	77

Tabellenverzeichnis

4.1	Übersicht der serologischen und virologischen Marker von HBV	12
4.2	Übersicht der direkten und indirekten Bindungspartner der Paxillin <i>LD motifs</i> .	20
4.3	Variabilität der Paxillinexpression in humanen Krebsarten	24
6.1	Prokaryotische Zellen	27
6.2	Eukaryotische Zellen	27
6.3	Verwendete Mäuse für RNA-Proben, Proteinlysate und Gewebeschnitte	28
6.4	Für Gewebeschnitte verwendete Mäuse- und Patientenlebern	29
6.5	Verwendete Plasmide	30
6.7	Verwendete Light-Cycler Primer	31
6.8	Antikörper und entsprechende Verdünnungen	31
7.1	Real-time PCR Programm	46
7.2	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels	48
7.3	Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluorophore	52

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	HZMV	Humanes-Zytomegalie-Virus
AFP	Alpha-1-Fetoprotein	IgG	Immunglobulin G
AK	Antikörper	IgM	Immunglobulin M
ALT	Alanin-Aminotransferase	ILK	Integrin-linked Kinase
APS	Ammoniumperoxidsulfat	KCl	Kaliumchlorid
AuAg	australisches Antigen	KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>	kDa	Kilodalton
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Kontr.	Kontrolle
c-Src	<i>cellular and sarcoma</i>	LHBs	<i>large hepatitis B surface protein</i>
BSA	Bovines Serum Albumin	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
DABCO	Triethylendiamin	MHBs	<i>middle hepatitis B surface antigen</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	mRNA	<i>messenger RNA</i>
ddH₂O	doppelt deionisiertes Wasser	NaCl	Natriumchlorid
DHBV	Duck-Hepatitis-B-Virus	Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	o.	oder
DMSO	Dimethylsulfoxid	ORF	<i>open reading frame</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate	PAK	<i>P21 activated kinase</i>
DR	<i>direct repeats</i>	PBS	<i>Phosphatase Buffered Saline</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	P-BS	<i>Paxillin-binding Subdomain</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	PEI	Polyethylenimin
EGFP	<i>enhanced Green fluorescent protein</i>	pgRNA	prägenomische RNA
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay	PHH	primäre humane Hepatozyten
EZM	extrazelluläre Matrix	PIX	<i>PAK interacting exchange factor</i>
FAK	Focal Adhesion Kinase	PVDF	Polyvinylidenfluorid
FAs	<i>focal adhesions</i>	PXN	Paxillin
FAT	<i>focal adhesion targeting</i>	rev	<i>revert</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
fwd	<i>forward</i>	RT	Reverse-Transkriptase
geb.	geboren	RT-PCR	<i>Real-Time PCR</i>

gest.	gestorben	RTK	Rezeptortyrosinkinase
GoHBV	Gorilla-Hepatitis-B-Virus	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
GSHV	Ground-Squirrel-Hepatitis-Virus	SGHBV	Snow-Goose-Hepatitis-B-Virus
gtA	Genotyp A	SHBs	<i>small hepatitis B surface antigen</i>
gtD	Genotyp D	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
gtG	Genotyp G	SVP	subvirale Partikel
HAV	Hepatitis-A-Virus	Tab.	Tabelle
HBc	<i>hepatitis B core antigen</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA
HBe	<i>hepatitis B early antigen</i>	TBS/T	<i>Tris-Buffered Saline/Tween 20</i>
HBs	<i>hepatitis B surface antigen</i>	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HBV	Hepatitis-B-Virus	u.	und
HBVtg	HBV-transgen	Vt	<i>vinculin tail</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom	WB	Western Blot
HHBV	Heron-Hepatitis-B-Virus	WHO	<i>World health organisation</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	WHV	Woodchuck-Hepatitis-Virus

1 Zusammenfassung

Charakterisierung der Bedeutung von Paxillin für den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus hat globale Bedeutung bei viralen Lebererkrankungen (Gerlich, 2013). Mit seinem ausgeprägten Hepatropismus und der hohen Wirtsspezifität befällt es sowohl Säugetiere als auch Vögel. Die Krankheitsverläufe sind abhängig vom Alter und der vorliegenden Form. So reichen die Symptome von leichten Anzeichen wie Unwohlsein und Erschöpfung hin zu schweren Erkrankungen von Organen und im schlimmsten Verlaufsfall bis zur Entwicklung einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms (Schaefer, 2007; Dienstag, 1981; Gitlin, 1997). In bereits veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass Paxillin eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Verbreitung von bestimmten Tumorarten einnimmt. Es übernimmt somit nicht nur physiologische Funktionen als Adaptorprotein in den *focal adhesions* zur Vermittlung der Signaltransduktion und Integrität der Zelle, sondern hat auch durch die Steuerung eines Tumors eine entscheidende Mitwirkung an der bestmöglichen Invasions- und Wachstumsrate des Tumors (Turner, 2000; Deakin et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Hepatitis-B-Virus auf die Menge und intrazelluläre Verteilung von Paxillin bestimmt und umgekehrt der Effekt einer Deregulation der Paxillinexpression auf den Lebenszyklus von HBV charakterisiert. In Northern Blot-, PCR-, RT-PCR- und Western Blot-Analysen von stabil HBV-exprimierenden Zellen (HepG2 2.2.15 und HepAD38) sowie transient HBV-exprimierenden Zellen (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtG) konnte gezeigt werden, dass die Expression von HBV zu einer erhöhten Menge an Paxillin auf mRNA- und Proteinebene führt (Kap. 8.1.1 und 8.1.4). Die Immunfluoreszenzuntersuchungen in HepG2 2.2.15-Zellen (Abb. 8.10) bestätigen diese Hypothese. Bei den IF-Aufnahmen der transient HBV-exprimierenden Zellen zeigt sich kein Unterschied. Der *Knockdown* von Paxillin hat in HepG2 2.2.15- und HepAD38-Zellen eine verringerte Menge an HBV-spezifischen Transkripten bei gleichzeitig gesteigerter intrazellulärer LHBs-Expression sowie eine verringerte HBsAg-Menge im Zellkulturüberstand zur Folge (Abb. 8.8 und 8.9). Die *in vivo*-Modelle zeigen eine verringerte Menge an Paxillin bei Anwesenheit von HBV. Dies könnte durch andere vorherrschende Regulationsmechanismen im Vergleich zu den *in vitro*-Modellen bedingt sein. Die Relevanz von Paxillin für HBV konnte gezeigt werden und zukünftige Experimente werden klären, wie dies zur Bekämpfung der HBV-Erkrankung genutzt werden kann.

2 Summary

Characterization of the role of paxillin for the life cycle of the hepatitis B virus

The hepatitis B virus has global significance in viral liver diseases (Gerlich, 2013). With a strong hepatotropism and a high specificity of host it affects both mammalian animals and birds. The course of disease depends on the age and the present form. The symptoms range from mild symptoms such as malaise and fatigue to severe diseases of organs and in the worst case to the development of liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma (Schaefer, 2007; Dienstag, 1981; Gitlin, 1997). In earlier published studies it has already been shown that paxillin plays an important role in the emergence and spread of certain types of tumors. It assumes not only physiological functions as an adapterprotein in the focal adhesions to mediate signaltransduction and cell integrity, but rather, due to the ability to control the tumor, crucially contributes to its best possible invasion and growth rate (Turner, 2000; Deakin et al., 2012).

In the present work, the influence of hepatitis B virus was analysed by the amount and intracellular distribution of paxillin and, vice versa, the characterisation of the effect of deregulation of the expression of paxillin for the life cycle of HBV was researched. The analyses of Northern Blot-, PCR-, RT-PCR- and Western blot data of stable HBV-expressing cells (HepG2 2.2.15 and HepAD38) and transient HBV-expressing cells (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtG) were able to show that the expression of HBV leads to an increased amount of paxillin on the mRNA- and protein-level (chap. 8.1.1 and 8.1.4). The immunofluorescence studies in HepG2 2.2.15-cells (fig. 8.10) confirm this hypothesis. The IF-images of the transient HBV-expressing cells show no difference. The knockdown of paxillin in HepG2 2.2.15 and HepAD38-cells shows the result of a reduced amount of HBV-specific transcripts and at the same time an increased intracellular LHBS-expression, the HBsAg-amount in the supernatant of the cellculture was reduced (fig. 8.8 and 8.9). The *in vivo*-models show a reduced amount of paxillin in the presence of HBV. This could be caused by other mechanisms of regulation in comparison to the *in vitro*-models. The relevance of paxillin for HBV has been shown and future experiments will clarify how this can be used for the control of HBV infection.

3 Einleitung

Am 28. Juli 2014 rief die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erneut zum WORLD HEPATITIS DAY auf. Zusammen mit der WORLD HEPATITIS ALLIANCE kämpft die WHO für das aktive Einschreiten der Regierungen gegen Infektionserkrankungen auf der ganzen Welt, für bessere Präventionsprogramme und den Zugang zu Impfstoffen und Medikamenten auch für die Menschen in Entwicklungsländern.

Ein Hauptvertreter der Krankheit ist das Hepatitis-B-Virus (HBV). Warum hat HBV eine solche Relevanz für die gesamte Weltbevölkerung? Die globale Ausbreitung dieses Erregers ist immens und betrifft zur Zeit etwa zwei Milliarden Menschen. Diese sind an einer akuten oder chronischen Form erkrankt oder haben eine HBV-Erkrankung überstanden. Über 600.000 Menschen sterben jährlich daran. Schätzungsweise 350 Millionen Menschen weltweit leben mit einer chronischen HBV-Infektion und tragen ein sehr hohes Risiko, an Leberzirrhose oder dem hepatozellulärem Karzinom (HCC) zu erkranken (Ott et al., 2012; Teh and Sasadeusz, 2014). Durch die ubiquitäre Verteilung des Virus weisen Regionen wie Südostasien und Subsahara-Afrika eine hohe Prävalenz auf. Weniger als 1 % der Bevölkerung in Westeuropa, Nordamerika und Australien sind Träger einer chronischen Hepatitis-B-Virusinfektion (Janahi, 2014). Trotz der präventiven Impfung und Behandlung von Patienten mit antiviralen Langzeittherapien ist die Entwicklung von Methoden der Resistenzvermeidung und das Aufstellen neuer Konzepte zum Schutz von *non-respondern* in der Zukunft unumgänglich (Zuckerman, 1996).

Nicht nur die Suche nach einem therapeutischen Impfstoff und effizienteren Medikamenten treibt die Forschung voran, auch sind viele Fragen des Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus nur teilweise entschlüsselt. Die Wissenschaft kann noch keine Antwort über den genauen Viruseintritt in die Leberzellen sowie die komplexe Bedeutung der subviralen Partikel geben. Auf diesem Gebiet ist Grundlagenforschung unerlässlich. Für eine gute Replikation benötigt das Hepatitis-B-Virus eine sessile Zelle. Es sind fokale Adhäsionen vorhanden, welche eine entscheidende Rolle bei der Zelladhäsion und Zellwanderung spielen (Gallant et al., 2002). Das Protein Paxillin (PXN) ist ein wichtiger Baustein bei der Koordination der Signaltransduktion zwischen extrazellulärer Matrix (EZM), den fokalen Adhäsionen und dem Aktin-Zytoskelett. Paxillin agiert als Vermittler zwischen vielfältigsten biologischen Makromolekülen (Schaller, 2001; Brown and Turner, 2004). Diese Erkenntnisse sind Ausgangspunkt für die weitere Forschung nach der Verbindung des signaltransduzierenden Adapterproteins Paxillin und dem Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus.

4 Literatur

4.1 Hepatitis B

4.1.1 Historischer Überblick

Der Mediziner B. S. Blumberg fand im Blut eines australischen Ureinwohners ein unbekanntes Antigen. Das australische Antigen (AuAg), später identifiziert als das sphärische Hepatitis-B-Oberflächenprotein (HBsAg), gab Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang mit einer Lebererkrankung (Blumberg, 1977). Er erhielt dafür im Jahre 1976 zusammen mit D. C. Gajdusek den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin "*for their discoveries concerning new mechanisms for the origin and dissemination of infectious diseases*" ("für ihre Entdeckungen bezüglich neuer Mechanismen bei der Entstehung und Verbreitung von Infektionskrankheiten") (Blumberg, 2002).

4.1.2 Taxonomie

Der momentane wissenschaftliche Stand klassifiziert das Hepatitis-B-Virus als einziges humanpathogenes Mitglied der Familie der *Hepadnaviridae*. Der Name der Familie leitet sich aus der Abkürzung von Hepatitis-DNA-Viren ab (griech.: *hepa* = Leber; *-itis* = Entzündung; latein.: *virus* = Gift, Schleim). Die Vertreter dieser Familie sind sehr organspezifisch und lösen akute und chronische Infektionen aus. Dieser ausgeprägte Hepatropismus und eine hohe Wirtsspezifität sind Merkmale dieser obligat intrazellulären Parasiten. Sie lassen sich taxonomisch in zwei Genera aufteilen, den Orthohepadnaviren und den Avihepadnaviren. Sie befallen sowohl große Säugetiere, wie zum Beispiel Affen und Menschen, als auch diverse Nagetiere. Diese Wirte werden dem Genus Orthohepadnavirus zugeordnet. Typische Vertreter sind: Das Gorilla-Hepatitis-B-Virus (GoHBV), das Hepatitis-B-Virus und das Woodchuck-Hepatitis-Virus (WHV) sowie das Ground-Squirrel-Hepatitis-Virus (GSHV). Die Avihepadnaviren sind in zahlreichen Vogelarten vorhanden. Das Duck-Hepatitis-B-Virus (DHBV), das Heron-Hepatitis-B-Virus (HHBV) und das Snow-Goose-Hepatitis-B-Virus (SGHBV) sind klassische Vertreter dieser Gruppe (Schaefer, 2007).

Die genetische Variabilität von HBV ist sehr hoch. Bis heute sind 8 verschiedene Genotypen bekannt, diese sind als Genotypen A bis H bezeichnet und es wurden mindestens 35 Subgenotypen entdeckt (Aspinall et al., 2011).

4.1.3 Aufbau und Struktur von HBV-Partikeln

Im Jahr 1970 entdeckte D. S. Dane im Blut von HBsAg-positiven Spendern intakte Hepatitis-B-Viruspartikel, sog. Dane-Partikel (Abb. 4.1). Mit Hilfe eines Elektronenmikroskops konnte erstmals ein vollständiges Hepatitis-B-Virus (ca. 0,2 %) mit einer Größe von etwa 42 nm beobachtet werden (Abb. 4.1) sowie eine Vielzahl mit etwa 22 nm großen und unterschiedlich langen filamentösen (ca. 1 - 2 %) und sphärischen (ca. 98 - 99 %) Partikeln, welche in Abb. 4.2 dargestellt sind (Dane et al., 1970).

Die äußerste Begrenzung des infektiösen Dane-Partikels bildet eine Lipiddoppelschicht aus dem endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle zusammen mit den drei verschiedenen Oberflächenproteinen. Diese Hüllproteine, das *large hepatitis B surface antigen* (LHBs), das *middle hepatitis B surface antigen* (MHBs) und das *small hepatitis B surface antigen* (SHBs) umschließen das etwa 27 nm große ikosaedrische Nukleokapsid, gebildet vom *hepatitis B core antigen* (HBc). Dieses beinhaltet das partiell doppelsträngige virale DNA-Genom mit der kovalent gebundenen DNA-Polymerase, welche eine reverse Transkriptase-Aktivität besitzt.

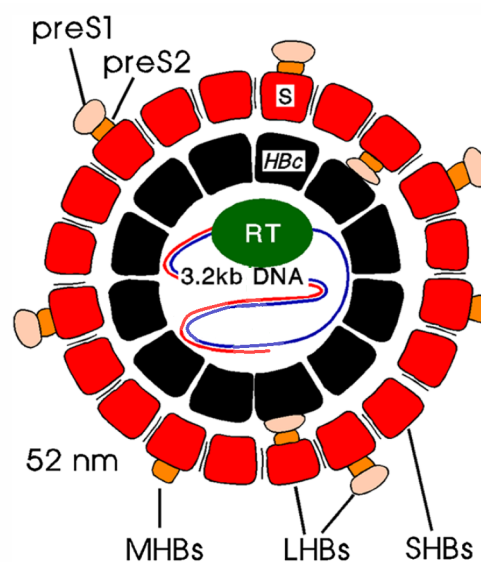


Abb. 4.1: Aufbau des infektiösen Dane-Partikels. Die Hülle bildet eine Lipiddoppelschicht zusammen mit den drei Oberflächenproteinen (LHBs, MHBs, SHBs). Das LHBs wird aus der PreS1-, der PreS2- und der S-Domäne gebildet. Das MHBs ist aus der PreS2- und S-Domäne aufgebaut und das SHBs nur aus der S-Domäne. Alle zusammen umgeben das Nukleokapsid, welches aus dem Kernprotein (HBc) besteht. Dieses umschließt die partiell doppelsträngige virale DNA mit der kovalent gebundenen DNA-Polymerase, welche eine reverse Transkriptase-Aktivität (RT) besitzt (modifiziert nach Gerlich, 2013; mit Genehmigung von BioMed Central).

In sehr großer Anzahl sind die nicht-infektiösen Partikel in Form von Filamenten oder Sphären vertreten; sie werden auch als subvirale Partikel (SVP) bezeichnet (Abb. 4.2). Diese bestehen im Gegensatz zum Dane-Partikel nur aus der Lipidhülle mit eingebundenen Hüllproteinen, beinhalten aber keine virale DNA. Die zum intakten Virus deutlich kleineren 17 - 25 nm großen sphärischen Partikel bestehen nur aus dem MHBs und dem SHBs. Die filamentösen Partikel sind unterschiedlich lang und es sind alle drei Oberflächenproteine am Aufbau beteiligt. Die Funktion dieser beiden nicht-infektiösen subviralen Partikel ist noch nicht genau erforscht. Wahrscheinlich dienen sie zur Bindung HBV-spezifischer Antikörper vom Wirt, um den Virus beim Eintritt in die Zelle zu unterstützen (Bruns et al., 1998; Seeger and Mason, 2000; Robert-Koch-Institut, 2000).

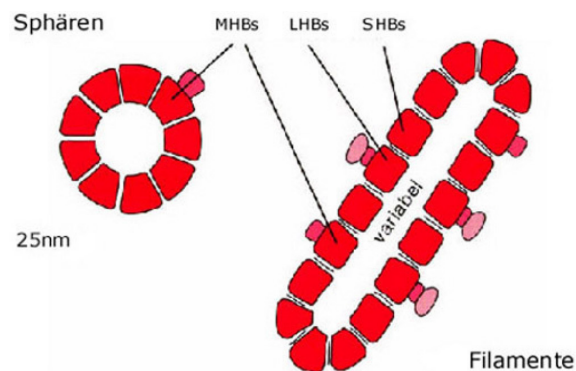


Abb. 4.2: Struktur der nicht-infektiösen subviralen Partikel des Hepatitis-B-Virus. Der Hauptanteil beider Partikel bildet das SHBs. Die Sphären bestehen zusätzlich noch aus dem MHBs und besitzen einen Durchmesser von 17 - 25 nm. Die Filamente dagegen weisen neben dem MHBs noch das LHBs im Aufbau auf und sind von unterschiedlicher Länge (modifiziert nach Gerlich, 2013; mit Genehmigung von BioMed Central).

4.1.4 Genomorganisation und Proteinbiosynthese

Das HBV-Genom besteht aus einer partiell doppelsträngigen DNA, einem kompletten Minusstrang mit etwa 3200 Nukleotiden und einem inkompletten Plusstrang von variabler Länge. Die HBV-Polymerase ist am 5'-Ende des kodierenden Minusstranges kovalent gebunden (Abb. 4.3). Auf dem Minusstrang sind die vier *open reading frames* (ORF, offene Leseraster) kodiert. Der längste *open reading frame* kodiert für die virale Polymerase; hier überlappen teilweise der zweite ORF für das Core (Kernprotein) und der dritte ORF für das X (regulatorische Hepatitis-X-Protein). Das Hepatitis-B-extrazelluläre-Antigen (*hepatitis B early antigen*, HBe) ist auf den beiden Leseraster für das Core und Pre-Core kodiert. Das HBe wird sezerniert und findet sich nicht im Dane-Partikel. Es bewirkt wahrscheinlich eine verminderte Immunantwort durch Verringerung der Genexpression von Toll-like Rezeptor 2 auf Hepatozyten und Monozyten. Die drei Oberflächenproteine (LHBs, MHBs, SHBs) werden durch das vierte Leseraster kodiert. Die S-Domäne transkribiert für das kleine Oberflächenprotein, die PreS2-Domäne und die S-Domäne das mittlere Oberflächenprotein und die PreS1-Domäne, die PreS2-Domäne und die S-Domäne für das große Oberflächenprotein. Die *covalently closed circular DNA* (cccDNA)

dient als Matrize für die Transkription der vier viralen *messenger RNAs* (mRNAs). Die Expression der 3.5-, 2.4-, 2.1- und 0.7-kb großen RNA-Transkripte dienen bei der Translation der Bildung der entsprechenden Proteine. Aus der 3.5-kb RNA wird das Hepatitis-Core-Antigen (Nukleokapsidprotein), das Hepatitis-E-Antigen und die virale Polymerase (reverse Transkriptase) synthetisiert. Die viralen Oberflächenproteine entstehen aus der 2.4- und 2.1-kb RNA. Die kleinste RNA mit 0.7-kb ist notwendig für die Herstellung des HBx-Proteins. Alle viralen RNAs tragen eine Cap-Struktur und einen Poly-A-Schwanz (Valenzuela, 1990; Kidd-Ljunggren et al., 2002; Locarnini, 2004).

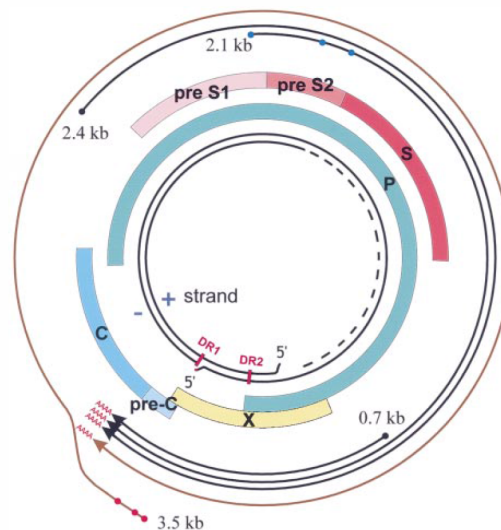


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des HBV-Genoms. Das Hepatitis-B-Virus-Genom ist aus einer zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA aufgebaut, einem kompletten kodierenden Minusstrang und einem unvollständigen Plusstrang (innere schwarze Linien). Es gibt zwei direkt wiederholte Sequenzen (*direct repeats*, DR1 und DR2), die bei der Replikation eine Rolle spielen. Die Polymerase ist am 5'-Ende des Minusstranges kovalent gebunden. Die vier zum Teil überlappenden Leseraster kodieren -> türkis: virale Polymerase, gelb: X-Protein, hellblau + blau: Early-Protein, blau: Core-Protein, rot: Oberflächenproteine (LHBS, MHBs, SHBs). Die äußeren schwarzen und braunen Kreise zeigen die unterschiedlich großen RNA-Transkripte (modifiziert nach Kidd-Ljunggren et al., 2002; mit Genehmigung der Society for General Microbiology).

4.1.5 Lebenszyklus von HBV

Der erste Schritt des Hepatitis-B-Virus ist die Anheftung an und Penetration durch die Zellmembran von Hepatozyten. Das geschieht mit Hilfe der PreS1-Domäne, von Fibronectin und durch die Bindung an NTCP (*Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*). Der genaue Ablauf ist noch ungeklärt (Budkowska et al., 1995; Watashi et al., 2014). Nach der Penetration wird die Hülle des Virus entfernt und das Nukleokapsid zum Zellkern transportiert. Hier bleibt es im Bereich des Kernporenkomplexes stecken und das Genom gelangt mit Hilfe des *nuclear localization signal* der viralen Polymerase in den Zellkern. Durch die Freisetzung der genomischen DNA aus dem HBc und der darauffolgenden Vervollständigung des Minusstranges kommt es zum Ringschluss. Die nun vorliegende Form der DNA wird als cccDNA bezeichnet. Sie dient als

Vorlage für die Transkription der viralen mRNAs und des RNA-Prägenoms. Die Transkription der cccDNA in prägenomische RNA wird durch die zelleigene RNA-Polymerase II im Zellkern vermittelt. Der Zusammenbau des Nukleokapsids wird durch die virale Polymerase, die an das Verpackungssignal ϵ der 3.5-kb RNA bindet, initiiert und die prägenomische RNA wird in das Viruskapsid integriert. Auf der einen Seite können die gebildeten Nukleokapside deassemblieren und die virale DNA wird wieder in den Zellkern verbracht. Diese ist notwendig, um eine genügend hohe Kopienzahl der cccDNA während der akuten Hepatitis-B-Infektionsphase zu gewährleisten. Auf der anderen Seite werden im Nukleokapsid die prägenomischen RNAs in das komplette virale DNA-Genom umgewandelt. Zuerst erfolgt durch die reverse Transkriptase die Transkription der prägenomischen RNA in einen kompletten Minusstrang, dieser wird danach mit Hilfe der viralen Polymerase auf nur wenige Nukleotide abgebaut. Diese dienen der viralen Polymerase als Primer, um den Plusstrang der DNA zu synthetisieren. Danach wird das Nukleokapsid mit den viralen Oberflächenproteinen am endoplasmatischen Retikulum umhüllt und als Dane-Partikel ins Blut sezerniert. Eine Vielzahl an subviralen Partikeln gelangt nach der Translation der mRNAs auch ins Blut (Abb. 4.4) (Rehermann and Nascimbeni, 2005; Beck, 2007; Schädler and Hildt, 2009; Lupberger et al., 2013).

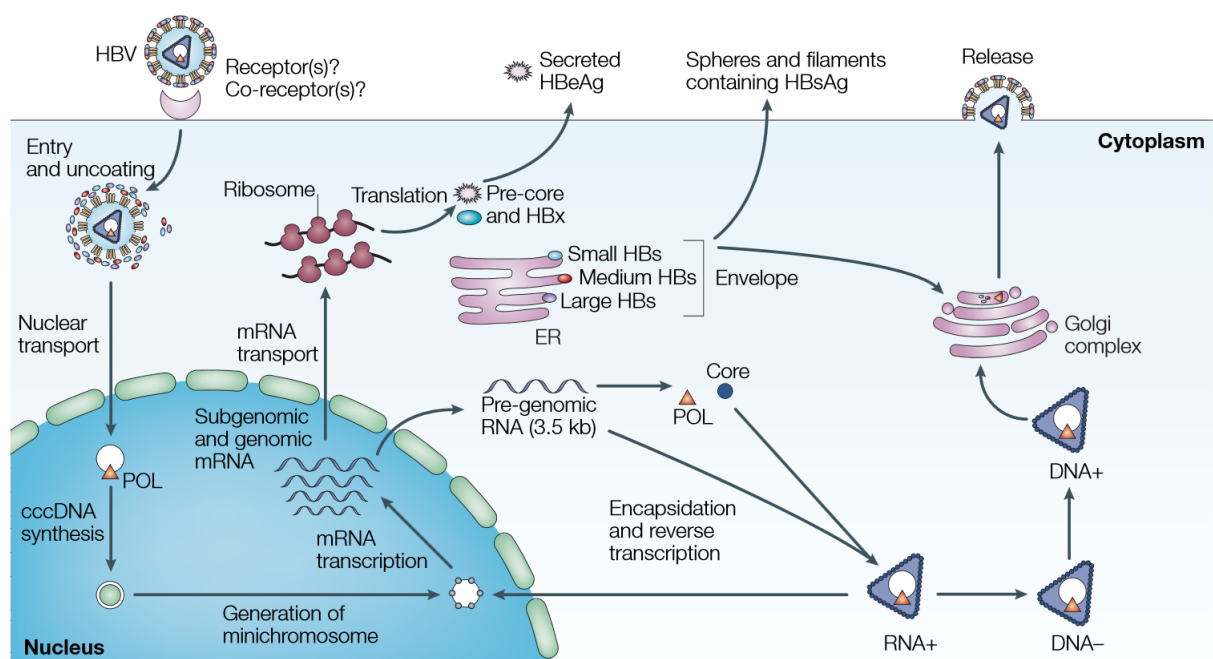


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des HBV-Replikationszyklus. Der komplexe Replikationszyklus von HBV beginnt mit der Anheftung, der Penetration und dem *uncoating* des behüllten Virus in den Hepatozyten. An diesem Punkt besteht die virale DNA in Form einer *relaxed circular DNA* und wird in eine *covalently closed circular DNA* (cccDNA) umgewandelt. Innerhalb des Zellkernes findet die Transkription der cccDNA zur prägenomischen RNA (pgRNA) und mRNA statt. Zurück im Zytoplasma erfolgt die Translation und Synthese der mRNAs. Die pgRNA wird zur viralen DNA mit Hilfe der viralen Polymerase umgebaut, gefolgt von der Bildung der Virushülle. Am Ende wird der komplette Dane-Partikel ins Blut entlassen. Eine Vielzahl von nicht-infektiosen subviralen Partikeln gelangt nach der Translation der mRNAs auch ins Blut. Ein weiterer Weg der pgRNA führt zurück in den Zellkern, um eine hohe Anzahl von cccDNA während einer akuten HBV-Phase gewährleisten zu können (modifiziert nach Rehermann and Nascimbeni, 2005; mit Genehmigung der Nature Publishing Group).

4.1.6 Epidemiologie

Die globale Bedeutung der viralen Lebererkrankung (HBV) ist aufgrund des pandemischen Charakters unumstritten. Das große Gefälle in der Prävalenz wird durch die ethnische Zugehörigkeit und das unterschiedliche Umweltgefahrenpotenzial stark beeinflusst. Die globale Verteilung zeigt, dass vor allem Alaska, Subsahara-Afrika und Südostasien zu den Endemiegebieten zählen. Dort sind schätzungsweise über 60 % der Bevölkerung infiziert, 8 - 15 % von ihnen chronisch. Russland, Indien und Länder an der Mittelmeerküste weisen eine mittlere Erkrankungsrate von 20 - 60 % der Bevölkerung auf. Dort sind 2 - 7 % chronisch erkrankt. Die Übersicht zeigt eine sehr geringe Infektionsrate in Ländern Nordamerikas, Westeuropas und Australiens. Hier hatten nur < 20 % der Menschen jemals Kontakt mit dem Erreger und < 2 % sind chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert (Abb. 4.5) (Kane, 1995).

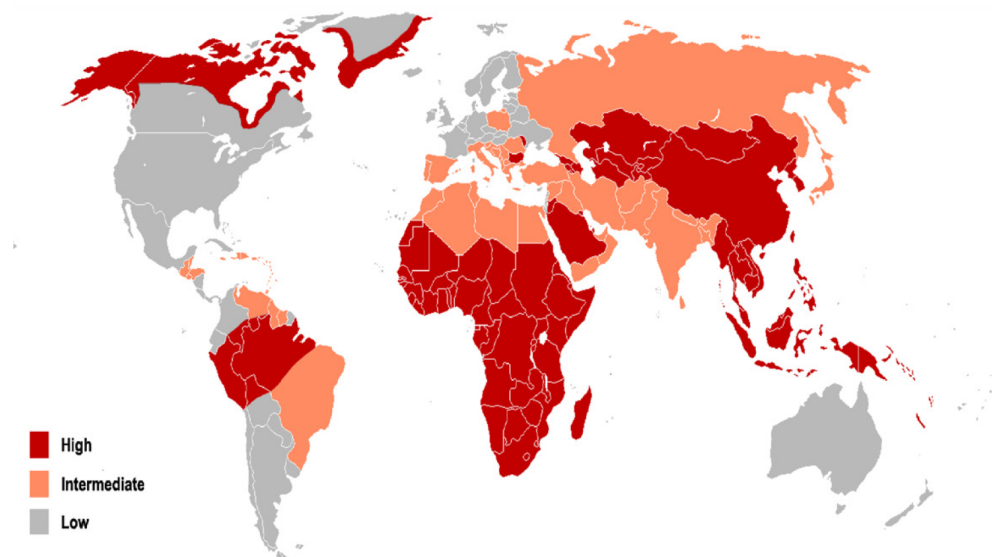


Abb. 4.5: Globale Hepatitis-B-Prävalenz. Die Weltkarte zeigt eine hohe Prävalenz in Entwicklungsländern und Teilen von Kanada, Alaska und Grönland. Dort sind über 60 % der Bevölkerung mit HBV infiziert, 8 - 15 % von ihnen chronisch. Eine mittlere Prävalenz ist in Russland, Brasilien und im Mittelmeerraum zu sehen. Es sind ca. 20 - 60 % der Bevölkerung infiziert, 2 - 7 % chronisch. Die geringste HBV-Prävalenz weisen Industrieländer und Teile Südamerikas auf mit < 20 % Infizierten und < 2 % chronisch Erkrankten (modifiziert nach Gerlich, 2013; mit Genehmigung von BioMed Central).

Die Abb. 4.6 gibt Aufschluss über die vorherrschenden Genotypen auf den Kontinenten. Es zeigt sich, dass der Genotyp A in Nordwesteuropa und laut Veröffentlichungen auch in Nordamerika dominiert. Zudem wurde dieser Genotyp auch in Teilen der Philippinen, in Hong Kong, Afrika und Asien nachgewiesen. Die Genotypen B und C sind für die meisten Infektionen in Südostasien und dem pazifischen Raum verantwortlich. Der Genotyp D ist vorwiegend der Auslöser einer Hepatitis-B-Erkrankung in Südeuropa, Afrika und Südostasien. Der Genotyp D ist weltweit anzutreffen. Der Genotyp E ist vor allem in Westafrika zu finden, der Genotyp F in Teilen von Süd- und Mittelamerika. Ursprünglich wurde der Genotyp G als Erstes in Frankreich und

den USA lokalisiert. Neueste Berichte zeigen auch ein Auftreten in Mexiko und Belgien. Der Genotyp H wurde in Amerika und Japan beschrieben (Norder et al., 2004; Pourkarim et al., 2014).



Abb. 4.6: Vorkommen der Hepatitis-B-Genotypen auf den Kontinenten. Genotyp A: Nordwesteuropa; Genotyp B und C: Südostasien, pazifischer Raum; Genotyp D: Südeuropa, Afrika und Südostasien ("?" bedeutet wahrscheinlich); Genotyp E: Westafrika; Genotyp F: Mittel- und Südamerika; Genotyp G: USA (modifiziert nach Gerlich, 2013; mit Genehmigung von BioMed Central).

4.1.7 Transmission

Viren können sich aufgrund ihrer fehlenden Stoffwechselaktivitäten nur innerhalb eines Wirtes vermehren. Deshalb ist eine effiziente Virusübertragung notwendig. HBV ist bis zu 100-mal infektiöser als das Humane Immundefizienz-Virus (HIV). Die Tenazität ist dagegen gering. Das bedeutet, HBV ist gegenüber Umwelteinflüssen nicht sehr widerstandsfähig und bleibt im getrockneten Blut in der Umwelt außerhalb seines Wirtes etwa eine Woche infektiös (Lin and Kirchner, 2004). Als sehr wichtige Infektionskette gilt die vertikale Transmission von einer infizierten Mutter auf ihr Kind (Umar et al., 2013). Die horizontale Transmission erfolgt direkt über kontaminiertes Blut oder Körperflüssigkeiten durch Aufnahme des Virus in die Blutbahn oder über kleinste Schleimhautverletzungen. HBV gelangt über die Blutbahn in die Leber. Beispielhaft seien hier die Risikogruppen der Drogenabhängigen durch gemeinsamen Nadelgebrauch und Menschen mit Kontakt zu Blut im Gesundheitssystem zu nennen sowie Hetero- und Homosexuelle bei der Ausübung von ungeschütztem Geschlechtsverkehr. Bei HBV besteht jedoch keine ernstzunehmende Gefahr der Infektion durch enterale Aufnahme durch kontaminiertes Wasser, Essen, Hände oder Oberflächen im Gegensatz zum Hepatitis-A-Virus (HAV) (Torpy et al., 2011; Kuehn, 2014).

4.1.8 Klinik

Die Inkubationszeit variiert zwischen 1 - 6 Monaten. Meistens liegt sie etwa bei 60 bis 90 Tagen (Aspinall et al., 2011). Hepatitis B hat eine große klinische Spanne. Unterschieden wird zwischen einer akuten und einer chronischen Infektion. Die Erkrankung kann sowohl inapparent als auch fulminant verlaufen. Eine sehr große Rolle spielen Alter, Immunstatus, HCC und Koinfektionen der Betroffenen. Eine neu erworbene Infektion im Erwachsenenalter hat eine gute Heilungsprognose. Die Ausheilung bei erworbener Infektion im Kindesalter ist jedoch sehr gering und nimmt meist einen chronischen Verlauf. Zum Beispiel zeigen nur < 10 % der Kinder unter fünf Jahren Symptome dieser Krankheit. Dadurch wird trotz des signifikant erhöhten Risikos, an chronischer HBV zu erkranken, die Infektion erst im Erwachsenenalter diagnostiziert. Wohingegen sich bei Erwachsenen mit 30 - 50 % ein klinisch apparter Verlauf zeigt. Das Risiko, dass sich eine chronische Infektion entwickelt, zeigt sich sehr stark bei Neugeborenen mit 80 - 90 %, dieses Risiko nimmt bei Kindern mit 30 - 60 % ab und ist bei Erwachsenen mit < 5 % am geringsten (Cornberg et al., 2011; Kwon and Lee, 2011; Samal et al., 2012). Das Hepatitis-B-Virus selbst ist nicht zytopathogen. Die Leberzellschädigung wird durch die Immunreaktion des Wirtes verursacht (Guidotti et al., 1996; Chang and Lewin, 2007).

Die klinischen Symptome im Prodromalstadium sind von anderen akuten viralen Leberentzündungen nicht zu unterscheiden. Leichte Anzeichen von Unwohlsein, Erschöpfung bis hin zu grippeähnlichen Erscheinungen wie Anorexie, Übelkeit und Vomitus kennzeichnen den beginnenden Krankheitsverlauf in den ersten Wochen. Die Lebermanifestation zeigt sich durch einen hepatozellulären Ikterus und die oft sehr schmerzhaft Hepatomegalie. Die akute HBV-Infektion heilt beim Großteil der Erwachsenen wieder vollständig aus. Nur 5 % von ihnen, darunter hauptsächlich Männer, entwickeln eine chronische Form. Etwa 10 - 20 % dieser Betroffenen erkranken an einer Leberzirrhose oder an einem hepatozellulärem Karzinom. Der Großteil der erwachsenen chronisch infizierten Patienten, etwa 80 - 90 %, erfahren eine vollständige Genesung über einen Zeitraum von 2 - 5 Jahren (Dienstag, 1981; Gitlin, 1997).

4.1.9 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Die Korrelation zwischen der Erkrankung einer chronischen Hepatitis-B-Infektion und dem Auftreten des hepatozellulären Karzinomes wurde in vielen Untersuchungen beschrieben. Ursprünglich galten nur Mykotoxine als mögliche Auslöser vom HCC. Jedoch fiel auf, dass sich das Leberzellkarzinom für gewöhnlich in Lebern mit großknotigen Zirrhosen entwickelte. Global betrachtet ist HBV in ca. 75 - 90 % die ätiologische Ursache für das Entstehen von Leberzellkarzinomen (Beasley, 1988). HCC ist weltweit die fünfthäufigste Krebsart bei Männern

und die achthäufigste bei Frauen. Mit rund 90 % ist es die vorherrschende Form aller Leberkrebs. Jährlich sterben über eine halbe Millionen Menschen daran. Das Risiko steigt um ein Hundertfaches an, wenn eine chronische HBV-Erkrankung zusammen mit einer Leberzirrhose vorliegt. Die Behandlungsmöglichkeiten sind aufgrund der Komplexität dieses Tumors stark eingeschränkt und zur Zeit gilt Sorafenib, ein Proteinkinasehemmer, als Mittel der Wahl für die HCC-Therapie, jedoch hat dieses Medikament viele Nebenwirkungen. Sorafenib verlangsamt das Wachstum der Krebszellen und unterbindet die Blutversorgung zu ihnen. Auch Leberresektion, -transplantation, Hochfrequenzablation und eine transarterielle Chemoembolisation werden zur Behandlung genutzt. Die genaue Therapie muss individuell angepasst werden und hängt vom jeweiligen Stadium ab (Jelic and Sotiropoulos, 2010; Villanueva et al., 2013; Daoudaki and Fouzas, 2014). Die Neuerkrankung und die Sterberate durch das hepatozelluläre Karzinom ist nur übertroffen vom Bauchspeicheldrüsenkrebs (Yeo et al., 2010).

4.1.10 Diagnostik

Wichtigstes Kriterium eines guten Diagnostikverfahrens ist die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse. Serologische Testverfahren sind für die diagnostische Untersuchung essentiell. Sowohl HBV-Antigene als auch Antikörper sind bei Raumtemperatur über mehrere Tage stabil. Die Lagerung bei +4 °C macht die Probe noch nach Monaten und im gefrorenen Zustand bei -20 bis -70 °C für mehrere Jahre nutzbar (Krajden et al., 2005). Eine Übersicht der Marker ist in Tab. 4.1 dargestellt.

Tab. 4.1: Übersicht der serologischen und virologischen Marker von HBV. In Klammern = auch in dieser Form möglich (modifiziert nach Krajden et al., 2005; Liang, 2009).

DIAGNOSTISCHE MARKER	AUFTRETEN
HBsAg	akute u. chronische Infektion
Anti-HBs	ausgeheilte HBV-Infektion o. Marker für die HBV-Impfung
HBV-DNA	zeigt Level der HBV-Replikation
Anti-HBc Total	(akute), ausgeheilte o. chronische Infektion
Anti-HBc (IgM)	akute, (chronische) HBV-Infektion
Anti-HBc (IgG)	ausgeheilte o. chronische HBV-Infektion
Anti-HBc (IgG) und HBsAg	chronische HBV-Infektion

PROGNOSTISCHE/
 ÜBERWACHENDE MARKER

HBeAg	hohes HBV-Replikationslevel u. Infektiösität; akute, (chronische) HBV-Infektion
Anti-HBe	niedriges HBV-Replikationslevel u. Infektiösität; Marker für Behandlungsantwort
HBV-DNA	akute, (überstandene) u. chronische HBV-Infektion

Das Mittel der Wahl, um eine Hepatitis-B-Infektion zu diagnostizieren, ist in den meisten Fällen die Blutuntersuchung des Patienten. Mit Hilfe eines *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA, Kap. 7.4.3) ist die Detektion vom vorhandenen Oberflächenprotein des Virus mit einer Sensitivität und Spezifität von über 98 % möglich. Ist der Nachweis vom HBsAg über einen Zeitraum von sechs Monaten hinaus gegeben, liegt eine chronische Hepatitis-Erkrankung vor. In diesem Fall kann die virale DNA im Serum durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Kap. 7.2.7) vervielfältigt und ermittelt werden. Bei der chronischen Form sind die Leberwerte beim Leberfunktionstest erhöht und die Leberbiopsie zeigt pathologische Befunde. Erhöhte Leberparameter, wie zum Beispiel ein hoher Alanin-Aminotransferase-Wert (ALT) oder ein gesteigerter Alpha-1-Fetoprotein-Status (AFP), weisen auf eine Zerstörung von Hepatozyten hin, nicht auf die Ursache der Lebererkrankung (Abb. 4.7 und 4.8). Welche Ausmaße und Veränderungen im Gegensatz zum physiologischen Zustand vorliegen, kann mit dem Einsatz von Ultraschall, Computertomographie und Magnetresonanztomographie näher bestimmt werden (Bialecki and Di Bisceglie, Adrian M, 2005; Mitka, 2014).

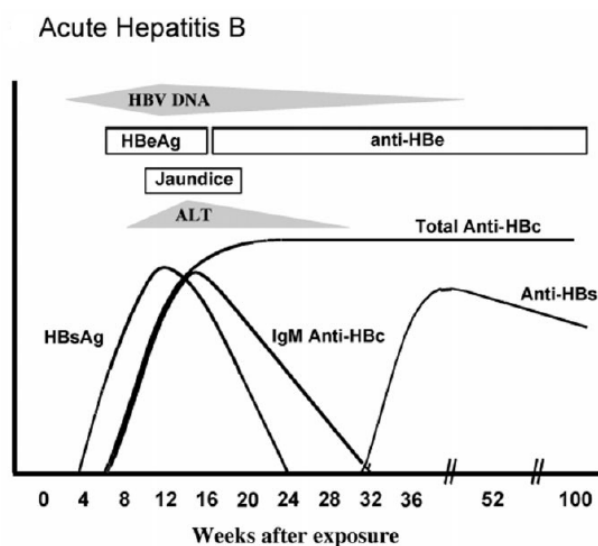


Abb. 4.7: Klinischer Verlauf und serologisches Profil einer akuten Hepatitis-B-Infektion. Erklärung siehe Text (modifiziert nach Liang, 2009; mit Genehmigung von John Wiley and Sons).

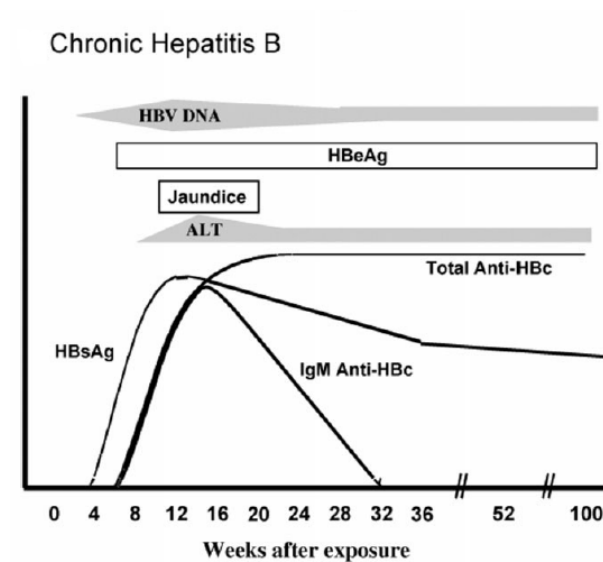


Abb. 4.8: Klinischer Verlauf und serologisches Profil einer chronischen Hepatitis-B-Infektion. Erklärung siehe Text (modifiziert nach Liang, 2009; mit Genehmigung von John Wiley and Sons).

4.1.11 Therapie

Die Art der Behandlung von Hepatitis-B-Infizierten ist individuell unterschiedlich. Bei einer akuten HBV-Erkrankung wird in der Regel keine Therapie begonnen. Die akute Form ist zu einem sehr großen Teil selbstlimitierend. Bei einem sehr milden Verlauf einer chronischen HBV-Erkrankung wird diese meist nur überwacht. Bei Verschlechterung des Patientenzustandes erfolgt eine Behandlung. Bei einem schweren Verlauf einer chronischen HBV-Infektion spielt die Funktionseinschränkung der Leber und die Höhe der nachweisbaren HBV-DNA im Blut eine entscheidende Rolle (Cornberg et al., 2011).

Für die Monotherapie stehen zur Zeit zwei antivirale Medikamentenklassen, die Interferone und die Nukleosid-/Nukleotidanaloga, zur Verfügung. Ziel der Behandlung ist die Bekämpfung des HBsAg im Blut des Patienten und der Aufbau eines entsprechenden Anti-HBs-Titers. Ein HBV-DNA-freies Blut ist als Indikator für eine erfolgreiche Virusreduktion anzusehen. Das Problem ist die cccDNA im Kern der Hepatozyten sowie die integrierte HBV-DNA im Genom. Die verwendbaren Medikamente können nur die Virusreplikation verhindern, nicht aber die HBV-DNA aus dem Kern entfernen. Es besteht mit diesen Medikamenten nur die Möglichkeit, den Krankheitsverlauf der chronischen Hepatitis B abzuschwächen und das Risiko von Spätfolgen zu minimieren (Bayliss et al., 2013). Mögliche Koinfektionen zum Beispiel mit HIV oder dem Hepatitis-C-Virus erschweren zusätzlich die Behandlung (Crockett and Keeffe, 2005; Sun et al., 2014).

4.1.12 Prävention

Die Aufklärung ist der Schlüssel für erfolgreiche Strategien zur Bekämpfung von HBV-Erkrankungen. Das Einhalten von Hygienerichtlinien und Impfungen ist von größter Bedeutung, um flächendeckend das Risiko, an einer Hepatitis-B-Infektion zu erkranken, zu minimieren. Das beste Mittel zum Schutz der Menschen ist eine Unterbrechung der Übertragung des Virus. Nicht nur der Schutz von Nichtinfizierten steht im Fokus, auch eine gute Überwachung der HBV-Patienten muss gegeben sein. Es sollte alle sechs Monate eine Kontrolle beim Arzt erfolgen, um frühzeitig Leberveränderungen zu erkennen und nächste Behandlungsschritte einzuleiten (Hwang, 1999).

Der momentan verwendete Impfstoff besteht nur aus den nicht-infektiösen Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus. Die Impfung erfolgt nach null, eins und sechs Monaten (WHO, 2009; Komatsu, 2014). Laut Empfehlung der WHO sollen alle Neugeborenen ihre erste HBV-Impfung so schnell wie möglich bekommen. Innerhalb der ersten 24 h nach Geburt sollte die Injektion erfolgen. Der ersten Impfdosis folgen zwei oder drei weitere, um eine Grundimmunisierung aufzubauen. Die Anti-HBs-Prävalenz ist der wichtigste Baustein, um den Erfolg der Immunisierung messen zu können (WHO, 2010). In Deutschland besteht keine Impfpflicht. Es gibt aber Empfehlungen von der Ständigen Impfkommission am Robert-Koch Institut zu Schutzimpfungen. Diese sehen eine Impfung gegen Hepatitis B vor (Robert-Koch-Institut, 2013). Rund 90 - 95 % der Bevölkerung zeigen eine gute Immunantwort auf den verfügbaren Impfstoff.

Die Gruppe der *non-responder* sind Patienten, die nach einer mehrmaligen Impfung einen Anti-HBs-Titer < 10 mIU/ml zeigen. Diese Personen haben keine ausreichende Immunität gegen HBV entwickelt. Neueste Forschungen versuchen einen Weg über die intradermale Route im Gegensatz zur konventionellen intramuskulären Verabreichung zu finden, um die Immunantwort in *non-respondern* zu steigern sowie das LHBsAg als Impfstoffkomponente einzubeziehen (van Herck et al., 2007; Filippelli et al., 2014).

4.2 Paxillin

4.2.1 Einleitung

Die komplexen Interaktionen zwischen Zellen und der umgebenden extrazellulären Matrix sind von großer Bedeutung hinsichtlich der aktivierenden und regulierenden Prozesse bei der Zellhaftung, -wanderung, -morphogenese, Wundheilung sowie der Tumorentstehung. Sie werden durch chemische und mechanische Stimulation mediiert. Die extrazelluläre Matrix setzt sich aus einer Vielzahl von Matrixmolekülen zusammen, hier unterscheidet man die Glykoproteine wie Fibronectin, Kollagen, Laminin und Proteoglykane. Zu den Nicht-Matrixproteinen gehören

zum Beispiel die Wachstumsfaktoren (Berrier and Yamada, 2007). Liegen funktionelle Defekte oder Störungen in diesem komplexen System der Zellerhaltung und -umgebung vor, droht eine negative Entwicklung in Form von Dysplasie, Gewebedegeneration und Hypertrophie bis hin zur Metastasierung.

Ein wichtiger Baustein bei der Zellintegrität und Signaltransduktion ist Paxillin, es ist dem Zytoskelett der Zelle zugeordnet und an den *focal adhesions* (FAs oder Zell-Matrix-Adhäsionen) lokalisiert (Abb. 4.9). Dort dient es als signaltransduzierendes Adapterprotein. An den FAs werden sowohl mechanische als auch regulatorische Signale zwischen dem extrazellulären Raum und der Zelle vermittelt und eine Antwort der Zelle auf die äußeren sich ändernden Umstände mediiert. Bedingt durch den ständigen Signalaustausch verknüpfen und trennen sich beteiligte Proteine von den *focal adhesions*. Dies zeigt den enormen funktionellen Aufgabenbereich wie die Zellverankerung und Signalübermittlung, die das Verhalten der Zelle steuern. Die fokalen Adhäsionsproteine werden in zwei Gruppen geteilt. Zu den strukturellen Proteinen zählen z. B. Tensin, Vinculin und α -Actinin und zu den regulatorischen Proteinen die Focal Adhesion Kinase (FAK) und Paxillin (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996). In ruhenden Zellen weisen FAs eine stabile Struktur auf. In beweglichen Zellen jedoch ist ein ständiger Auf- und Abbau notwendig, um die Bewegung der Zelle zu ermöglichen (Webb et al., 2002).

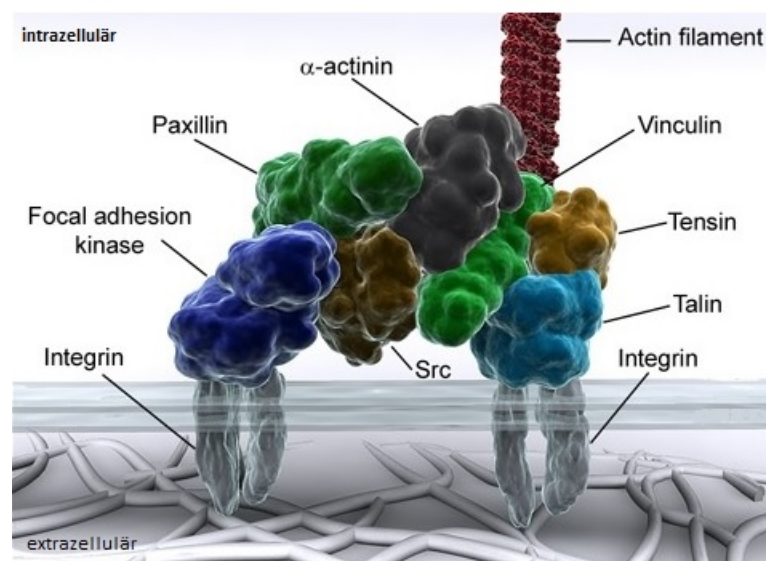


Abb. 4.9: Aufbau von fokalen Adhäsionen. Fokale Adhäsionen verbinden das Zytoskelett der Zelle mit dem extrazellulären Raum. Durch sie finden eine Zellverankerung und ein ständiger Signalaustausch mit der Umwelt statt, welcher das Verhalten der Zelle steuert. Die fokalen Adhäsionsproteine werden in zwei Gruppen geteilt. Zu den strukturellen Proteinen zählen Tensin, Vinculin und α -Actinin und zu den regulatorischen Proteinen die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) und Paxillin. Die Integrine verbinden die EZM mit dem Zellinneren durch ihre transmembrale Lage (modifiziert nach University of Reading, 2015).

4.2.2 Aufbau und Struktur

Paxillin wurde 1990 von Keith Burridge entdeckt. Es ist an den *focal adhesions* lokalisiert und dient durch seine Vielzahl an Bindungsstellen als Adaptor für strukturelle und regulatorische Proteine. Das Protein besteht aus 559 Aminosäuren und ist 68 kDa groß. Es weist eine bis zu 90%ige Sequenzübereinstimmung zwischen Hühnern und Menschen auf. Neben der ubiquitären α -Form gibt es zwei zusätzliche Spleißvarianten, die β - und γ -Isoform. Sie konnten bis jetzt in Mäusen und Menschen nachgewiesen werden. Wie in Abb. 4.10 zu sehen ist, besitzen sie zusätzliche Sequenzen im Amino-Terminus (N-Terminus). Diese Proteinfamilie umfasst auch Hic-5, Leupaxin und PaxB, welche eine Vielzahl von strukturellen Eigenschaften und Bindungspartner von Paxillin teilen. Es wird vermutet, dass diese Proteine durch Antagonisierung von Paxillin dessen Funktion erst vollständig ermöglichen (Turner, 2000).

Der Amino-Terminus besitzt fünf leucinreiche Regionen, sogenannte *LD motifs*, welche bei der Proteinidentifizierung helfen. Hier binden Partner wie Vinculin, FAK und Actopaxin. Im N-terminalen Abschnitt befindet sich auch eine prolinreiche Domäne, welche als SH3-Bindungsstelle (*Src-homology 3*) dient. Daneben gibt es einige SH2-Bindungsdomänen (*Src-homology 2*), welche durch Phosphorylierung von Tyrosinresten (PY) gebildet werden. Sie sind notwendig für die Verknüpfung mit den zytoplasmatischen Kinasen, Src und Csk sowie dem Adaptorprotein Crk. Der Carboxyl-Terminus (C-Terminus) besteht aus vier cysteinreichen Regionen, jede mit zwei Zinkfingern, sie werden als *LIM domains* bezeichnet. Sie sind wichtig für die Protein-Protein-Interaktionen und verbinden Paxillin mit unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden. Die FA-Zielsequenz ist auf der C-Terminushälfte lokalisiert. Durch die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in diesem Bereich wird die Bindungsbereitschaft mit den *focal adhesions* verstärkt. Die *LIM domain 3* spielt eine große Rolle, um Paxillin in die FAs einzubauen (Schaller, 2001; Brown and Turner, 2004; Webb et al., 2005).

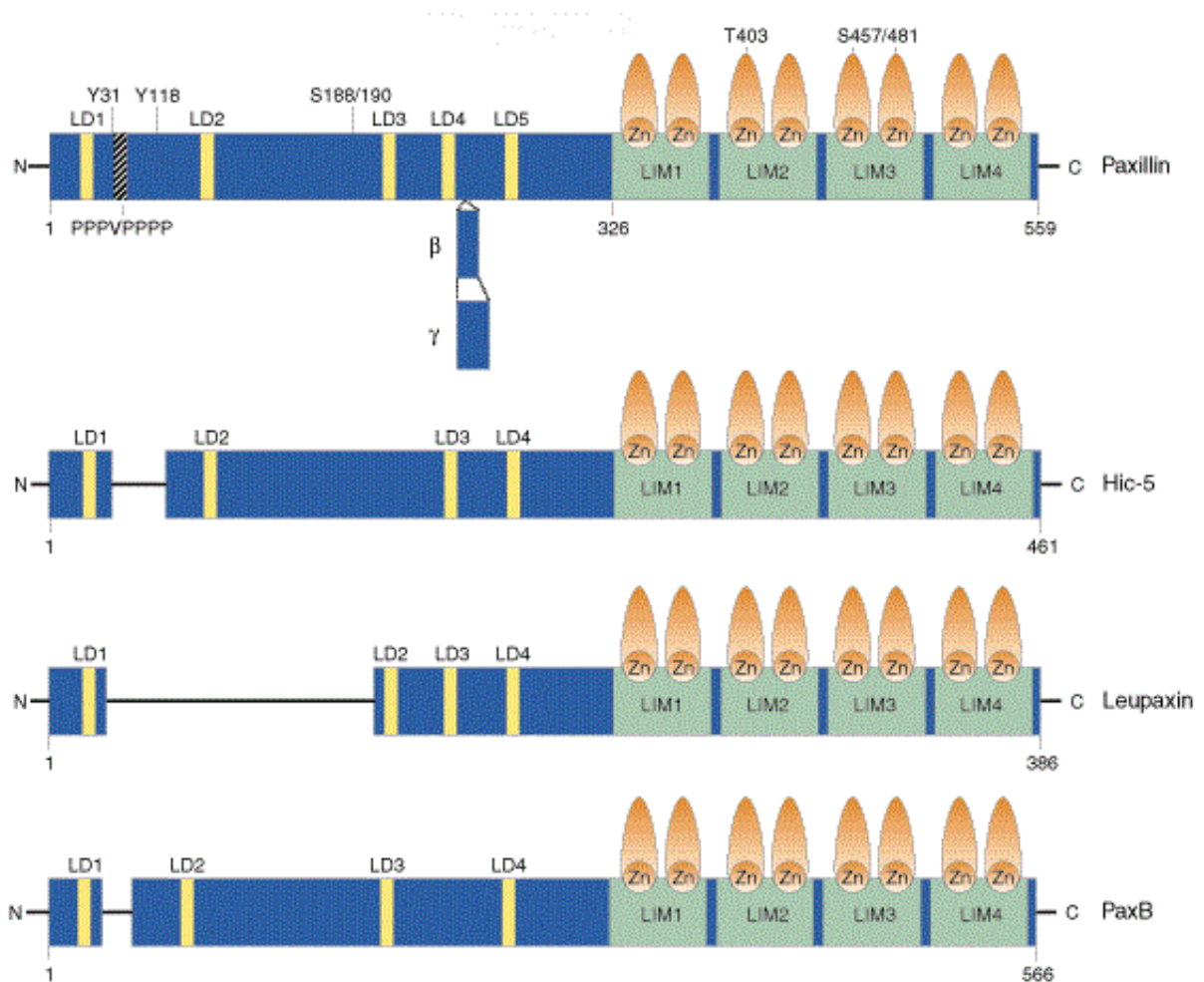


Abb. 4.10: Struktur und Aufbau der Paxillinfamilie. Paxillin besteht aus 559 Aminosäuren und ist 68 kDa groß. Es gibt die α -, β - und γ -Isoform. Paxillin besitzt im N-terminalen Teil fünf leucinreiche Regionen (*LD motifs*), eine prolinreiche Domäne und einige SH2-Bindungsdomänen. Der C-terminale Teil ist aus vier cysteinreichen Regionen, jede mit zwei Zinkfingern (*LIM domains*), aufgebaut. Die FA-Zielsequenz ist auf der C-Terminushälfte lokalisiert. Die Proteine Hic-5, Leupaxin und PaxB weisen ähnliche Strukturen auf, wobei in der Abb. zu sehen ist, dass die SH3-Domäne und die entscheidenden Phosphorylierungsstellen fehlen (modifiziert nach Turner, 2000; mit Genehmigung der Nature Publishing Group).

4.2.3 Interaktion und Funktion

PXN ist ein Mitglied der fokalen Adhäsionsproteine und wurde durch die erhöhte Tyrosinphosphorylierung durch die v-Src-Expression entdeckt. Es wurde zuerst im glatten Muskelgewebe isoliert. Die Abb. 4.11 zeigt eine kleine Übersicht der für die Arbeit relevanten Bindungspartner von Paxillin. Die Regulation und Lokalisation der Proteine in den *focal adhesions* kann nur schemenhaft dargestellt werden und ist bei weitem komplexer. Die Anzahl der Proteine, ihre Funktion und Bindungspartner hängen vom Zustand der Zelle ab (Brown and Turner, 2004).

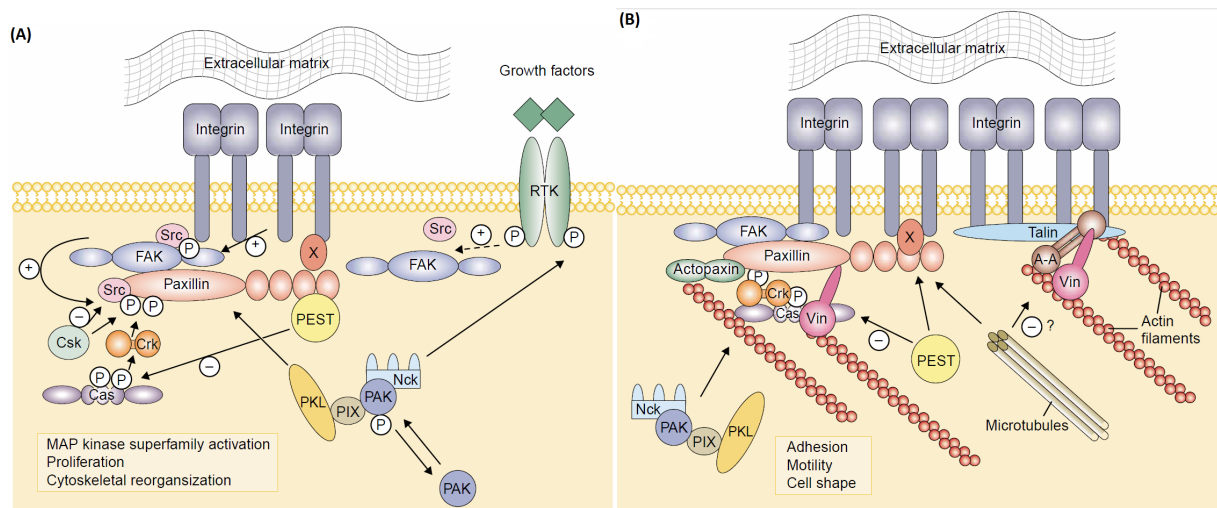


Abb. 4.11: Paxillinbindungspartner. (A) Paxillin ist ein Adaptor für eine Vielzahl von Proteinen, die an der Integrin- und Wachstumsfaktorsignaltransduktion beteiligt sind. Die Proteine *Focal Adhesion Kinase* (FAK), Src und die Tyrosinkinase ABL (*Abelson murine leukemia*, nicht dargestellt) werden durch die Verbindung der EZM mit Integrin oder durch die Stimulation des Wachstumsfaktors durch die Rezeptortyrosinkinase (RTK) aktiviert. Adaptorproteine wie Crk können durch die Phosphorylierung von Paxillin, welche durch FAK und Src erfolgt, Bindungsstellen an den *focal adhesions* besetzen. Zudem phosphoryliert Src das Adaptorprotein Cas und der Komplex aus Crk und FAK binden es. Dieser nun entstandene Proteinkomplex aktiviert den MAP-Kinase-Weg (*mitogen-activated protein kinase*). Eine Inaktivierung von Cas erfolgt durch die paxillinabhängige Tyrosinkinase Csk an die FAs und die Tyrosinphosphatase PTP-PEST. Es wird vermutet, dass die Wachstumsfaktor- und Integrinsignalübertragung verstärkt werden kann, wenn Paxillin den PKL-PIX-PAK-Nck-Komplex an sich bindet. PAK aktiviert den MAPK-Weg und ist für die Rac-vermittelte Reorganisation des Zytoskelettes verantwortlich. (B) Vinculin und Actopaxin sind an Paxillin und Aktinfilamente gebunden. Die Integrine werden durch Talin und α -Actinin an Aktin gebunden. Die Zellbewegung ist durch die phosphorylierungsabhängige Verbindung von Crk an Paxillin bedingt. Der Umbau der *focal adhesions* wird durch Paxillin, den PKL-PIX-PAK-Nck-Komplex und die PTP-PEST ermöglicht. Die Dephosphorylierung von Cas lässt die Cas-Crk-Verbindung abreißen. Auch die Bindung von Mikrotubuli an Paxillin kann die Destabilisierung der FAs hervorrufen und die Zellbewegung steuern (modifiziert nach Turner, 2000; mit Genehmigung der Nature Publishing Group).

Paxillin LD motifs

Der N-terminale Teil von Paxillin beinhaltet fünf leucinreiche Sequenzabschnitte (Tab. 4.2), sie sind als Bindungsstellen für Struktur- und Regulationsproteine wichtig. Diese steuern Änderungen des Aktinzytoskeletts und somit auch die Zellbewegung und -adhäsion sowie die Expression von Genen. Es wird vermutet, dass die Interaktion mit Paxillin der Schlüssel zu einer normalen subzellulären Lokalisation der Adhäsionsproteine (Vinculin, Actopaxin, Integrin-linked Kinase und Paxillin-Kinase Linker) ist (Tumbarello et al., 2002).

Tab. 4.2: Übersicht der direkten und indirekten Bindungspartner der Paxillin *LD motifs*. FAK = Focal Adhesion Kinase, PIX = *PAK interacting exchange factor*, PKL = Paxillin-Kinase Linker, PAK = *P21 activated kinase*, Nck = *non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein* (modifiziert nach Turner, 2000).

PAXILLIN LD MOTIFS	DIREKTE BINDUNGSPARTNER	INDIREKTE BINDUNGSPARTNER
LD1	Actopaxin, Vinculin, Papillomavirus E6 Protein	Aktin (über Actopaxin + Vinculin)
LD2	Vinculin, FAK	—
LD3	—	—
LD4	Vinculin (schwach), FAK, PKL	PIX (über PKL), PAK (über PIX), Nck (über PAK)
LD5	—	—

Paxillin *LIM domains*

Die Serinreste 188 und 190 im N-terminalen Teil von Paxillin gelten als Hauptphosphorylierungsstellen bei der Adhäsion an Fibronectin. Erst nach Bindung an Fibronectin wird über die Phosphorylierungsstellen der *LIM domains* im C-terminalen Teil von Paxillin die Lokalisation an den *focal adhesions* bestimmt. Der C-terminale Teil von Paxillin besteht aus vier cysteinreichen Regionen, jede mit zwei Zinkfingerdomänen. Die LIM3-Domäne ist unerlässlich für die Bindung von Paxillin an die *focal adhesions*. Die Phosphorylierung der LIM2- und der LIM3-Region erfolgt durch Serin-(PS)/Threoninkinasen (Brown et al., 1998; Turner, 1998).

Paxillin-binding Subdomain (P-BS)

Die *Paxillin-binding Subdomain* dient den Proteinen als Verbindungsmodul mit den Paxillin *LD motifs*. Sie wurde zuerst bei Vinculin und FAK entdeckt. P-BS ähnliche Sequenzen konnten auch bei anderen *LD motif*-bindenden Proteinen wie Actopaxin, ILK und PKL nachgewiesen werden. Bis heute ist jedoch der genaue Verbindungsmechanismus zwischen der *Paxillin-binding Subdomain* und den *LD motifs* von Paxillin ungeklärt. Es wird vermutet, dass die Heterogenität zwischen den einzelnen P-BSs der Proteine die Grundlage für die selektive Bindung an bestimmte *LD motifs* von Paxillin bildet (Tumbarello et al., 2002).

Integrin

Integrine sitzen fest verankert in der Zellmembran und setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen. Diese wiederum besitzen eine große extrazelluläre Domäne für die Verbindung mit Matrix-Proteinen (z. B. Laminin oder Fibronectin) und eine kleine intrazelluläre

Domäne für die Verknüpfung mit den Signalproteinen und dieser mit dem Aktinzytoskelett. Sie werden den Transmembranproteinen zugeordnet und verbinden Zellen untereinander sowie mit der EZM. Integrine können so durch die Umwandlung von äußeren mechanischen Reizen in innere chemische Signale die Signaltransduktion ermöglichen, sie sind ein essentieller Bestandteil der *focal adhesions*. An den FAs erfolgt die An- und Abkopplung der Proteine an der zytoplasmatischen Seite durch posttranslationale Modifikationen der Integrine, insbesondere durch Phosphorylierung. Wichtig in diesem Zusammenhang der Regulierung der Integrin-assoziierten Proteine sind die Fokal Adhesion Kinase und die Integrin-linked Kinase. Eine direkte Bindung von Paxillin an die intrazelluläre Domäne von β 1- und β 3-Integrin mit α 4-Untereinheit konnte gezeigt werden. Hier agiert Paxillin in der Funktion der Regulation der Zellvermehrung und -bewegung (Schaller, 2001; Brown and Turner, 2004). Die Bindung von Integrinen an extrazelluläre Matrixliganden (z. B. Fibronectin) wird durch den Anstieg von Tyrosin-phosphorylierten Formen der beteiligten fokalen Adhäsionsproteine vermittelt. Besonders hoch ist die Tyrosinphosphorylierungsrate bei der Fokal Adhesion Kinase und Paxillin bei entsprechender Integrinaktivität (Bellis et al., 1995).

Focal Adhesion Kinase (FAK)

Die Phosphorylierung von Paxillin ist eng gekoppelt mit der FAK-Aktivität. Die Aktivität von FAK wird durch das Zusammenlagern von Integrinen (*clustering*) hervorgerufen. Diese Aktivierung kann die Bindung von der Tyrosin-Protein Kinase Src zur Folge haben. Im N-terminalen Teil von Paxillin wurden die Phosphorylierungsstellen (PY31 und PY118) für FAK nachgewiesen. Die Bindung an die LD2- und LD4-Domäne von Paxillin geschieht mit Hilfe der *focal adhesion targeting* (FAT) *domain* im N-terminalen Teil der Fokal Adhesion Kinase. FAT stellt über Paxillin und Talin die Verknüpfung zur β -Untereinheit der Integrine her. Die Phosphorylierungsstellen im *LD4 motif* von Paxillin fördern neben der GIT1-Bindung auch die Reduzierung der Anziehung, FAK an dieses Motiv zu binden. Das deutet darauf hin, dass Paxillin so den GIT1-medierten Signalweg unterstützt und gleichzeitig die Aktivität und Lokalisation von FAK bestimmen kann, welches selbst eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der RhoA-Aktivität einnimmt. FAK selbst benötigt nur eine *LD motif*-Bindungsstelle, um einen Platz in den *focal adhesions* einzunehmen. Jedoch ist eine Verknüpfung von FAK mit beiden *LD motifs* für seine vollständige Beteiligung am Signal- und *Downstream*-Weg notwendig. Es scheint so, als besitze Paxillin, die Möglichkeit durch seine Phosphorylierung am *LD4 motif*, die Lokalisation von FAK und Rac1 fein regulieren zu können und damit die Interaktionen bezüglich des GIT1-PIX-PAK-Nck-Komplexes zu steuern. Das zeigt, dass die Tyrosinphosphorylierung durch FAK und Paxillin sowohl eine Änderung in der Formationsanordnung der *focal adhesions* als auch bei der Assemblierung an die Aktinfilamente bedingt (Bellis et al., 1995; Deakin and Turner, 2008).

Integrin-linked Kinase (ILK)

Die Integrin-linked Kinase ist eine Serin-/Threoninkinase. Der N-terminale Teil mit seinen vier *Ankyrin-Repeats* interagiert mit dem *LIM-only adaptor PINCH* (*particularly interesting cysteine- and histidine-rich protein*) und Parvin (Legate et al., 2006). Die Carboxyl-Domäne beinhaltet die Kinaseaktivität und zudem die Bindungsstelle für die β 1-Integrinuntereinheit. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass die Integrin-linked Kinase direkt an das *LD1 motif* von Paxillin gebunden ist, dies geschieht über eine paxillin-bindene Subdomäne im C-terminalen Teil. Zudem zeigte die Co-Immunpräzipitation von Lysaten aus Fibroblasten, dass die Verbindung von IKL und PXN *in vivo* sowohl in adhärennten Zellen als auch in Zellsuspension besteht. Die Immunfluoreszenzmikroskopie untermauerte die Kolo-kalisation der beiden Proteine. ILK wird mit Funktionen im Integrin-, Wachstumsfaktor- und Wnt-Signaltransduktionsweg assoziiert. Auch bei Integrin-medierten Zellvorgängen wie die Zelladhäsion, die Assemblierung an die Fibronectinmatrix und die zelladhäsionsabhängige Zellzyklusentwicklungen spielt es eine Rolle. Für den gezielten Einsatz an den *focal adhesions* muss die Integrin-linked Kinase an Paxillin gebunden sein (Nikolopoulos and Turner, 2001).

Vinculin

Vinculin zählt zu den strukturellen Adhäsionsproteinen. Es erfüllt hauptsächlich Aufgaben im Aufbau und in der Verknüpfung von Proteinen und Zellen. Vinculin wird durch die *vinculin tail*-Domäne (Vt) an Paxillin gebunden und bindet auch an die Aktinfilamente (HOELLERER et al., 2003).

Parvin

Parvin liegt in der α - und β - Form vor. Dieses Protein bindet an die zytoplasmatischen Domänen der β 1- und β 3-Integrinuntereinheiten und kann auch direkt an Aktinfilamente gebunden sein. Es mediiert zudem die Verknüpfung von anderen aktinbindenden-Proteinen sowie α -Actinin oder Vinculin, welches wiederum mit Paxillin interagiert (Widmaier et al., 2012).

Actopaxin

Dieses Protein ist mit Aktin verknüpft. Actopaxin weist eine fehlerhafte Paxillinbindung bei einer Überexpression der *Paxillin-binding Subdomain* auf. Die Folge ist eine gestörte Zelladhäsion und -vermehrung von Kollagen. Die Vermutung liegt nahe, dass dies durch die defekte aktopaxinabhängige Kernbildung und Assemblierung der Aktinfilamente geschieht (Tumbarello et al., 2002). Actopaxin wird durch seine zweite CH-Domäne an Paxillin gebunden (HOELLERER et al., 2003).

CRK

Die Tyrosinreste im N-terminalen Teil von Paxillin dienen als SH2-Bindungsdomänen für das Adapterprotein Crk an Paxillin, welche durch die Anbindung von FAK phosphoryliert wurden. Crk spielt bei der Modulation der Ras-Familie in der Signaltransduktion eine Rolle (Brown et al., 1998).

F-Aktin

Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Es ist Bestandteil des Zytoskeletts. F-Aktin steht für aneinander gereihete dynamische Aktinfilamente, welche die Zellform, die Ausbildung der Zellfortsätzen, intrazelluläre Verlagerungen und gerichtete zelluläre Bewegungen stabilisieren.

Paxillin-Kinase Linker (PKL)

Der Paxillin-Kinase Linker bindet nur an die LD4-Domäne von Paxillin. So entsteht eine Interaktion von Paxillin mit einem Proteinkomplex bestehend aus dem Rac-Faktor, PAK und dem SH2-SH3 Adaptorprotein Nck sowie dem PIX/COOL. Die sogenannten PIX/COOL-Proteine binden an die kleinen Rho-GTPasen und Kinasen der Pak-Familie (Tumbarello et al., 2002).

Tyrosinkinase c-Src (*cellular and sarcoma*)

Die Tyrosinkinase liegt im Zytosol der Zelle vor und ist mit der Zellmembran assoziiert. C-Src wird durch das gleichnamige Protoonkogens SRC kodiert. Es ist aus vier Src-Homologiedomänen (SH1-4) aufgebaut. Die SH1-Domäne beinhaltet die Kinaseaktivität und steuert die Phosphorylierung von Tyrosin. Die SH2- und SH3-Region dienen als Bindungsstellen und bedingen so die Regulation von c-Src. Um die Verankerung in der Zellmembran sicherzustellen, ist die SH4-Domäne verantwortlich. Mit Hilfe der Phosphorylierung und Dephosphorylierung eines Tyrosinrestes im C-terminalen Teil wird die Tyrosinkinase aktiviert oder inaktiviert. C-Src hat viele Bindungspartner, wie zum Beispiel FAK und Cas und kann durch diese, unabhängig von der eigenen Phosphorylierung, kompetitiv gebunden und aktiviert werden. Mit Hilfe der Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Teil von Paxillin kann Src gebunden werden. Csk ist ein negativer Regulator von c-Src (Turner, 1998; Roskoski, 2004).

Andere Bindungspartner

Tubulin nutzt die LIM2- und LIM3-Domäne als Bindungspartner von Paxillin, PTP-PEST ist über LIM3 und LIM4 verknüpft (Brown and Turner, 2004). Paxillin hat die Fähigkeit,

GIT-Proteine an die *focal adhesions* zu binden und dient somit bei der Disassemblierung und der Verhinderung der Zellmobilität. Das *G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein* (GIT1) bindet an das *LD4 motif* von Paxillin (Deakin and Turner, 2008).

Die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix ist eine essentielle Grundlage für die Regulierung des Zellverhaltens. Dazu gehören zum Beispiel Zellbewegung, -proliferation und -differenzierung. Somit stellt Paxillin einen entscheidenden Faktor in diesem Komplex dar.

4.2.4 Erkrankungen und Zukunft

Die physiologischen Funktionen von Paxillin sind überlebenswichtig für die Zelle. In der embryonalen Phase hilft das Protein bei der Steuerung der normalen Entwicklung des Individuums. Fehlt Paxillin im frühen Embryonalstadium, ist eine hohe Letalität die Folge (Hagel et al., 2002). Durch seine Position in den *focal adhesions* ist es auch wichtig für den Eintritt bestimmter Viren in die Zelle, dies konnte am Beispiel des humanen Zytomegalievirus (HZMV) nachgewiesen werden. Durch fehlerhafte Paxillinexpression oder Defizite im Intergin-Src-Paxillin-Signalweg ist ein verringerter Eintritt von HZMV in die Monozyten die Folge (Nogalski et al., 2011). Schon lange ist bekannt, dass die Zelladhäsion eine ganz entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung einnimmt. Paxillin ist in fast allen Zellen vorhanden, nur im Nervensystem findet man es in sehr geringer Konzentration. Viele der Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Teil von Paxillin konnten in Tumoren und Krebszelllinien detektiert werden. Der Tumor muss eine genaue Steuerung der Paxillinexpression regulieren, um eine bestmögliche Invasions- und Wachstumsrate zu erlangen. Somit konnte bewiesen werden, dass die Expression von Paxillin und Änderungen des Phosphorylierungszustandes eng mit einer Vielzahl von malignen humanen Krebserkrankungen verknüpft sind (Tab. 4.3) (Turner, 1991; Deakin et al., 2012). Forschungsergebnisse zeigen, dass Paxillin unter anderem Einfluss auf den Verlauf von Brust-, Lungen- und Magenkrebs hat (Salgia et al., 1999; Vadlamudi et al., 1999; Xiao et al., 2014).

Tab. 4.3: Variabilität der Paxillinexpression in humanen Krebsarten. Die Zahlen geben Auskunft über die vorhandenen Studien mit signifikanter Paxillinexpressionsänderung in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe. Rot = erhöhte Paxillinexpression, blau = verringerte Paxillinexpression (modifiziert nach Deakin et al., 2012).

KREBSARTEN	PAXILLIN	
	up↑	down↓
Bauspeicheldrüsenkrebs	1	
Brust	1	6
Eierstock	6	
Gebärmutterhals	2	1
Gehirn u. ZNS	5	
Leukämie		10

Eine Überexpression der FAK konnte in einer Vielzahl von humanen Krebsarten nachgewiesen werden, dazu zählt auch HCC. Interessanterweise konnte auch die signifikant erhöhte Expression von Paxillin in HCV-bedingten HCCs bestätigt werden (Alisi et al., 2012). Eine chronische Hepatitis-B-Erkrankung ist in den meisten Fällen die ätiologische Ursache eines HCCs (Kap. 4.1.9). Da sowohl der genaue Eintritt des Virus in die Leberzelle als auch das Wachstum eines hepatozellulären Karzinoms noch nicht vollständig geklärt werden konnte, kann die Untersuchung von Paxillin in diesem Zusammenhang neue Hinweise geben. Es ist bekannt, dass Fibronektin zu einer direkten Interaktion mit vielen Viren wie zum Beispiel mit HIV, dem Rous-Sarkom-Virus, Myxoviren, Paramyxoviren und HAV fähig ist. Forschungsergebnisse zeigen, dass HBV an das extrazellulär gelagerte Fibronektin in den humanen Lebersinusoiden über die PreS2-Domäne bindet. Die Lebersinusoiden werden mit Blut durchströmt und ermöglichen dadurch eine Kontaktfläche von den im Blut zirkulierenden Hepatitis-B-Viren mit Fibronektin und Heparansulfat-Proteoglykanen (Abb. 4.12). Diese Andockstellen sind äußerst wichtig und man vermutet, dass hierdurch eine direkte Verbindung vom HBV im Blut mit den unzähligen Rezeptoren in der Leberzellmembran geschaffen wird. Hier sind auch die äußerst funktionsreichen *focal adhesions* eingelagert. Fibronektin hilft dadurch zusammen mit spezifischen Leberzellrezeptoren bei dem Viruseintritt in die Hepatozyten. Dieses unlösliche Fibronektin wird durch Chondrozyten, Makrophagen oder Endothelzellen gebildet und kann sowohl Zellen an die EZM binden als auch eine Verbindung zu Paxillin in den *focal adhesions* schaffen (Kap. 4.2.3). Das bedeutet, ein Weg der Fibronektin-Paxillin-Interaktion ist über eine noch unbekannt Kinase möglich, der zweite Weg führt über die Fibronektin-Integrin-Verknüpfung zu einem so medierten Einfluss auf Paxillin (Kap. 4.2.3 und 4.2.3) (Budkowska et al., 1995; Schulze et al., 2007).

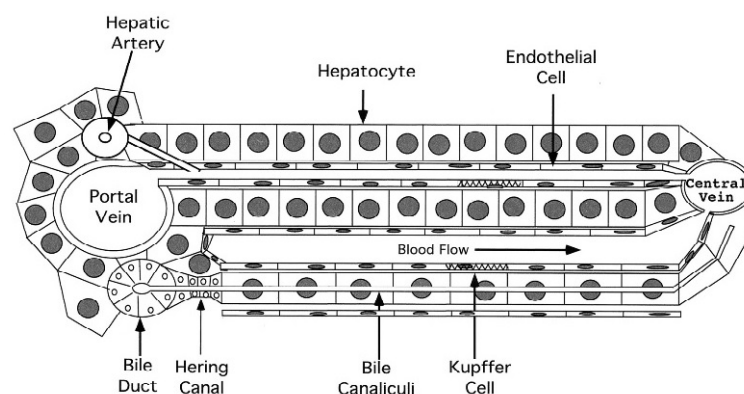


Abb. 4.12: Anatomie eines Leberlappens. Erklärung siehe Text (Seeger and Mason, 2000; mit Genehmigung der American Society for Microbiology).

Paxillin reguliert sowohl das normale Überleben der Zelle als auch die Invasionsfähigkeit von unterschiedlichsten Tumoren und wurde damit für die Forschung interessant. Es dient als prognostischer Marker für eine Vielzahl von Krebsarten und wird in der Zukunft als potentieller therapeutischer Baustein angesehen (Deakin et al., 2012).

5 Ansätze und Ziele der Arbeit

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse zur Paxillinexpression in humanen malignen Krebserkrankungen sind nicht eindeutig und zeigen starke Schwankungen. Paxillin wird eine wichtige Funktion bei der Invasions- und Wachstumsrate beim Tumorgeschehen zugeschrieben. Weltweit gilt HBV in ca. 75 - 90 % als ätiologische Ursache für das Entstehen von Leberzellkarzinomen. Ausgehend von dieser Beobachtung stellt sich die Frage, welchen Einfluss Paxillin auf eine HBV-Infektion ausübt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Hepatitis-B-Virus auf die Menge und intrazelluläre Verteilung von Paxillin bestimmt und umgekehrt der Effekt einer Deregulation der Paxillinexpression auf den Lebenszyklus von HBV charakterisiert.

Da HBV vornehmlich in sich nicht-teilenden sessilen Zellen repliziert, sind eine stabile Zellmatrix-Interaktion und somit auch stabile *focal adhesions* vorhanden. Zuerst wurde die Paxillinexpression in stabil HBV-exprimierenden und HBV-transienten Zellkultursystemen im Vergleich zu Kontrolllinien sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Durch *Knock-down*-Experimente wurde die Relevanz von PXN für die HBV-Expression überprüft. Nach den veränderten Bedingungen erfolgte eine quantitative Analyse der Paxillinmenge und der Viruslast sowohl innerhalb der Zellen als auch von den Überständen der sekretierenden HBV-Zellen. Um auf subzellulärer Ebene die genaue Paxillinlokalisierung innerhalb einer Zelle sowie mögliche Kollokalisierungen untersuchen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die nächste Ebene stellte das Infektionsmodell in primären humanen Hepatozyten dar. In diesen Versuchen konnte die Paxillinmenge direkt während eines Infektionsverlaufes auf Protein- und mRNA-Ebene überprüft werden. Abschließend wurde anhand von Gewebeschnitten von männlichen HBV-negativen und -positiven Mäusen sowie von HBV-negativen und an HBV-assoziiertem hepatozellulärem Karzinomgewebe die Paxillinexpression beurteilt. Dies erfolgte mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und einer Immunfluoreszenz.

Es ist möglich, dass HBV-spezifische Proteine eine Verbindung zu den *focal adhesions* über eine Paxillinbindung erhalten. Diese Verknüpfung könnte Einfluss auf den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus haben und in Hinblick auf neue therapeutische Ansätze von Bedeutung sein.

6 Material

6.1 Zellen

6.1.1 Prokaryotische Zellen

Tab. 6.1: Prokaryotische Zellen.

STAMM	BESCHREIBUNG	QUELLE
One Shot® TOP 10 <i>E. coli</i>	F ⁻ mcrA Δ(mrr ⁻ hsdRMS ⁻ mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1λ	Invitrogen, Karlsruhe

6.1.2 Eukaryotische Zellen

Tab. 6.2: Eukaryotische Zellen.

STAMM	BESCHREIBUNG	QUELLE
Huh-7.5	Immortalisierte humane Hepatomzelllinie, abstammend von Huh-7-Zellen (Blight et al., 2002).	AG Hildt
Hep G2	Immortalisierte humane Hepatomzelllinie (Knowles et al., 1980).	AG Hildt
HepG2 2.2.15	Immortalisierte stabil HBV-exprimierende humane Hepatomzelllinie, welche das 2,15-fache HBV-Genom (Genotyp D) chromosomal beinhaltet. Entspringt der Hep G2 Zelllinie (Sells et al., 1987).	AG Hildt
HepAD38	Immortalisierte stabil HBV-exprimierende humane Hepatomzelllinie, welche das 1,2-fache HBV-Genom (Genotyp D) beinhaltet. Entspringt der Hep G2-Zelllinie (Ladner et al., 1997).	AG Hildt
PHH	Primäre humane Hepatozyten, welche aus Gewebebeobachten nach einer partiellen Hepatektomie isoliert wurden.	Universitätsklinikum Frankfurt am Main

6.2 Mäuse

Für die folgenden Versuche wurden männliche HBV-transgene und HBV-negative Mäuse verwendet, da sie eine höhere HBsAg-Expression aufweisen als die weiblichen Tiere (Almog et al., 1992; Guidotti et al., 1995).

Tab. 6.3: Verwendete Mäuse für RNA-Proben, Proteinlysate und Gewebeschnitte. Kontr. = Kontrolltiere, HBVtg = HBV-transgene Tiere, geb. = geboren, gest. = gestorben

STAMM	Maus ♂	geb. / gest.	QUELLE
C57BL/6 („Black6“)	Kontr.		
(Mekada et al., 2009)	# 901/1	(17.08./10.12.2012)	AG Hildt Tierbestand
	# 901/2	(17.08./10.12.2012)	AG Hildt Tierbestand
	# 901/3	(17.08./10.12.2012)	AG Hildt Tierbestand
	# 910	(17.08./10.12.2012)	AG Hildt Tierbestand
C57BL/6-HBV1.3tg	HBVtg		
(Guidotti et al., 1995)	# 69	(06.03./08.07.2013)	AG Hildt Tierbestand
	# 123	(24.04./15.08.2013)	AG Hildt Tierbestand
	# 124	(24.04./15.08.2013)	AG Hildt Tierbestand
	# 125	(24.04./15.08.2013)	AG Hildt Tierbestand

6.3 Gewebeschnitte

Tab. 6.4: Für Gewebeschnitte verwendete Mäuse- und Patientenlebern.

MAUS ♂	BESCHREIBUNG	QUELLE
Kontrolltiere		
# 910	E5775	AG Hildt Tierbestand
# 901/1	E5983	AG Hildt Tierbestand
# 901/2	E5984	AG Hildt Tierbestand
HBV-transgene Tiere		
# 69	E5776	AG Hildt Tierbestand
# 123	E5987	AG Hildt Tierbestand
# 124	E5988	AG Hildt Tierbestand
PATIENTEN		
HBV-negativ	K17211/07	Universitätsklinikum Tübingen Institut für Pathologie und Neuropathologie Abt. Molekulare Pathologie
chronisch HBV-infiziert	K2170/06	Universitätsklinikum Tübingen Institut für Pathologie und Neuropathologie Abt. Molekulare Pathologie
	K12270/06	Universitätsklinikum Tübingen Institut für Pathologie und Neuropathologie Abt. Molekulare Pathologie

6.4 Plasmide

Tab. 6.5: Verwendete Plasmide.

PLASMID	BESCHREIBUNG	HERKUNFT
pUC18	Kontrollvektor, Ampicillin-Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
pHBV1.2 (pJo19)	Beinhaltet das 1,2-fache HBV-Genom (Genotyp D), Ampicillin-Resistenz.	Dr. Joachim Lupberger
pCEP-gtA-1.5	Kodiert für das 1,5-fache HBV-Genom (Genotyp A), Ampicillin-Resistenz.	Prof. Dr. Glebe, Universität Gießen
pCEP-gtD-1.5 (Melegari)	Kodiert für das 1,5-fache HBV-Genom (Genotyp D) (Melegari et al., 1998).	Dr. Kiyoshi Himmelsbach
pCEP-gtG-1.5	Kodiert für das 1,5-fache HBV-Genom (Genotyp G), Ampicillin-Resistenz.	Prof. Dr. Glebe, Universität Gießen
pEGFPN1	Kodiert für das <i>enhanced Green fluorescent protein</i> , Kanamycin-Resistenz.	Clontech, Saint-Germain-en-Laye

6.5 siRNA

siRNA und benötigte Substanzen

paxillin siRNA (h)
 Control siRNA-A
 siRNA Dilution Buffer
 N-TER Nanoparticle siRNA Transfection System

Hersteller

Santa Cruz, Heidelberg
 Santa Cruz, Heidelberg
 Santa Cruz, Heidelberg
 Sigma-Aldrich, USA

6.6 Oligonukleotide

Hersteller der verwendeten Oligonukleotide ist Biomers.net in Ulm.

Tab. 6.7: Verwendete Light-Cycler Primer. Fwd = forward, rev = revert.

PRIMER NR.	NAME	SEQUENZ (5' → 3')
#42	GAPDH_fwd	gac ccc ttc att gac ctc aac
#43	GAPDH_rev	tgg act gtg gtc atg agt cc
#185	HBV_S_fwd	aac atg gag aac atc aca tca g
#186	HBV_S_rev	tat acc caa aga caa aag aaa att gg
#260	Maus_GAPDH_sense	cac caa ctg ctt agc ccc
#261	Maus_GAPDH_antisense	tct tct ggg tgg cag tga tg
#393	Paxillin_fwd	atg gac gac ctc gac gcc
#480	Paxillin_rev	agg gtt gga gac act gga ag
#405	HBV3.5kb_fwd	ctc caa gct gtg cct tgg g
#406	HBV3.5kb_rev	ccc acc cag gta gct aga g

6.7 Antikörper

Die Primärantikörper und Sekundärantikörper für Western Blots (WB) wurden in 10 % Milchpulver und 1x TBS/T ggf. 5 % BSA in 1x TBS/T oder in 1x RotiBlock, für die Analyse im Odyssey (LI-COR), oder für die Immunfluoreszenz (IF) in 10 % BSA und 1x TBS/T verdünnt.

Tab. 6.8: Antikörper und entsprechende Verdünnungen.

ANTIKÖRPER	SPEZIES/ KLONALITÄT	VERDÜNNUNG	HERSTELLER
PRIMÄRE ANTIKÖRPER		(WB/LI-COR/IF)	
Anti-β-actin	Maus, monoklonal	1:10000/1:6000/-	Sigma-Aldrich, USA
Anti-Paxillin	Maus, monoklonal	-/-/1:100	Merck, Darmstadt
Anti-Paxillin (N-term)	Kaninchen, monoklonal	1:2000/1:3000/1:100	Merck, Darmstadt
Anti-HBcAg (B0586)	Kaninchen, polyklonal	1:1000/-/1:100	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-HBsAg	Ziege, polyklonal	-/-/1:100	Abcam, Cambridge

Anti-HBsAg (HB01)	Maus, monoklonal	1:200/-/1:100	Prof. Dr. Glebe, Universität Gießen
Anti-LHBsAg (MA 18/7)	Maus, monoklonal	1:800/-/1:150	Prof. Dr. Glebe, Universität Gießen (Heermann et al., 1984)
SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER			
Anti-mouse IgG-HRP	Esel, polyklonal	1:2000/-/-	GE Healthcare, Freiburg
Anti-rabbit IgG-HRP	Esel, polyklonal	1:2000/-/-	GE Healthcare, Freiburg
Anti-mouse IgG-680	Esel	-/1:10000/-	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Anti-mouse IgG-800	Esel	-/1:10000/-	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Anti-rabbit IgG-680	Esel	-/1:10000/-	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Anti-rabbit IgG-800	Esel	-/1:10000/-	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Anti-mouse IgG-Alexa488	Esel, polyklonal	-/-/1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-rabbit IgG-Alexa488	Esel, polyklonal	-/-/1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-mouse IgG-Alexa546	Esel, polyklonal	-/-/1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-goat IgG-Cy3	Esel, polyklonal	-/-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, UK
Anti-rabbit IgG-Cy3	Esel, polyklonal	-/-/1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, UK
DAPI		-/-/1:800	Carl Roth, Karlsruhe

6.8 Größenstandards

Protein-Marker

PageRuler Prestained Protein Ladder
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder

Hersteller

Fermentas, St.-Leon Rot
Fermentas, St.-Leon Rot

DNA-Marker

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Fermentas, St.-Leon Rot

6.9 Chemikalien

Chemikalien

Agarose LE
6-Aminohexansäure
Ammoniumperoxidsulfat (APS)
Ampicillin
 β -Mercaptoethanol
Bovines Serumalbumin (BSA)
Bradford Reagenz
Bromphenolblau
1-Butanol
Chloroform
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (100 mM)
Ethanol 96 %
Ethidiumbromid
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)
Formaldehyd 37 %
Glycerin 99,5 %
Glycin
Immobilon Western HRP Substrat
Isopropanol
Kanamycin
Luminata Forte Western HRP Substrat
Magermilchpulver
Methanol
Mowiol
Natriumacetat
Natriumchlorid

Hersteller

Genaxxon, Biberbach
Carl Roth, Karlsruhe
Carl Roth, Karlsruhe
Carl Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Sleeze
PAA, Österreich
Sigma-Aldrich, Sleeze
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Carl-Roth, Karlsruhe
Genaxxon, Biberach
Merck, Darmstadt
AppliChem, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Carl Roth, Karlsruhe
GERBU, Heidelberg
AppliChem, Karlsruhe
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Carl Roth, Karlsruhe
Merck, Darmstadt
Carl Roth, Karlsruhe
Carl Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Sleeze
Carl Roth, Karlsruhe
Carl Roth, Karlsruhe

Natriumdesoxycholat	AppliChem, Darmstadt
peqGold Trifast	PeqLab, Erlangen
Phenol	AppliChem, Darmstadt
Polyethylenimin (PEI)	Thermo Scientific, Karlsruhe
Random Hexamer Primer (200 ng/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
5x Reaktionspuffer für M-MuLV RT	Fermentas, St. Leon-Rot
RotiBlock (10x)	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese 40 Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe
10x RQ1 DNase I Puffer	Promega, Madison, USA
RQ1 Stop Solution	Promega, Madison, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS, 10 %)	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix (2x)	Invitrogen, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Triethylendiamin (DABCO)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Deisenhofen
TWEEN 20 (Polysorbat 20)	Serva, Heidelberg
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

6.10 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Revert Aid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RQ1 DNase I	Promega, Madison, USA

6.11 Kits

Kit	Hersteller
High Pure Viral Nucleic Acid Purification Kit	Roche, Mannheim
Enzynost HBeAg monoclonal	Dade Behring, Marburg
Enzynost HBsAg 5.0	Siemens Healthcare, USA
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden

6.12 Lösungen für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Genaxxon, Biberach
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (4,5 g/l Glukose, L-Glutamin)	Lonza, Basel
fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Biochrom, Berlin
Geneticin (G-418)	Calbiochem, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Linz
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PEI Medienküche
Penicillin/Streptomycin	PAA, Linz
Trypsin/EDTA	PAA, Linz

6.13 Puffer und Lösungen

Alle hier aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
SDS-Ladepuffer (4x)	4 % SDS (w/v) 125 mM TRIS-HCl pH 6,8 10 % Glycerin (v/v) 10 % β -Mercaptoethanol (v/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v)
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS 0,4 % SDS (w/v) pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS 0,4 % SDS (w/v) pH 8,8
SDS-Laufpuffer (10x)	25 mM TRIS 0,2 M Glycin 1 % SDS (w/v) pH 8,3
Anodenpuffer I	20 % Ethanol (v/v) 300 mM TRIS

Anodenpuffer II	20 % Ethanol (v/v) 25 mM TRIS
Kathodenpuffer	20 % Ethanol (v/v) 40 mM 6-Aminohexansäure
RIPA-Puffer	50 mM TRIS-HCl pH 7,2 150 mM NaCl 0,1 % SDS (w/v) 1 % Natriumdesoxycholat (w/v) 1 % Triton X-100
Eindeckelmedium (Mowiol)	10 % Mowiol (w/v) 25 % Glycerin (w/v) 2,5 % DABCO 100 mM TRIS-HCl pH 8,5
TAE-Puffer (50x)	0,2 M TRIS 1 M Natriumacetat 0,05 mM EDTA pH 8,0
<i>6x DNA Loading Dye</i>	10 mM TRIS-HCl pH 7,6 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol 60 % Glycerin 60 mM EDTA
<i>Phosphatase Buffered Saline (PBS)</i>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
<i>Tris Buffered Saline Tween 20 (TBS/T)</i>	20 mM TRIS pH 8,8 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
<i>Lysogeny broth medium (LB-Medium)</i>	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 12 g Agar ad 1 l H ₂ O /pH 7,2

6.14 Geräte

Elektrophorese

Elektrophorese Power-Supply-EPS 301
 Horizontale Elektrophoresekammer HE 33
 Mighty Small II Vertical Electrophoresis System SE 250
 Mighty Small Multiple Gel Caster SE 200
 Semidry Blotting Kammer TE77 PWD
 Standard Power Pack P25

Hersteller

GE Healthcare, Freiburg
 GE Healthcare, Freiburg
 GE Healthcare, Freiburg
 GE Healthcare, Freiburg
 GE Healthcare, Freiburg
 Biometra, Göttingen

Mikroskopie

Durchlicht-Mikroskop Axiovert 40C
 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 META)
 Mikroskop Leica, Leitz DM RBE

Carl Zeiss, Jena
 Carl Zeiss, Jena
 Leica, Wetzlar

Imaging

AGFA Curix 60
 Amersham Hyperfilm ECL
 Hypercassette™
 INTAS Imaging System
 Odyssey Imaging System

AGFA, Köln
 GE Healthcare, Freiburg
 GE Healthcare, Freiburg
 Intas, Göttingen
 LI-COR Biosciences, USA

PCR-Cycler

LightCycler®1.5 Instrument
 LightCycler®480

Roche, Mannheim
 Roche, Mannheim

Zentrifugen

Heraeus Fresco 17
 Mikrozentrifuge 5415D
 Multifuge 1S-R
 Sorvall Evolution RC mit SLA 1500 Rotor

Thermo Scientific, Karlsruhe
 Eppendorf, Hamburg
 Thermo Scientific, Karlsruhe
 Sorvall, Bad Homburg

Sonstige

Eppendorf® Thermomixer® R
 Dako Pen
 IkaMAG Ret Magnetrührer
 Inkubator BBD 6220
 NanoPhotometer P 300
 pH-Meter 766 Calimatic

Sigma-Aldrich, Sleeze
 Dako, Dänemark
 IKA, Staufen
 Heraeus, Osterode
 Implen, München
 Knick, Berlin

Photometer DU 730	Beckman Coulter, Krefeld
Potter-Homogenisator für Zellaufschluss	Braun, Melsungen
Rocking Plattform	Biometra, Göttingen
Satorius Analytical balance	Satorius, Göttingen
Satorius balance LP 6000 200S	Satorius, Göttingen
Schüttelinkubator Innova 44	Eppendorf, Hamburg
Sonifizierer W-220F	Misonix, USA
Sonopuls HD 2200	Bandelin GmbH, Berlin
SterilGARD III Advance	The Baker Company, USA
Stuart Rollerinkubator SRT9	Bibby Scientific, UK
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 500 Pro	GE Healthcare, Freiburg
Vortex®Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zellzählkammer nach Neubauer	Carl Roth, Karlsruhe

6.15 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Blottingmembran Immobilon-P (PVDF)	Millipore, Schwalbach
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegspritzen (1, 5, 10, 20 ml)	B. Braun, Melsungen
Falcontubes (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Hyperfilm ECL Chemiluminescence	GE Healthcare, Freiburg
LightCycler Kapillaren (Polycarbonat)	Genaxxon, Biberbach/Riss
Messpipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (1 µl, 100 µl, 1ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen gestopft (1 µl, 100 µl, 1ml)	4titude, Berlin
Reaktionsgefäße (1.5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter 0,22 µm	Carl Roth, Karlsruhe
Whatmanpapier	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 12- und 24-Loch-Platten)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschaber	TPP, Schweiz

6.16 Software

Produkt

ImageJ
Image Studio Lite
INTAS GDS
LightCycler®1.5 Instrument Software, Version 3.5
LightCycler®480 Software, Version 1.5
LSM Image Browser
Photoshop CS2
ZEN 2012

Hersteller

Wayne Rassband
LI-COR Biosciences, USA
Intas, Göttingen
Roche, Mannheim
Roche, Mannheim
Zeiss, Jena
Adobe, USA
Carl Zeiss, Jena

7 Methoden

7.1 Zellbiologie

7.1.1 Vorbereiten von Geräten und Lösungen

Um sterile Arbeiten gewährleisten zu können, wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Die hitzelablen Lösungen wurden mit Hilfe eines Membranfilters (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert.

7.1.2 Prokaryotische Zellkultur

Kultivierung von *E. coli*

Es wurden *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Die aerobe Kultivierung erfolgte schüttelnd in einem Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 150 rpm für 16 h, hierfür wurde LB-Medium verwendet. Zur Resistenzselektion wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin zugesetzt. Die Plasmid-Maxipräparationskulturen wurden mit Glycerolstocks angeimpft und damit eine Übernachtskultur angelegt. Zur dauerhaften Lagerung wurden 2 ml der Übernachtskultur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 600 µl der Übernachtskultur resuspendiert und mit 400 µl 87%igem Glycerin versetzt. Die Aufbewahrung erfolgt bei -80 °C.

Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml

Kanamycin-Stammlösung 30 mg/ml

7.1.3 Eukaryotische Zellkultur

Kultivieren und Passagieren

Die Zelllinien Huh-7.5, Hep G2, HepG2 2.2.15 und HepAD38 wurden in einer T125-Zellkulturflasche bei 37 °C, 5 % CO₂ und ≥ 90 % Luftfeuchtigkeit dauerhaft kultiviert. Bei etwa 70 - 80 % Konfluenz, welche mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops bestimmt wurde, erfolgte ein Waschschrift der adhären-wachsenden Zellen mit PBS. Durch die anschließende Zugabe

von Trypsin/EDTA für 2 - 5 min bei 37 °C lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt und diente gleichzeitig als Resuspendierungslösung für die Zellen. Eine Verdünnung, durch Zugabe von neuem Medium, wurde der Zelllinie entsprechend angepasst, um ein optimales Wachstum gewährleisten zu können.

Medium für Huh-7.5/Hep G2/HepG2 2.2.15 500 ml DMEM
10 % FCS
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
2 mM L-Glutamin

Medium für HepAD38 500 ml DMEM
10 % FCS
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
2 mM L-Glutamin
25 µg Hydrokortison
5 µg Insulin

Transfektion von Huh-7.5-Zellen

Um die Auswirkung in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen und die Paxillinmenge in den unterschiedlichen HBV-Genotypen untersuchen zu können, wurden Transfektionsexperimente durchgeführt. Für die Transfektion der Zellen wurde lineares Polyethylenimin (PEI) verwendet. Hierfür wurden bei einer 6-Loch-Platte 0,5 - 1 µg Plasmid-DNA/Kavität und 6 µl PEI/µg in 200 µl PBS resuspendiert und für 10 sec durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde 200 µl vom Transfektionsansatz tropfenweise zu 2 ml Medium/Kavität gegeben. Bei einer 24-Loch-Platte setzte sich der Ansatz aus 0,25 µg Plasmid-DNA/Kavität und 6 µl PEI/µg in 100 µl PBS zusammen. Nach 10 sec guter Durchmischung und einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurden je 100 µl vom Transfektionsansatz tropfenweise zu 1 ml Medium/Kavität gegeben. Als Negativkontrolle wurde das pUC-Plasmid im transienten Zellsystem verwendet. Nach 16 h der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel.

Polyethylenimin-Stammlösung 1 mg/ml

Transfektion mit siRNA

Neben der Transfektion von Plasmiden wurde auch eine Transfektion mit siRNA (*small interfering RNA*) durchgeführt, welche die Paxillinexpression auf mRNA-Ebene ausschaltet. Diese Methode eignet sich gut für die Grundlagenforschung zur Aufklärung der noch unbekanntesten Funktion von Paxillin im HBV-Lebenszyklus. Die siRNA sind kurze Ribonukleinsäure-Moleküle, welche

sich mit komplementären einzelsträngigen Ribonukleinsäure-Molekülen verbinden und dadurch die Translation der speziellen mRNA verhindern (*Knockdown*). Die *Knockdown*-Versuche wurden in 24-Loch-Platten durchgeführt. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze gemacht: Ansatz A enthielt 6,5 µl der 10µM *paxillin-siRNA* (oder der 10µM *Control-siRNA*) und 43,5 µl Dilution Buffer, der Ansatz B enthielt 8 µl des Transfektionsreagenz N-TER und 42 µl ddH₂O. Beide Ansätze wurden vereinigt und gut vermischt und für 10 sec bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation des Ansatzes erfolgte eine Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur. Für eine Konzentration von 10 nM wurden 2954 µl Medium mit 46 µl des kombinierten Ansatzes zusammengefügt, für 20 nM waren 2905 µl Medium und 92 µl des kombinierten Transfektionsansatzes notwendig, für eine Konzentration von 40 nM wurden 1408 µl Medium und 92 µl kombinierter Transfektionsansatz verwendet. Von diesem Endvolumen wurden jeweils 500 µl/Kavität entnommen und damit für 24/48/72 h die stabil HBV-exprimierenden Zellen inkubiert. Nach Inkubationsende wurde mit den gewonnenen Proben, wie in Kap. 7.2.5 und 7.1.3 beschrieben, weiterverfahren.

Infektion von primären humanen Hepatozyten

Um die Paxillinmenge im Infektionsmodell untersuchen zu können, wurden zur Infektion von primären humanen Hepatozyten infektiöse Überstände von HepG2 2.2.15- sowie HepAD38-Zellen verwendet. Dazu wurden PHHs genutzt, welche aus Gewebeproben nach einer partiellen Hepatektomie isoliert werden konnten. Nach dem Auslegen in 6-Loch-Platten erfolgte bei Ankunft der Zellplatten aus dem Universitätsklinikum Frankfurt am Main eine dreimalige Waschung mit PBS der Platten, um nicht angewachsene Zellen vollständig zu entfernen. Für die Infektion wurden 2 ml infektiöser Überstand/Kavität zugegeben und über Nacht inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Abhängig vom Experiment erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden entsprechend Kap. 7.1.3 und 7.2.5 für die Analysen geerntet. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte primäre humane Hepatozyten verwendet. Für die Sicherstellung einer erfolgreichen Infektion der PHHs wurde ein HBsAg-ELISA durchgeführt und der Virustiter bestimmt (Kap. 7.4.3).

Medium für PHH

500 ml DMEM
10 % FCS
5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
2 mM L-Glutamin
25 µg Hydrokortison
5 µg Insulin
100 µl EGF (0,1 µg/ml)

Ernte und Lyse von Hepatomzellen

Die Zellen wurden in Abhängigkeit der erfolgten Experimente durch Verwendung verschiedener Puffer und unterschiedlicher Bedingungen geerntet und lysiert. Alle genannten Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Protein-Lysate

Für die Analyse im Western Blot wurden Gesamtzelllysate von den jeweiligen Zelllinien verwendet und in 6-Loch-Platten mit einer Konzentration von 3×10^5 bis zu 1×10^6 Zellen/Kavität ausgelegt. Nach den jeweiligen Experimenten wurden die Zellkulturüberstände für einen HBsAg-ELISA (Kap. 7.4.3) bei 4 °C aufbewahrt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von RIPA-Puffer, je nach Lochgröße, lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und in entsprechende Eppendorf-Gefäße überführt. Mittels Ultraschall für 10 sec bei einer Leistung von 10 - 20 % erfolgte der Aufschluss der Zellen. Nach 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C konnten die Zelltrümmer sedimentiert werden, dann erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay (Kap. 7.3.1) und die Lysate wurden anschließend mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens (Kap. 7.3.3) analysiert.

7.2 Molekularbiologie

7.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Reinheit und Größe der verwendeten Plasmid-DNA und isolierten RNA wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert. Zuerst erfolgte die Auftrennung der DNA- bzw. RNA-Moleküle durch größenabhängig gewählte 1 - 2%ige (w/v) Agarose, welche in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und mittels Magnetrührer zu einer homogenen Masse vermengt wurde. Nach dem Abkühlen der flüssigen Agaroselösung wurde diese mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit zugehörigem Kamm für die Taschen zur späteren Probenbeladung gegossen. Nach dem vollständigen Aushärten des Agarosegels wurde es in eine horizontale Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE als Laufpuffer vollständig bedeckt. Nun konnten die zu analysierenden Proben, welche mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt wurden, in die Geltaschen geladen und bei 80 - 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels UV-Licht und wurde durch das INTAS-Imaging-System dokumentiert. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert mit der DNA-Doppelhelix, dadurch werden die Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar. Für die eindeutige Basenzahlbestimmung wurde ein entsprechender Größenstandard zusätzlich zu den Proben aufgetragen.

7.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nach DNA-Aufreinigung aus den Zellkulturüberständen oder RNA-Isolierung aus Zellen sowie Lebergewebeproben wurde eine Konzentrationsbestimmung für die weitere Verarbeitung notwendig. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde mittels Nanophotometer (P 300) bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Ein Extinktionswert von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 35 µg/ml einzelsträngiger DNA/RNA. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Somit lassen sich Hinweise auf Verunreinigungen der Nukleinsäurelösung durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260/280 nm ablesen. Liegt dieser Wert < 1,8 - 2,0, kann es sich um eine Kontamination mit Proteinen oder Phenol handeln.

7.2.3 Präparation von Plasmiden (Maxi-Prep)

Für die Präparation von Plasmid-DNA, welche für die Transfektionsexperimente notwendig war, wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit entsprechend den Herstellerangaben genutzt. Das Prinzip beruht auf einem Verfahren, bei dem Bakterien einer alkalischen Lyse ausgesetzt und die Proteine denaturiert werden (Birnboim and Doly, 1979). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 300 ml Übernachtskultur. Die anschließende DNA-Reinigung umfasst eine Präzipitation mittels Isopropanol und zwei Waschschritten mittels 70%igem Ethanol. Das Präzipitat wurde luftgetrocknet und in ddH₂O wieder gelöst. Alle Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

7.2.4 Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA aus dem Überstand

Für die Isolierung von DNA aus dem Zellkulturüberstand von HBV-positiven Zellen wurde die Phenol-/Chloroform-Extraktion genutzt. Bei den durchgeführten Versuchen wurden 400 µl Zellkulturüberstand, 320 µl ddH₂O, 80 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 800 µl Phenolchloroform in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gut durchmischt. Nach 5 min Zentrifugation wurde die obere Phase in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und die enthaltenden Nukleinsäuren durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens von 96%igem Ethanol bei 13.000rpm/30 min präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 500 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben. Der Waschschriff erfolgte bei 5 min Zentrifugation. Das entstandene Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in einer entsprechenden Menge ddH₂O resuspendiert. Alle hier genannten Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13.000 rpm und 4 °C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge.

7.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Um die Menge an PXN-spezifischen Transkripten beurteilen zu können, wurde die Isolierung gesamtzellulärer RNA durch die Verwendung von peqGOLD TriFast (Trizol) durchgeführt. Dies ist eine Ein-Schritt-Flüssigphasenseparationsmethode (Chomczynski and Sacchi, 1987). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 400 μ l Trizol/Kavität lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 min auf Eis wurden die Zellen abgelöst und von jeweils zwei Kavitäten vereinigt. Die Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Nun erfolgte eine Zentrifugation von 5 min und der Probenüberstand wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß gegeben und mit 160 μ l Chloroform kräftig durchmischt. Nach weiteren 5 min Zentrifugation erfolgte eine erneute Überführung des oberen wässrigen Überstandes in ein steriles Reaktionsgefäß. Die nun RNA-enthaltende wässrige Phase wurde mit 400 μ l Isopropanol versetzt, invertiert und für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 500 μ l 75%igem Ethanol durch 5 min Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das RNA-Pellet luftgetrocknet. Abhängig von der Größe des Pellets wurde die RNA in 15 - 25 μ l DEPC-H₂O resuspendiert. Alle hier genannten Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13300 rpm und 4 °C (Kap. 7.2.1 und 7.2.2).

7.2.6 cDNA-Synthese

Im Anschluss an die RNA-Isolierung wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um eventuell noch vorhandene DNA-Reste zu entfernen. Dafür wurden jeweils 3 - 5 μ g der RNA-Probe, 1,2 μ l 10x RQ 1 DNase Puffer und 1 μ l DNase zusammen pipettiert und mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 12 μ l aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurde anschließend die DNase I durch 5 min Inkubation bei 90 °C inaktiviert und der gesamte Ansatz zentrifugiert. Die cDNA wird aus RNA mittels reverser Transkriptase synthetisiert. Die cDNA-Synthese erfolgte im Anschluss an den DNase-Verdau durch die Zugabe von 1 μ l Random Hexamer Primer, 2 μ l dNTPs (10mM), 4 μ l 5xRT Puffer und 1 μ l M-MuLV Reverse Transcriptase (RT). Die Erststrangsynthese erfolgte nach Inkubation von 1 h bei 42 °C, die Inaktivierung der RT durch 10 min bei 72 °C. Die fertigen cDNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert. Es wurde eine Verdünnung von 1:10 für die PCR-Amplifikation (Kap. 7.2.7) der cDNA-Proben verwendet.

7.2.7 Real-Time PCR (RT-PCR)

Für die quantitative Analyse von DNA-Sequenzen von Paxillin wurde das LightCycler 1.5-System und 480-System (Roche) genutzt. Der Reaktionsansatz setzt sich aus 5 μ l 2x MaximaTMSYBR Green qPCR Master-Mix sowie 0,25 μ l Primer (10 μ M) zusammen und wird mit Ultrapureinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Die Amplifikation wurde in Polycarbonat-Kapillaren

oder speziellen 96-Loch-Platten durchgeführt. Die Quantifizierung wird durch die Einlagerung des DNA-bindenden Farbstoffes Maxima™ SYBR Green qPCR in die doppelsträngige DNA während der PCR-Reaktion ermöglicht. Nach jedem Zyklus wird die Intensität der Fluoreszenz gemessen, die Zunahme der SYBR Green-Fluoreszenz ist zu der Menge der amplifizierten DNA direkt proportional. Mit Hilfe bekannter Konzentrationen von Standardverdünnungen kann die Menge der DNA danach quantifiziert werden. Das Programm für den Ablauf einer *Real-time* PCR ist in Tab. 7.2.7 dargestellt.

Tab. 7.1: Real-time PCR-Programm.

PROGRAMM	TEMPERATUR (°C)	HALTEZEIT (SEC)	TEMPERATURABNAHME (°C/SEC)	ZYKLEN
Einleitende Denaturierung	95	600	20	1
Denaturierung	95	15	20	45
Annealing	56	30	20	
Elongation	72	30	5	
Schmelzkurve	95	60	20	1
	60	30	20	
	95	0	0,1	
"Cooling"	40	30	30	

7.2.8 Northern Blot

Für die Übertragung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten RNA von stabil HBV-exprimierenden Zelllinien und der Kontrollprobe auf eine Hybond-N-Membran (Amersham) wurde das Northern Blot-Verfahren verwendet. Dazu wurden je Probe 5 - 10 µg RNA mittels eines 1,2%igen Agarose-Gels, welches zusätzlich 1,5 % Formaldehyd enthielt, der Größe nach aufgetrennt und mit Hilfe eines Kappilarblot-Systems (Schleicher und Schuell's Turboblotter) auf die Membran übertragen. Die Radiomarkierung der verwendeten DNA-Sonden wurde mit [α^{32} P] dCTP (3000 Ci/mmol) unter Benutzung eines Klenow-Fragments (5 U/µl) (Bioline) durchgeführt. Bei 95 °C erfolgte die Denaturierung von 30 - 80 ng DNA je Probe und anschließender Inkubation auf Eis. Danach wurde der Ansatz für die radioaktive Markierung wie folgt zusammenpipettiert: DNA, 5 µl Klenow-Fragment Puffer (10x), 2 µl dATP/dTTP/dGTP (0,5 mM), 1 µl Random Primer (500 ng/µl), 1 µl Klenow-Fragment, 5 µl radiomarkiertes [α^{32} P] dCTP und mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 h. Für die Aufreinigung der radiomarkierten DNA-Sonden wurde das QIAquik PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben genutzt. Über Nacht erfolgte die Hybridisierung durch Verwendung von Roti-Hybrid-Quick (Roth). Am nächsten Tag konnten die Membranen gewaschen werden. Dies wurde mittels 10 min Inkubation mit dem erhitzten Waschpuffer I und zwei weiterer Male, auch für jeweils 10 min, mit dem erhitztem Waschpuffer II bei 65 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen in eine

Folie eingeschweißt und bei -80 °C auf einem Röntgenfilm (Amersham) exponiert. Der Northern Blot wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. K. Himmelsbach durchgeführt.

7.3 Proteinbiochemie

7.3.1 Bradford Assay

Der Bradford Assay dient zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in wässrigen Lösungen, wie zum Beispiel Zelllysaten, um gleiche Proteinmengen in den Experimenten einsetzen zu können (Bradford, 1976). Die Methode basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 465 zu 595 nm in Anwesenheit von Proteinen in der Lösung. Es wurden 100 µl Bradfordreagenz in eine 96-Loch-Platte vorgelegt, mit 1 µl Zelllysat vermischt und am Tecan Reader in Konzentrationsbestimmung bei einer Extinktion von 595 nm gemessen. Alternativ wurden 995 µl Bradfordreagenz in eine spezielle Küvette vorgelegt und mit 5 µl Zelllysat vermischt. Die Auswertung erfolgte mit dem Photometer (DU 730) bei gleicher Wellenlänge.

7.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

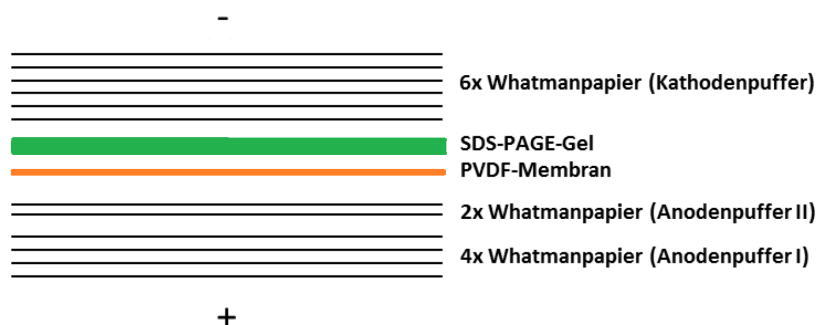
Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Trennung von Stoffgemischen nach ihrer unterschiedlichen Molekülmasse in einer Gelmatrix in einem elektrischen Feld. Entwickelt wurde diese Methode von Ulrich K. Laemmli (Laemmli, 1970). Durch dieses diskontinuierliche elektrophoretische System ist eine gute Auftrennung der Proteine mit Molekülmassen zwischen 5 und 250 kDa möglich. Dies ist auch der Grund für die unterschiedliche Polyacrylamidkonzentration des Trenngels (untere Phase) von 10 - 14 %, welche abhängig vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine gewählt wurde. Die obere Phase, das Sammelgel, wurde immer mit einer 4%igen Polyacrylamidkonzentration verwendet. Aufgrund der netzartigen Struktur des Gels kommt es zu einer Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, da die größeren Moleküle langsamer als kleinere Moleküle durch das Gel wandern. Die zu untersuchenden Proben wurden mit etwa 75 µg Protein in 1x SDS-PAGE Probenpuffer für 5 min bei 95 °C aufgekocht und bei 90 - 120 Volt in einer vertikalen Kammer elektrophoretisch aufgetrennt. Die genaue Zusammensetzung der Gele kann der Tab. 7.2 entnommen werden.

Tab. 7.2: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

SAMMELGEL	4 %	TRENNGEL	10 %	12 %	14 %
Rotiphorese 40 (29:1)	6 ml		20 ml	24 ml	28 ml
Sammelgelpuffer (4x)	15 ml		20 ml	20 ml	20 ml
H ₂ O	45 ml		40 ml	36 ml	32ml
TEMED	60 µl		80 µl	80 µl	80 µl
APS (10 %)	600 µl		800 µl	800 µl	800 µl

7.3.3 Western Blot

Nach erfolgreicher SDS-PAGE folgte der Proteintransfer von den im Gel aufgetrennten Proteinen durch Western Blotting auf eine PVDF-Membran. Dafür wurde das *Semidry*-Elektroblotting-Verfahren (0,95 mA/cm² für 1 h) und in einem speziellen Puffersystem genutzt (Towbin et al., 1979; Kyhse-Andersen, 1984). Dazu wurde zuerst das Trenngel nach der Elektrophorese vom Sammelgel getrennt. Die auf Trenngelgröße zugeschnittene Whatmanfilterpapiere wurden mit Kathoden- oder Anodenpuffer getränkt und die PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert. Der genaue Aufbau ist in Abb. 7.1 dargestellt.

**Abb. 7.1:** Schematischer Aufbau des Western Blot-Verfahrens.

Durch den im SDS-PAGE verwendeten gefärbten Marker konnte ein erfolgter Transfer beurteilt werden und es erfolgte eine immunochemischen Färbung der Membran.

7.3.4 Luciferase Assay

Das Luciferase Assay dient der Untersuchung der PXN-Promotoraktivität in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Dazu wurde der pGL3-Enhancer für den PXN-Promotor verwendet. Die Huh-7.5-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion (0,5 µg pLucpromPXN und 0,25 µg pUC/pJo19/gtA/gtG) analysiert. Die Zellen wurden mit dem Luciferase-Lyse-Puffer geerntet und die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay bestimmt.

Die Normalisierung der Proteinkonzentration erfolgte und es wurden 50 µl von jedem Lysat mit 50 µl Substrat gemischt. Die Messung erfolgte im Luminometer mit einer Dauer von 10 sec. Die Anzahl der emittierten Lichtquanten ist proportional zur Anzahl der Luciferasemoleküle und diese sind wiederum an die Paxillinexpression gekoppelt.

7.4 Immunologie

7.4.1 Immunochemische Färbung der Western Blot-Membran

Nach Übertragung der Proteinbanden auf die Membran wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur in 10 % Milchpulver in 1x TBS/T inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte, abhängig vom verwendeten Antikörper, in 10 % Milchpulver in 1x TBS/T ggf. in 5 % BSA in 1x TBS/T für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht auf einem Rollschüttler. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran für eine halbe Stunde in eine mit TBS/T gefüllte Wanne gelegt und dieses alle 5 - 10 min ausgetauscht. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher mit einer *Horseradish Peroxidase* (HRP) gekoppelt war, erfolgte ebenfalls in 10%igem Milchpulver in TBS/T für 1 h bei Raumtemperatur. Die ungebundenen Sekundärantikörper wurden ebenfalls wie durch den zuvor beschriebenen Waschschrift entfernt. Es kam das *Enhanced Chemolumineszenz*-System (ECL) zum Einsatz. Die gekoppelte Peroxidase am sekundären Antikörper setzt das Substrat um und durch Verwendung eines entsprechenden Entwicklerreagenz kommt es zu einer Emittierung von Lichtquanten. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms wurden die Lichtquanten detektiert und anschließend im automatischen Filmentwickler (Agfa Curix 60) entwickelt. Die Entwicklung erfolgte nach den Herstellerangaben. Bei der Verwendung des Odyssey-Systems wurde anstelle von 10 % Milchpulver in 1x TBS/T, die Lösung 1x RotiBlock (Carl Roth, Karlsruhe) eingesetzt und beim Sekundärantikörper kamen fluorophorgekoppelte Antikörper zum Einsatz. Deshalb erfolgte diese Inkubation unter Lichtschutz.

7.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die genaue Untersuchung der intrazellulären Lokalisation und Verteilung von Paxillin und möglichen Kollokalisierungen wurde die indirekte Immunfluoreszenzmethode für die Färbung angewendet und mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Kap. 7.5.1) analysiert. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 3×10^5 (Huh-7.5) oder 6×10^5 (Hep G2, HepG2 2.2.15, HepAD38) in eine 6-Loch-Platte ausgelegt und nach entsprechender Behandlung, wie zum Beispiel einer Transfektion, auf ein Deckgläschen in eine 12-Loch-Platte übertragen. Dies geschah durch Verwerfen des Überstandes, 1x Waschen mit PBS und Benetzen des

Plattenbodens mit Trypsin/EDTA für 2 - 5 min bei 37 °C, um ein Lösen der Zellen zu bewirken. Das Enzym wurde durch Zugabe von 1,5 ml Medium inaktiviert und die Zellen darin resuspendiert. Nach 24 h wurden die Zellen in der 12-Loch-Platte fixiert, permeabilisiert und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Die Fixierung erfolgte mit 3,7%igem Formaldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur. Um unspezifische Antikörperbindungen abzusättigen, wurde nach dreimaligem Waschen in PBS eine Inkubation in 10 % BSA in 1x TBS/T für 1 h bei Raumtemperatur vorgenommen. Für die Permeabilisierung wurde 0,5%iges Triton X-100 verwendet und für 10 min inkubiert. Die feuchte Kammer diente dem Schutz der Zellen vor Austrocknung bei der Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4'6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. Es wurde in 10 % BSA in 1x TBS/T angesetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen den Antikörperansätzen und danach erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgten alle Schritte nur noch unter Lichtschutz. Die angefärbten Deckgläschen wurden mit dem Eindeckelmedium (Mowiol) auf den Objektträgern dauerhaft versiegelt. Dazu wurden je Deckgläschen 15 µl verwendet. Die fertigen Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4 °C bis zur mikroskopischen Analyse aufbewahrt.

DAPI Stammlösung 0,1 mg/ml in PBS

7.4.3 Enzym linked immunosorbent assay (ELISA)

Ein ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, eine spezielle Technik davon stellt der Sandwich-ELISA oder auch Antigen-ELISA dar. Bei diesem Verfahren werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Der erste Antikörper ist an eine 96-Loch-Platte fest gebunden, an welchem das in der Probe vorhandene HBe- bzw. HBs-Antigen binden kann. Danach kann ein zweiter Antikörper, welcher auch an das Antigen bindet, dazugegeben werden. Der nun entstandene Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entspricht dem Sandwichprinzip. Das zugesetzte Enzym verursacht nach Zugabe eines Substrates einen Farbumschlag bei erfolgreicher Bindung an den Komplex. Die Farbtintensität ist proportional zur vorhandenen Konzentration an HBe- bzw. HBs-Antigen. Mit Hilfe der Messung im *Tecan Reader* kann ein quantitativer Nachweis des Antigens erfolgen. Der ELISA wurde entsprechend den Hersteller-Angaben (Enzygnost HBsAg 5.0, Siemens) durchgeführt.

7.4.4 Methoden zur Charakterisierung HBV-transgener Mäuse

Neben der Genotypbestimmung mittels PCR erfolgte eine zusätzliche Bestimmung von HBV-transgenen und HBV-negativen Mäusen durch einen HBsAg-ELISA vom Blutserum der für die Experimente verwendeten Mäuse mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. M. Gratz.

7.4.5 Gewinnung von Mäuselebergewebeproben

Alle Mäuselebergewebeproben wurden freundlicherweise von Sebastian Barthel zur Verfügung gestellt. Die Lebergewebeproben wurden bis zur Verwendung (Kap. 7.4.6 und 7.4.7) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

7.4.6 Präparation von Mäuselebergewebelysaten

Zur Bestimmung der Paxillin-Proteinmenge in den Mäuseleberproben wurden diese mit Hilfe des Potter-Homogenisators zusammen mit je 1 ml vorgelegtem RIPA-Puffer lysiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 13300 rpm. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde, wie in Kap. 4.3.1 beschrieben, bestimmt.

7.4.7 Isolierung von RNA aus Mäuselebergewebeproben

Die zur Isolierung von RNA verwendeten Mäuselebergewebeproben wurden mit Hilfe eines Potters zusammen mit 1 ml Trizol-Reagenz je Probe homogenisiert und lysiert. Die weiteren Schritte entsprechen den in Kap. 7.2.5 genannten Verfahren.

7.4.8 Paraffinpräparate und Färbetechniken

Die Paraffinpräparate der Mäuselebergewebeproben wurden freundlicherweise von Frau M. Wingerter aus der Abteilung 4/0 des Paul-Ehrlich-Instituts angefertigt. Die dazu gehörige Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) wurde ebenfalls von ihr nach Standardmethoden durchgeführt. Die Paraffinpräparate der Patientenlebergewebeproben wurden freundlicherweise von der Abteilung für molekulare Pathologie des Instituts für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt.

7.4.9 Immunfärbung von Paraffinschnitten aus Lebergewebeproben

Zur Beurteilung der Paxillin-Expression im Mausmodell wurden Paraffinschnitte von HBV-negativen und HBV-transgenen Mäuselebern angefärbt. Zum Deparaffinieren der Schnitte wurden diese in Färbeküvetten für Objektträger erst für 15 min in Xylol, anschließend für 10 min in 96%iges Ethanol und 10 min in 75%iges Ethanol verbracht. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 min in ddH_2O gewaschen. Um die Autofluoreszenz der Leberzellen zu reduzieren wurden sie für 30 min in 3,7%igem Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert. Zum Abschluss der Deparaffinierung erfolgte nochmals ein Waschschritt von 5 min in ddH_2O . Das Blockieren von unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte durch die Inkubation in

10 % BSA in 1x TBS/T für 1 h. Damit die Antikörperlösung auf den Organproben bei der Inkubation verblieb, wurden diese mit einem Fettstift (*Dako Pen*) umrandet und mit 75 - 100 μ l Primärantikörper/Objektträger für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Waschschrift mit 1x TBS/T erfolgte dreimal, bevor die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper ebenfalls für 1 h in einer feuchten Kammer folgte. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI. Nach erneutem dreimaligem Waschen in 1x TBS/T wurden die Deckgläschen mit Hilfe von Eindeckelmedium (Mowiol) dauerhaft auf den Objektträgern versiegelt. Die fertigen Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4 °C bis zur Analyse mit dem CLSM (Kap. 7.5.1) aufbewahrt.

7.5 Mikroskopie

7.5.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Bei dieser Mikroskopiemethode wird ein fokussierter Laserstrahl genutzt, um das Präparat abzuscanen. Die in Kap. 7.4.2 und 7.4.9 erklärten Verfahren dienen der Herstellung von Fluoreszenz-gekoppelten Proteinpräparaten. Dadurch kann das Fluoreszenz-anregende Laserlicht die unterschiedlichen Intensitäten im Präparat zeigen und durch die ZEN 2009/LSM Image Browser Software erfolgte die Darstellung sowie Dokumentation. Diese Methode ermöglicht eine exakte Bestimmung der Proteinverteilungen und mögliche Kollokalisierungen in einer definierten Schicht, da mit Hilfe der Lochblende, welche konfokal zur Fokusebene liegt, Licht aus anderen Schichten herausgefiltert werden kann. Die verwendeten Farbstoffe und dazugehörigen Absorptions- und Emissionsmaxima sind in Tab. 7.3 aufgelistet.

Tab. 7.3: Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluorophore

FARBSTOFF	ABSORPTIONSMAXIMUM (NM)	EMISSIONSMAXIMUM (NM)
DAPI	358	461
Alexa Fluor 488	496	519
Alexa Fluor 546	556	573
Indocarbocyanin (Cy3)	550	570
Indodicarbocyanin (Cy5)	650	670

8 Ergebnisse

8.1 *In vitro*

8.1.1 Expression von HBV führt zu erhöhter Bildung von Paxillin in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von HBV auf die Menge und intrazelluläre Verteilung von Paxillin in Leberzellen charakterisiert sowie umgekehrt der Effekt einer Deregulation der Paxillinexpression auf den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus bestimmt.

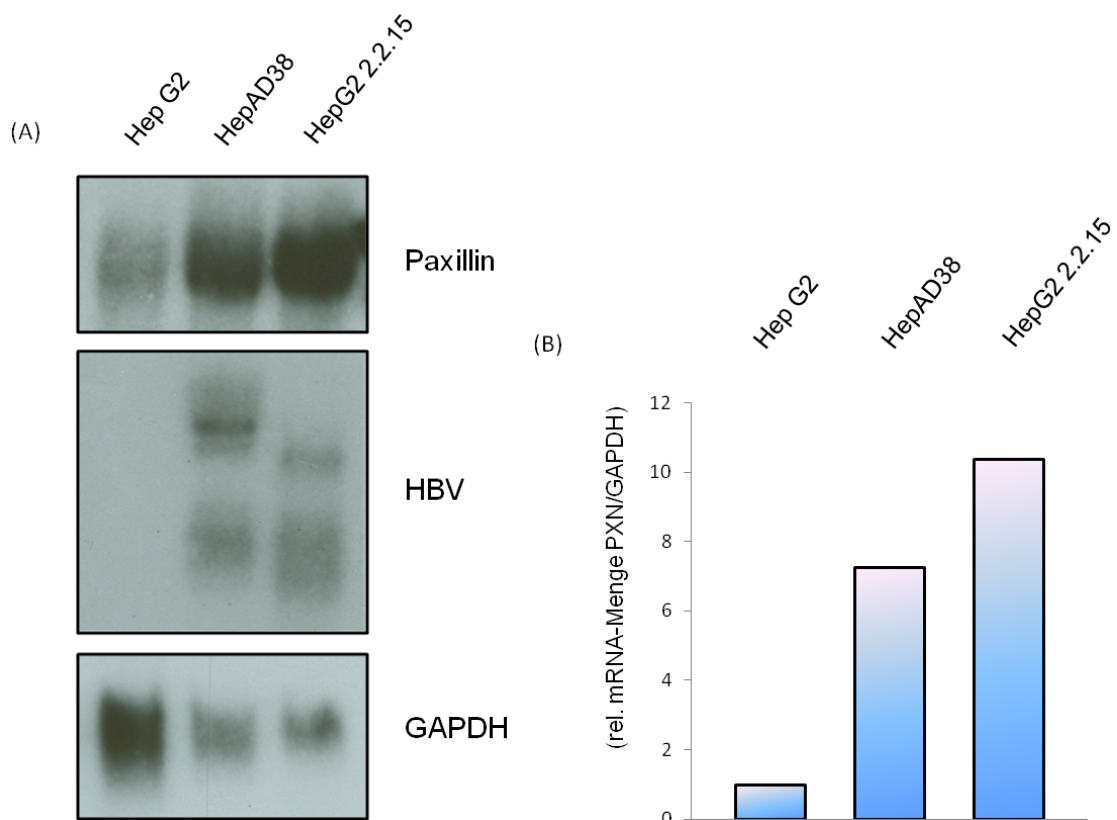


Abb. 8.1: Northern Blot-Analyse: Erhöhte PXXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen. (A) Der Northern Blot dient dem Vergleich von HepAD38- und HepG2 2.2.15-Zellen (HBV-positiv) zu Hep G2-Zellen (HBV-negativ). Die 3.5-, 2.4-, 2.1- und 0.7-kb HBV-Transkripte zeigen die Anwesenheit von HBV; GAPDH ist die Ladekontrolle. Es wurde eine Paxillin-, HBV- und GAPDH-spezifische, radioaktiv-markierte Sonde genutzt. (B) Die Quantifizierung des Northern Blots ist in (B) dargestellt. Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung zeigt eine erhöhte Menge an PXXN-spezifischen Transkripten in HepAD38- und HepG2 2.2.15-Zellen im Vergleich zu Hep G2-Zellen.

Zunächst fand eine Untersuchung der stabil HBV-exprimierenden Zelllinie HepG2 2.2.15 sowie HepAD38 statt. Die vorhandene Menge an Paxillin wurde durch verschiedene Methoden analysiert und quantifiziert.

Um Aufschluss über die Menge an PNX-spezifischen Transkripten in HBV-exprimierenden Zellen zu bekommen, wurden die stabil HBV-exprimierenden Zelllinien HepG2 2.2.15 und HepAD38 untersucht. Der Abb. 8.1 ist eine gesteigerte mRNA-Menge, welche für das Protein Paxillin kodiert, in HBV-positiven Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen zu entnehmen. Es handelt sich hier um die 3.5-, 2.4-, 2.1- und 0.7-kb mRNAs von HBV, welche als Nachweis für die positiven HBV-Zellen anzusehen sind. Hierfür wurde die HBx-Sequenz als Sonde und das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Ladekontrolle verwendet.

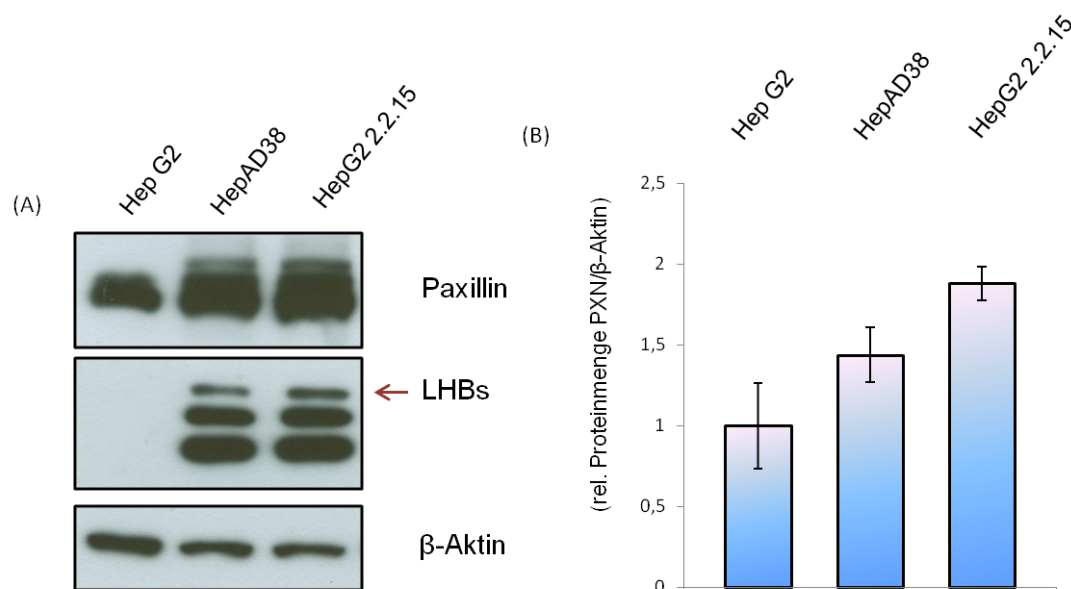


Abb. 8.2: Western Blot-Analyse: Erhöhte Paxillinexpression in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen. (A) Western Blot als Detektionsmöglichkeit der Menge an Paxillin auf Proteinebene in HepAD38- und HepG2 2.2.15-Zellen (HBV-positiv) im Vergleich zu Hep G2-Zellen (HBV-negativ). Die obere Bande im LHBs-Blot ist die spezifische LHBs-Bande und dient als Nachweis der HBV-Expression, β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), MA 18/7 (LHBs), Anti- β -actin (β -Aktin). (B) Die Quantifizierung des Western Blots ist in (B) dargestellt und die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Sie zeigt bei drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) eine erhöhte Paxillinmenge in HepG2 2.2.15-Zelllysaten und eine tendenziell erhöhte Proteinexpression an PNX in HepAD38 im Vergleich zu Hep G2-Zellen.

Die Abb. 8.1 gab somit Hinweis darauf, dass eine HBV-Expression zu einer erhöhten Menge an PNX-spezifischen Transkripten führt. Der Western Blot (Abb. 8.2) mit stabil HBV-exprimierenden Zellen dient der Beurteilung der Menge an Paxillin auf der Proteinebene. Als Negativkontrolle wurde ein Hep G2-Zelllysate verwendet. Der Nachweis von HBV-positiven Zellen konnte mittels LHBs-Detektion erfolgen und β -Aktin wurde als Ladekontrolle genutzt. Die Quantifizierung zeigt eine erhöhte Paxillinmenge in HepG2 2.2.15-Zellen sowie eine tendenziell

erhöhte Menge an Paxillin an PXN in HepAD38-Zellen im Vergleich zur HBV-negativen Zelllinie (Hep G2).

Durch die Begutachtung der cDNA von HBV-positiven und HBV-negativen Zellen mit Hilfe der PCR-Methode konnte die Annahme, dass die Anwesenheit von HBV zu einer höheren Menge an Paxillin führt, weiter untersucht und, wie Abb. 8.3 zeigt, gestärkt werden. Dieses Ergebnis wurde durch RNA-Isolate von HepG2 2.2.15- sowie HepAD38- und Hep G2-Zellen generiert. Die trotz der vorhandenen GAPDH-Bande nicht sichtbare Paxillinbande bei den Hep G2-Zellen kann in der zu geringen PCR-Zyklenanzahl begründet sein. Die Negativkontrolle (H₂O) zeigt keinen Hinweis auf Verunreinigungen.

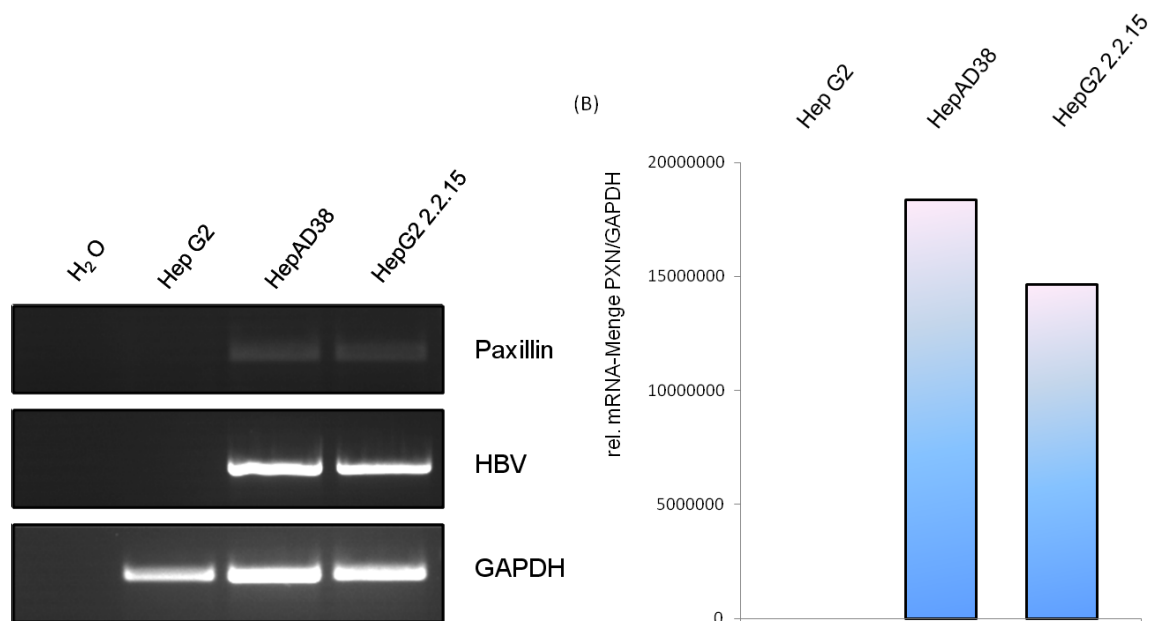


Abb. 8.3: PCR-Analyse: Erhöhte Paxillin-cDNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen. (A) Die untersuchte cDNA von HepAD38- und HepG2 2.2.15-Zellen (HBV-positiv) im Vergleich zu Hep G2-Zellen (HBV-negativ) wurde mit den Paxillin-spezifischen (#393 und #480), den HBV-spezifischen PCR-Primer (#185 und #186) analysiert und für die Ladekontrolle dienten die GAPDH-spezifischen PCR-Primer (#42 und #43). Die Negativkontrolle (H₂O) zeigt keine Hinweise auf Verunreinigung. (B) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung zeigt eine erhöhte cDNA-Menge, welche für Paxillin kodiert, in HepAD38- und HepG2 2.2.15-Zellen im Vergleich zu Hep G2-Zellen.

Für die quantitative Analyse der mRNA-Menge von stabil HBV-exprimierenden Zelllinien wurde die RT-PCR eingesetzt. Die Quantifizierung ergab in drei unabhängigen Experimenten (n=3) eine stark erhöhte Menge an Paxillin in stabil HBV-exprimierenden Zellen. Die Abb. 8.4, 8.5 und 8.6 zeigen die einzelnen Experimente mit Nachweis von vorhandener HBV-mRNA in HepG2 2.2.15- sowie HepAD38-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Hep G2). Zusammenfassend kann eine stark erhöhte Menge an PXN-spezifischen Transkripten in HBV-positiven Zellen festgestellt werden, jedoch ist keine Beurteilung innerhalb der stabil HBV-exprimierenden Zellen möglich, da die Paxillinexpression Schwankungen aufweist.

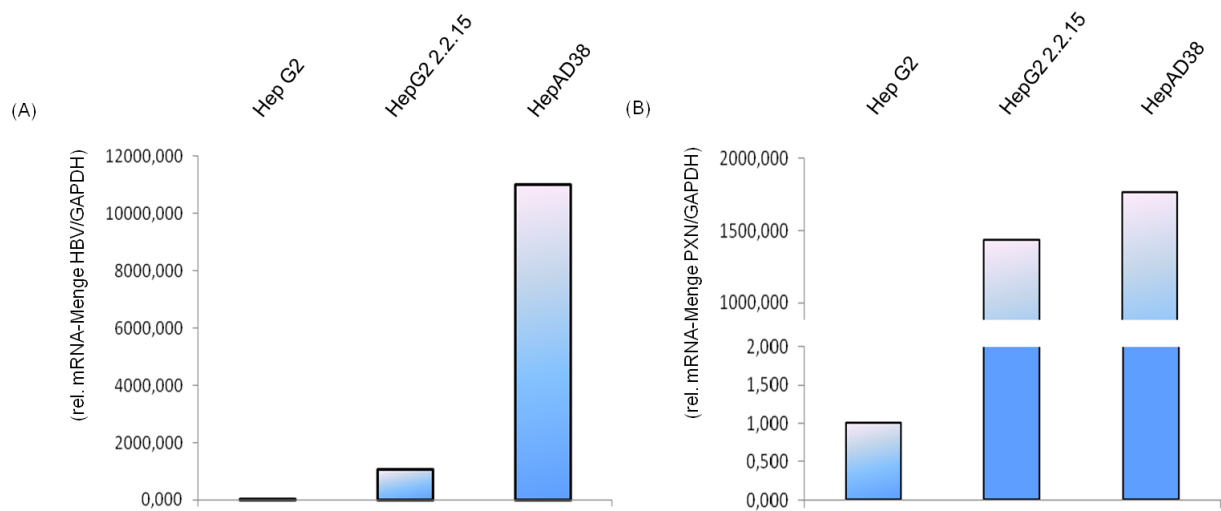


Abb. 8.4: RT-PCR-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (V.1). (A) Die erhaltenen RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der relativen mRNA-Menge, welche für HBs kodiert, ergab eine hohe HBV-Menge für die HepG2 2.2.15-Zellen und eine sehr hohe Menge für die HepAD38-Zellen, beide sind HBV-positiv. Die Hep G2-Zelllinie dient als Kontrolle. (B) Die erhaltenen RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Durch die Quantifizierung der RT-PCR-Ergebnisse ist eine erhöhte Menge an PXN-spezifischen Transkripten in HepG2 2.2.15- und HepAD38- (HBV-positiv) im Vergleich zu den Hep G2-Zellen (HBV-negativ) feststellbar. Es wurden die HBV-spezifischen (#405 und #406) und die PXN-spezifischen (#639 und #640) sowie die GAPDH-spezifischen RT-PCR-Primer (#42 und #43) genutzt.

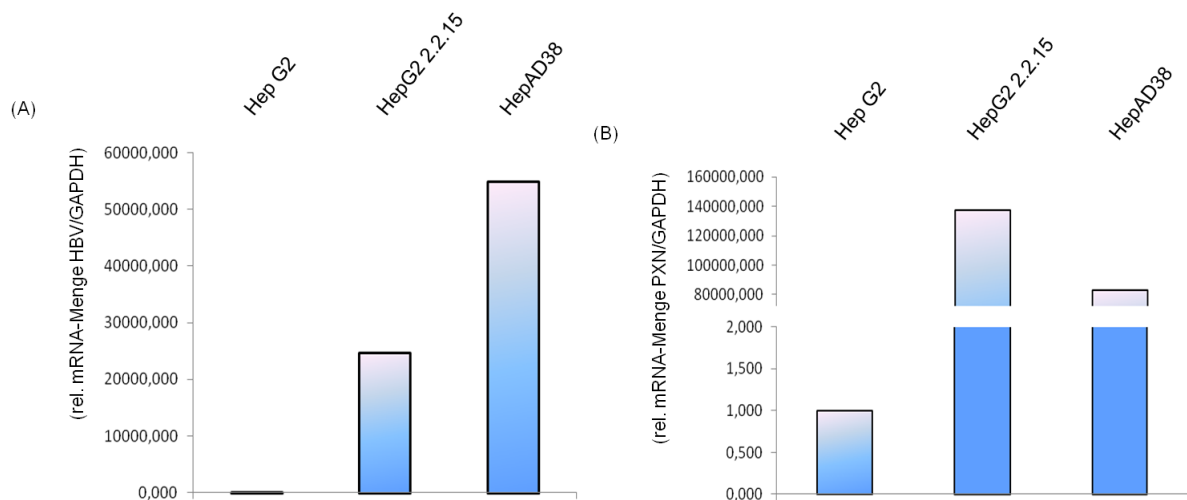


Abb. 8.5: RT-PCR-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (V.2). (A) Die erhaltenen RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der relativen mRNA-Menge, welche für HBs kodiert, ergab eine sehr hohe HBV-Menge für die HepG2 2.2.15- und die HepAD38-Zellen, beide sind HBV-positiv. Die Hep G2-Zelllinie dient als Kontrolle. (B) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Durch die Quantifizierung der RT-PCR-Ergebnisse ist eine stark erhöhte Menge an PXN-spezifischen Transkripten in HepG2 2.2.15- und HepAD38- (HBV-positiv) im Vergleich zu den Hep G2-Zellen (HBV-negativ) feststellbar. Es wurden die HBV-, PXN- sowie GAPDH-spezifischen RT-PCR-Primer genutzt.

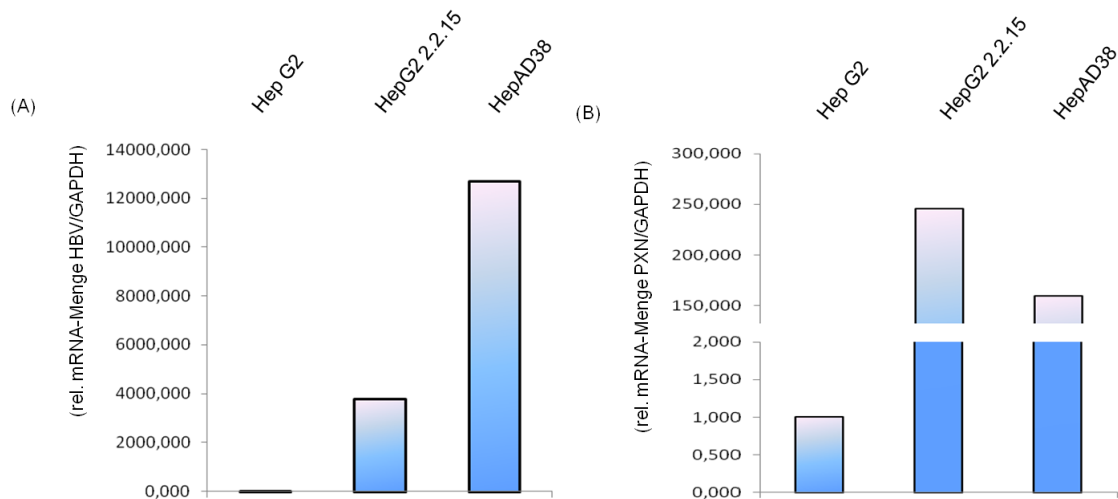


Abb. 8.6: RT-PCR-Analyse: Erhöhte PAXN-mRNA-Menge in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (V.3). (A) Die erhaltenen RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der relativen mRNA-Menge, welche für HBs kodiert, ergab eine hohe HBV-Menge für die HepG2 2.2.15- und die HepAD38-Zellen, beide sind HBV-positiv. Die Hep G2-Zelllinie dient als Kontrolle. (B) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Durch die Quantifizierung der RT-PCR-Ergebnisse ist eine erhöhte Menge an PAXN-spezifischen Transkripten in HepG2 2.2.15- und HepAD38- (HBV-positiv) im Vergleich zu den Hep G2-Zellen (HBV-negativ) feststellbar. Es wurden die HBV-, PAXN- sowie GAPDH-spezifischen RT-PCR-Primer genutzt.

8.1.2 *Knockdown* der Paxillinexpression führt zu erhöhter Bildung von LHBs auf Proteinebene und verringerter HBV-Menge auf mRNA-Ebene in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien

Da die Paxillinmenge in stabil HBV-exprimierenden Zellen erhöht ist, was die vorangegangenen Experimente belegen, stellte sich die Frage, wie sich ein *Knockdown* der Paxillinexpression auf die Expression des Hepatitis-B-Virus und die Abgabe von Viruspartikeln in den Überstand auswirkt. Der *Knockdown* erfolgte unter Verwendung von siRNA und die Analyse wurde mittels Western Blot (siehe Abb. 8.7) durchgeführt. Die Zellen wurden am Tag 1 ausgelegt, am Tag 2 erfolgte die Transfektion mit 20 nM ctrl- oder si-RNA. Die Ernte der Zellen wurde 24/48/72 h nach erfolgter Transfektion durchgeführt. Der erfolgreiche *Knockdown* von Paxillin zeigt sich durch die Analyse der PAXN-Menge mittels Western Blot. Die Western Blot-Analyse zeigt sowohl bei den HepG2 2.2.15-, als auch bei den HepAD38-Zellen einen guten *Knockdown* auf Proteinebene mit gleichzeitig erhöhter LHBs-Expression.

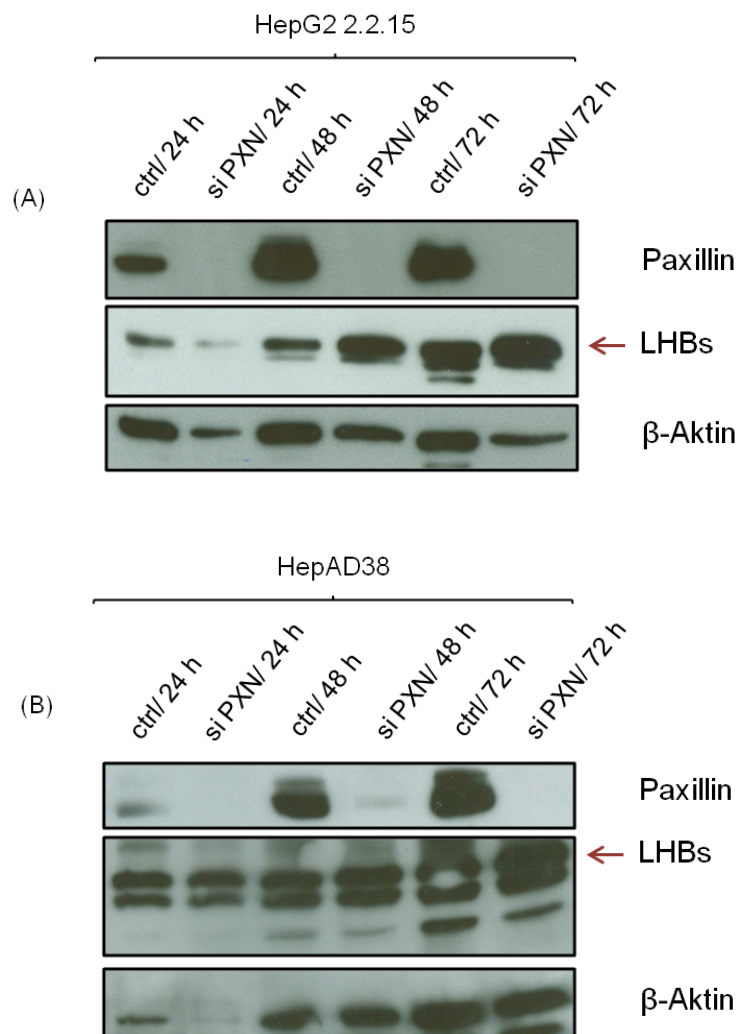


Abb. 8.7: Western Blot-Analyse: Bei Paxillin-*Knockdown* verstärkte LHBs-Expression in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien. (A) Der Western Blot zeigt einen durch siRNA erfolgten Paxillin-*Knockdown* in HepG2 2.2.15-Zellen (HBV-positiv). Die Paxillinbande ist beim *Knockdown* nicht zu detektieren, die obere spezifische LHBs-Bande ist in diesem Fall, im Vergleich zu den Kontrollzellen desselben Zeitpunktes, verstärkt zu sehen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. (B) Die gleiche Versuchsanordnung wurde auch in HepAD38-Zellen durchgeführt und wieder ist keine Paxillin-Bande beim *Knockdown* durch die siRNA detektierbar, auch in diesem Fall zeigt sich eine verstärkte LHBs-Bande. Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), MA 18/7 (LHBs), Anti- β -actin (β -Aktin).

Um die Effekte einer Deregulation der Paxillinexpression beurteilen zu können, wurde ein Paxillin-*Knockdown* in HepG2 2.2.15-Zellen durchgeführt und, wie in Abb. 8.8 gezeigt, gleichzeitig im Western Blot, HBsAg-ELISA und RT-PCR analysiert. Die Western-Blot-Analyse zeigt einen durch siRNA erfolgten, adäquaten Paxillin-*Knockdown* mit gleichzeitig erhöhter LHBs-Menge auf Proteinebene. Durch den HBsAg-ELISA konnte eine verringerte Menge an viralen Oberflächenpartikeln im Überstand der Paxillin-deregulierten Zellen gezeigt werden. Die Quantifizierung der cDNA in der RT-PCR zeigt eine starke Deregulation der HBV-mRNA-Menge in den behandelten Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen. Die aus dem Überstand isolierte virale DNA weist in der RT-PCR die gleiche Menge auf.

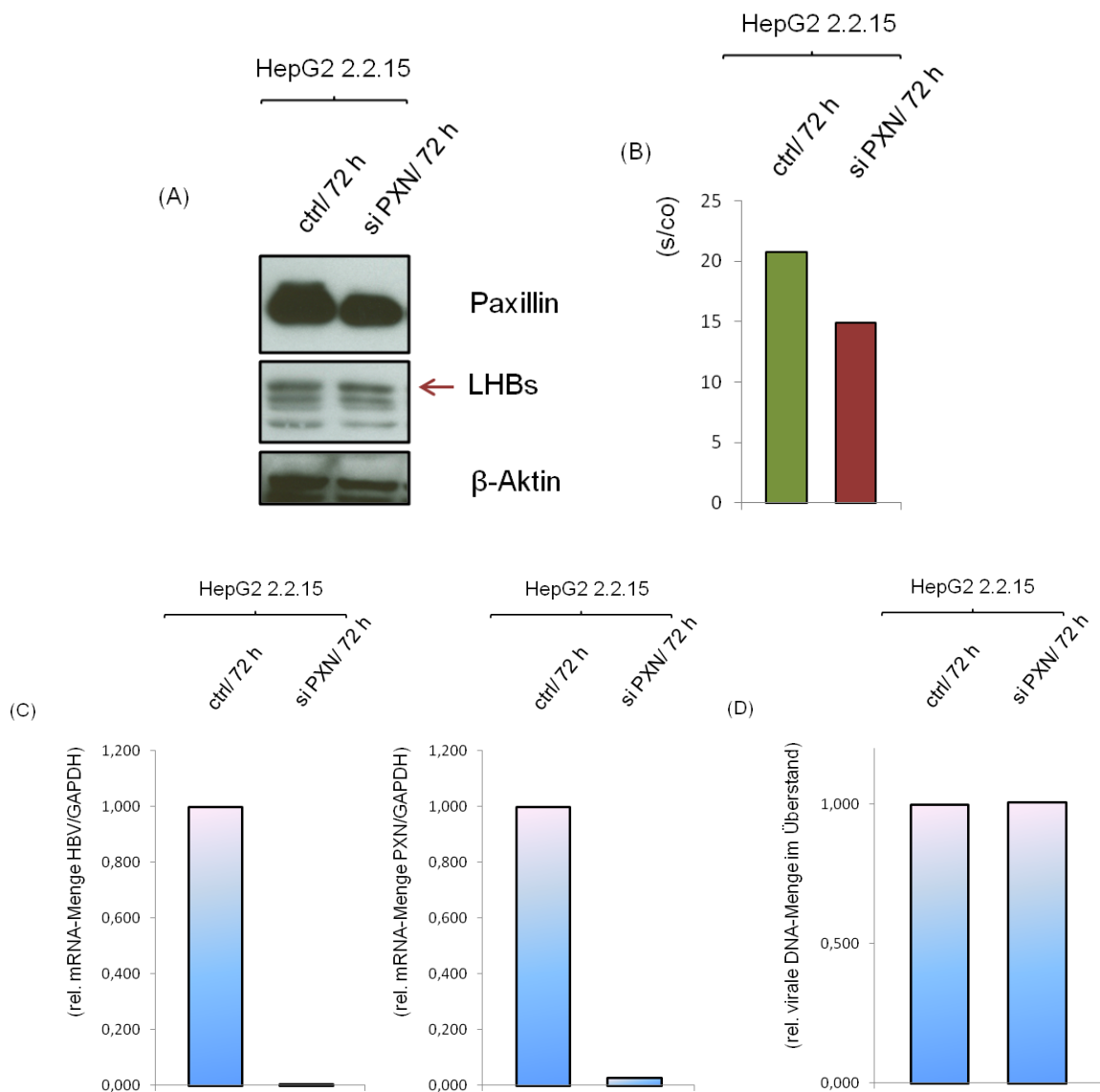


Abb. 8.8: Paxillin-Knockdown in stabil HBV-exprimierenden HepG 2.2.15-Zellen. (A) Der Western Blot zeigt einen durch siRNA erfolgten adäquaten Paxillin-Knockdown in HepG2 2.2.15-Zellen (HBV-positiv). Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), MA 18/7 (LHBs), Anti-β-actin (β-Aktin). (B) Die Daten wurden mittels cut-off-Wert berechnet. Der HBsAg-ELISA zeigt eine verringerte HBsAg-Menge im Überstand der *Knockdown*-Zellen. (C) Die RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der untersuchten cDNA zeigt in den RT-PCR-Ergebnissen bei erfolgter Deregulation der Paxillinexpression eine starke Deregulation der HBV-mRNA-Menge in den behandelten Zellen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten HepG2 2.2.15-Zellen. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#185 und #186), PXN-spezifisch (#393 und #480), GAPDH-spezifisch (#42 und #43). (D) Die im Überstand enthaltene virale DNA wurde isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert. In der Abb. ist kein Unterschied feststellbar. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#185 und #186).

Die Ergebnisse der Auswertung der HepAD38-Zelllinie decken sich mit den vorhandenen Daten aus den HepG2 2.2.15-Zellen. Die Abb. 8.9 zeigt die Zusammenstellung der einzelnen Ergebnisse, wobei hier eine nicht so starke Reduktion in den behandelten Zellen im Vergleich zu den siRNA-transfizierten HepG2 2.2.15-Zellen zu verzeichnen ist.

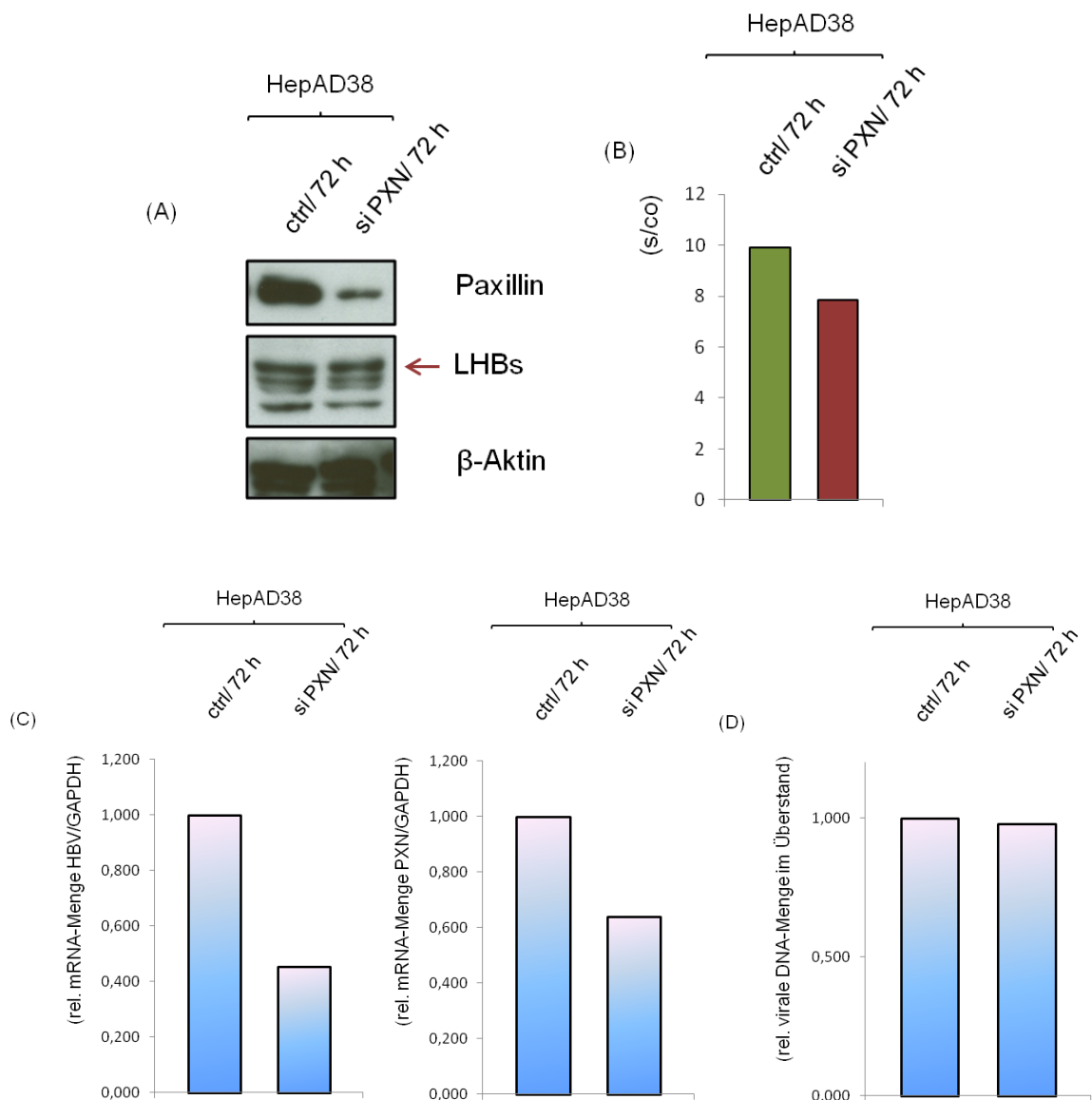


Abb. 8.9: Paxillin-Knockdown in stabil HBV-exprimierenden HepAD38-Zellen. (A) Der Western Blot zeigt einen durch siRNA erfolgten guten Paxillin-Knockdown in HepAD38-Zellen (HBV-positiv). Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), MA 18/7 (LHBs), Anti- β -actin (β -Aktin). (B) Die Daten wurden mittels cut-off-Wert berechnet. Der HBsAg-ELISA zeigt eine verringerte HBsAg-Menge im Überstand der *Knockdown*-Zellen. (C) Die RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der untersuchten cDNA zeigt in den RT-PCR-Ergebnissen bei erfolgter Deregulation der Paxillin-expression eine starke Deregulation der HBV-mRNA-Menge in den behandelten Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten HepAD38-Zellen. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#185 und #186), PXN-spezifisch (#393 und #480), GAPDH-spezifisch (#42 und #43). (D) Die im Überstand enthaltene virale DNA wurde isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert. Die Quantifizierung zeigt keinen Unterschied. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#185 und #186).

Zusammenfassend konnte im stabil HBV-exprimierenden Zellkultursystem sowohl eine erhöhte Menge an PXN-spezifischen Transkripten als auch eine erhöhte Menge an Paxillin auf Proteinebene nachgewiesen werden. Der *Knockdown* der Paxillinexpression zeigt auf Proteinebene eine erhöhte LHBs-Expression mit gleichzeitig verringerter Menge der HBV-Expression auf mRNA-Ebene sowie an viralen Oberflächenpartikeln im Überstand.

8.1.3 Intrazelluläre Paxillinverteilung: Akkumuliertes Verteilungsmuster in stabil HBV-exprimierenden Zellen

Für die Beurteilung der intrazellulären Paxillinmenge und -verteilung in stabil HBV-exprimierenden Zellen wurden HepG2 2.2.15- (HBV-positiv) zusammen mit Hep G2-Zellen (HBV-negativ) gemischt und auf ein Deckglas ausgelegt, nach der Färbung der Zellen erfolgte die Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.

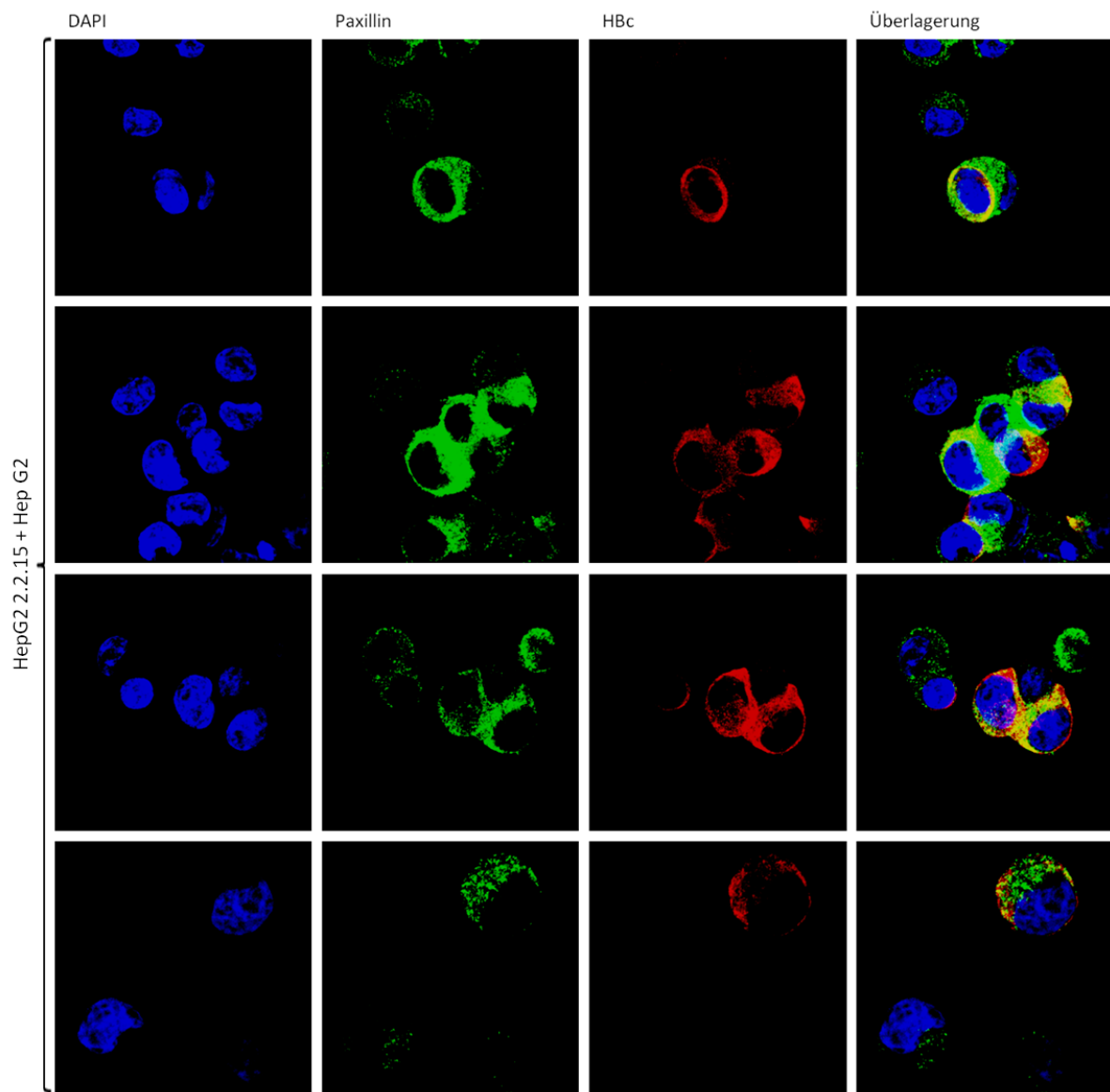


Abb. 8.10: Immunfluoreszenzanalyse: Verstärkte PXN-Expression in stabil HBV-exprimierenden HepG2 2.2.15-Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Hep G2-Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und sind in Blau dargestellt. Für die Paxillinfärbung wurde der Anti-Paxillin-Antikörper (Maus) benutzt und ist im grünen Kanal zu sehen, als zweiter Antikörper wurde der Anti-mouse IgG-Alexa488 verwendet. Zum Nachweis von HBV-positiven Zellen wurde der Anti-HBcAg (B0586)-Antikörper verwendet (zweiter Antikörper: Anti-rabbit IgG-Cy3) und ist im roten Kanal sichtbar. Die Menge an vorhandenem Paxillin ist stark erhöht in den HepG2 2.2.15- im Vergleich zu den Hep G2-Zellen. Zudem zeigen die Aufnahmen eine akkumulierte Form von Paxillin, welche um den Zellkern lokalisiert ist. Die gelben Bereiche bei der Überlagerung geben Hinweis auf eine mögliche partielle Kolokalisation von Paxillin und dem Core-Protein von HBV.

Die Abb. 8.10 zeigt die gemischten HepG2 2.2.15- und Hep G2-Zellen. Die Färbung des Core-Proteins vom Hepatitis-B-Virus, welches im roten Kanal sichtbar ist, ermöglicht eine genaue Unterscheidung von HBV-positiven (HepG2 2.2.15-) und -negativen (Hep G2-) Zellen. Im grünen Kanal ist die Paxillinverteilung innerhalb der einzelnen Zellen zu erkennen. Es zeigt sich eine stark erhöhte Menge an Paxillin in den stabil HBV-exprimierenden HepG2 2.2.15-Zellen, welche in akkumulierter Form um den Zellkern liegt. Die gelben Bereiche in den Überlagerungsbildern geben Hinweis auf eine mögliche partielle Kolokalisation von Paxillin und dem Core-Protein des HBV.

8.1.4 Transiente Expression von HBV führt zu erhöhter Bildung von Paxillin in transfizierten Zellen

Die folgenden Experimente wurden mit transient HBV-exprimierenden Zelllinien durchgeführt. Um die Auswirkung der HBV-Expression auf die PAXN-Menge zu untersuchen, wurden Huh-7.5-Zellen mit verschiedenen HBV-Expressionskonstrukten transfiziert.

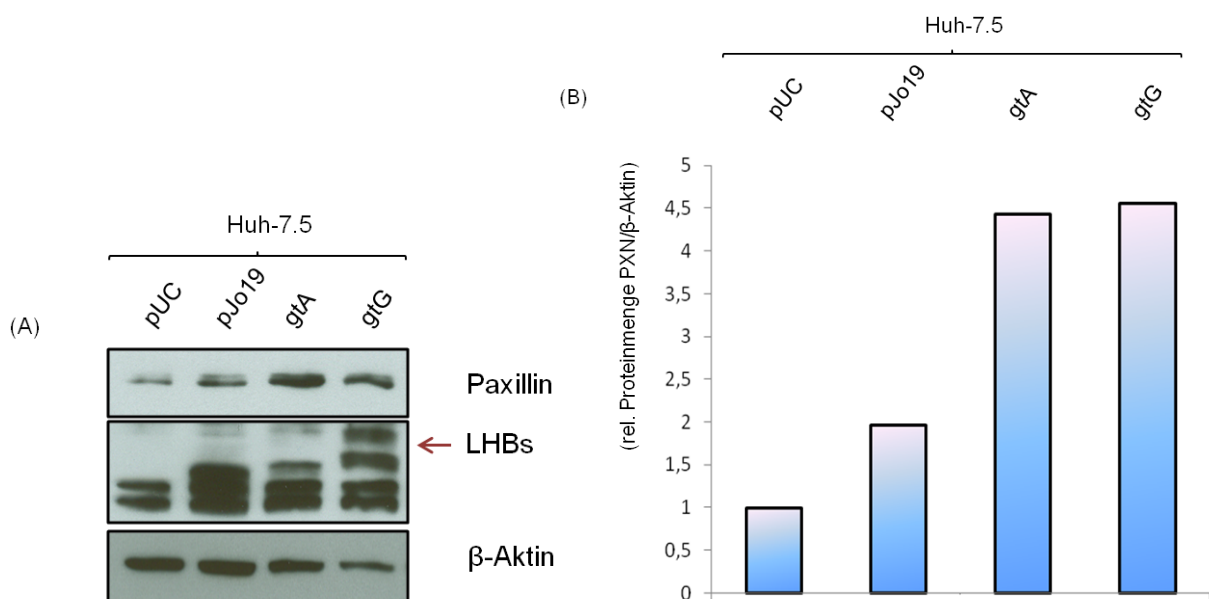


Abb. 8.11: Western Blot-Analyse: Erhöhte Paxillinexpression in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (V.1). (A) Der Western Blot zeigt HBV-positive Zellen (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtG) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (Huh-7.5_pUC). Die obere Bande im LHBs-Blot ist die spezifische LHBs-Bande und dient als Nachweis der HBV-Expression, β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Verwendete Antikörper: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), MA 18/7 (LHBs), Anti- β -actin (β -Aktin). (B) Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Die Quantifizierung zeigt eine erhöhte Paxillinmenge in HBV-positiven Zellen.

Zuerst erfolgte die Untersuchung der Paxillinmenge auf Proteinebene, die Western Blots sind in Abb. 8.11 und 8.12 dargestellt. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pUC verwendet, β -Aktin dient als Ladekontrolle und mit Hilfe der Detektion von LHBs ist eine genaue Unterscheidung von HBV-positiven und -negativen Zellen möglich. Die Quantifizierungen zeigen eine

erhöhte Paxillinmenge in den untersuchten Genotypen (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtG) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (Huh-7.5_pUC).

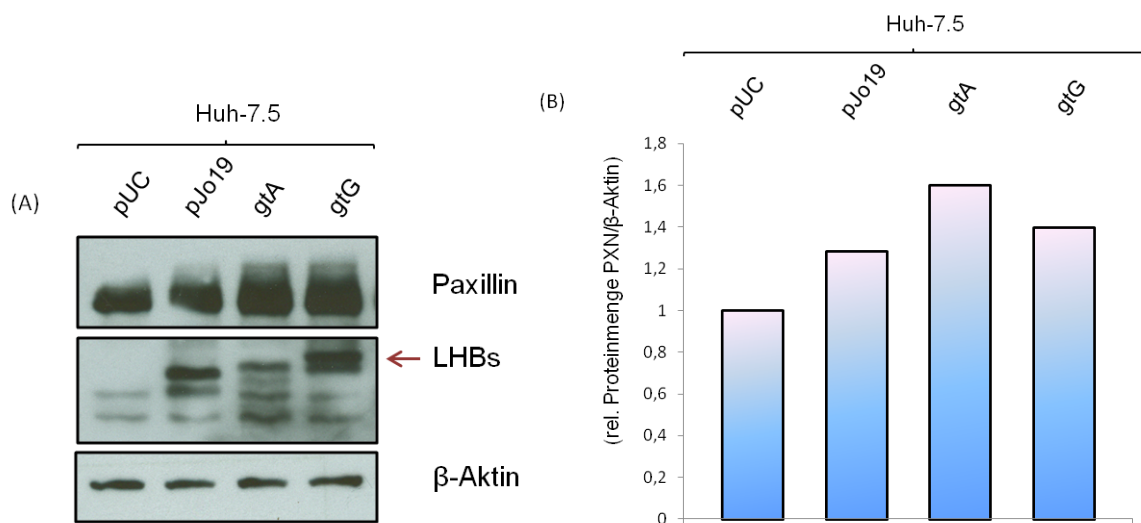


Abb. 8.12: Western Blot-Analyse: Erhöhte Paxillinexpression in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (V.2). (A) Der Western Blot zeigt HBV-positive Zellen (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtG) im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (Huh-7.5_pUC). Die obere Bande im LHBs-Blot ist die spezifische LHBs-Bande und dient als Nachweis der HBV-Expression, β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Verwendete Antikörper: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), MA 18/7 (LHBs), Anti- β -actin (β -Aktin). (B) Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Die Quantifizierung zeigt eine erhöhte Paxillinmenge in HBV-positiven Zellen.

Als nächstes wurde der Einfluss der verschiedenen HBV-Genotypen auf die PXN-Promotoraktivität bestimmt, dies erfolgte mit Hilfe eines Luziferase Assays. Die Luziferaseaktivität der Zelllysate wurde 48 h nach erfolgter Transfektion gemessen. Die Auswertung in Abb. 8.13 weist eine erhöhte PXN-Promotoraktivität in transient HBV-exprimierenden Zellen auf.

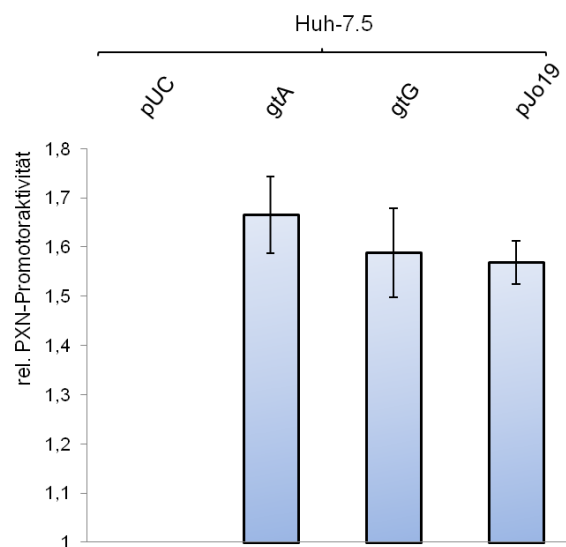


Abb. 8.13: Luziferase-Assay: Erhöhte PXN-Promotoraktivität in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen. Die Auswertung zeigt eine höhere Promotoraktivität von Paxillin in Genotypen-transfizierten Zellen. Als Negativkontrolle dient der Leervektor pUC (HBV-negative Zellen).

Um auch im transienten HBV-exprimierenden Zellkultursystem die mRNA quantifizieren zu können, wurde die Gesamt-RNA von Huh-7.5 Zellen, welche mit den verschiedenen HBV-Genotypen transfiziert wurden, isoliert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription und die Analyse der cDNA mittels RT-PCR.

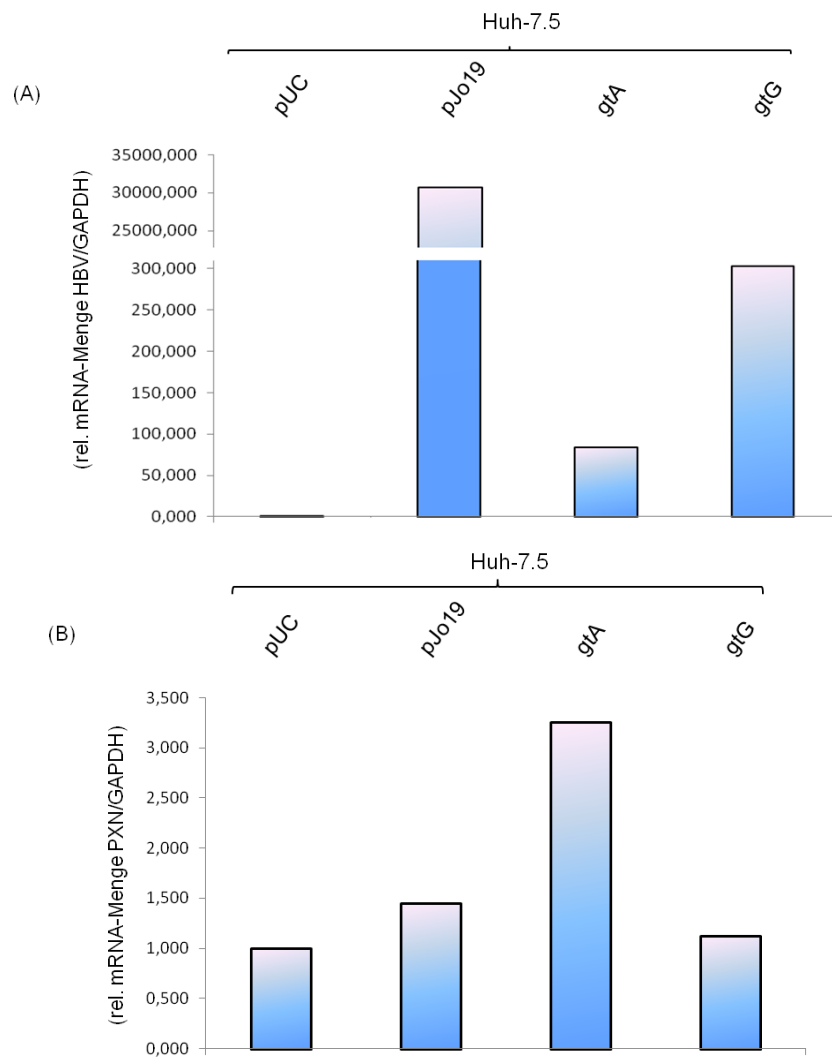


Abb. 8.14: RT-PCR-Analyse: Erhöhte PXN-mRNA-Menge in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen. (A) Die erhaltenen RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der relativen mRNA-Menge, welche für HBs kodiert, zeigt eine erfolgreiche Expression in den HBV-positiven Zellen (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtG) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Huh7.5_pUC-Zellen. (B) Die erhaltenen RT-PCR-Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Durch die Quantifizierung der RT-PCR-Ergebnisse ist eine erhöhte Menge an PXN-spezifischen Transkripten in HBV-positiven im Verhältnis zu den HBV-negativen Zellen feststellbar. Es wurden die HBV-spezifischen (#185 und #186) und die PXN-spezifischen (#393 und #480) sowie die GAPDH-spezifischen RT-PCR-Primer (#42 und #43) genutzt.

Die Daten belegen eine höhere Menge an PXN-spezifischen Transkripten in den HBV-positiven Zellen (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtG) im Vergleich zu den HBV-negativen Kontrollzellen (Huh-7.5_pUC) (Abb. 8.14). Zusammenfassend konnten damit die bisherigen Beobachtungen im stabil HBV-exprimierendem Zellkultursystem belegt werden. Die Menge an Paxillin ist sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in HBV-positiven Zellen erhöht.

8.1.5 Intrazelluläre Paxillinverteilung in transient HBV-exprimierenden Zellen

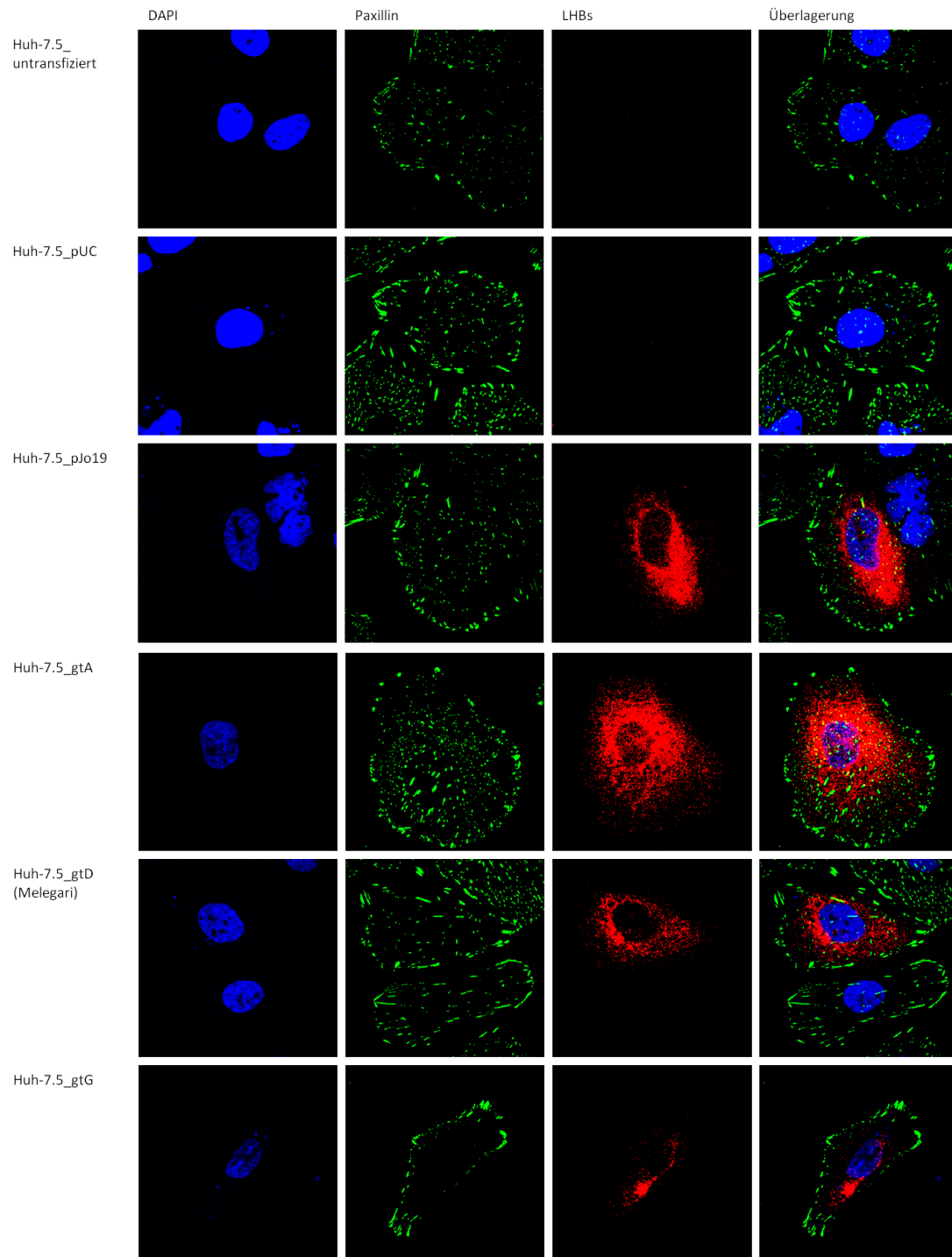


Abb. 8.15: Immunfluoreszenzanalyse von transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (1). Die Zellkerne sind in Blau dargestellt und wurden mit DAPI angefärbt. Für die Paxillinfärbung wurde der Anti-Paxillin-Antikörper (Kaninchen) genutzt, als zweiter Antikörper diente der Anti-rabbit IgG-Alexa488 und ist im grünen Kanal zu sehen. Zum Nachweis von HBV-positiven Zellen wurde der MA 18/7 (Anti-LHBsAg)-Antikörper verwendet (zweiter Antikörper: Antimouse IgG-Alexa546) und ist im roten Kanal sichtbar. Sowohl die Menge als auch die Verteilung von Paxillin in der Zelle weisen keine Veränderung zwischen HBV-positiven und -negativen Zellen auf.

Für die Begutachtung der intrazellulären Verteilung von Paxillin wurde eine Immunfärbung durchgeführt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Abb. 8.15 zeigt untransfizierte (Huh-7.5) und kontrolltransfizierte (Huh-7.5_pUC) HBV-negative Zellen im Vergleich zu den HBV-positiven Zellen, welche mit den unterschiedlichen Genotypen transfiziert wurden. Durch das LHBsAg des Hepatitis-B-Virus ist eine Unterscheidung möglich, dargestellt im roten Kanal. Die Paxillinverteilung ist im grünen Kanal sichtbar. Die Betrachtung der einzelnen Zellen zeigt kein unterschiedliches Verteilungsmuster oder eine erhöhte Paxillinexpression in HBV-positiven im Vergleich zu HBV-negativen Zellen. Für die Aufnahmen in Abb. 8.16 wurden statt des zuvor verwendeten Anti-LHBsAg- der Anti-HBsAg-Antikörper verwendet.

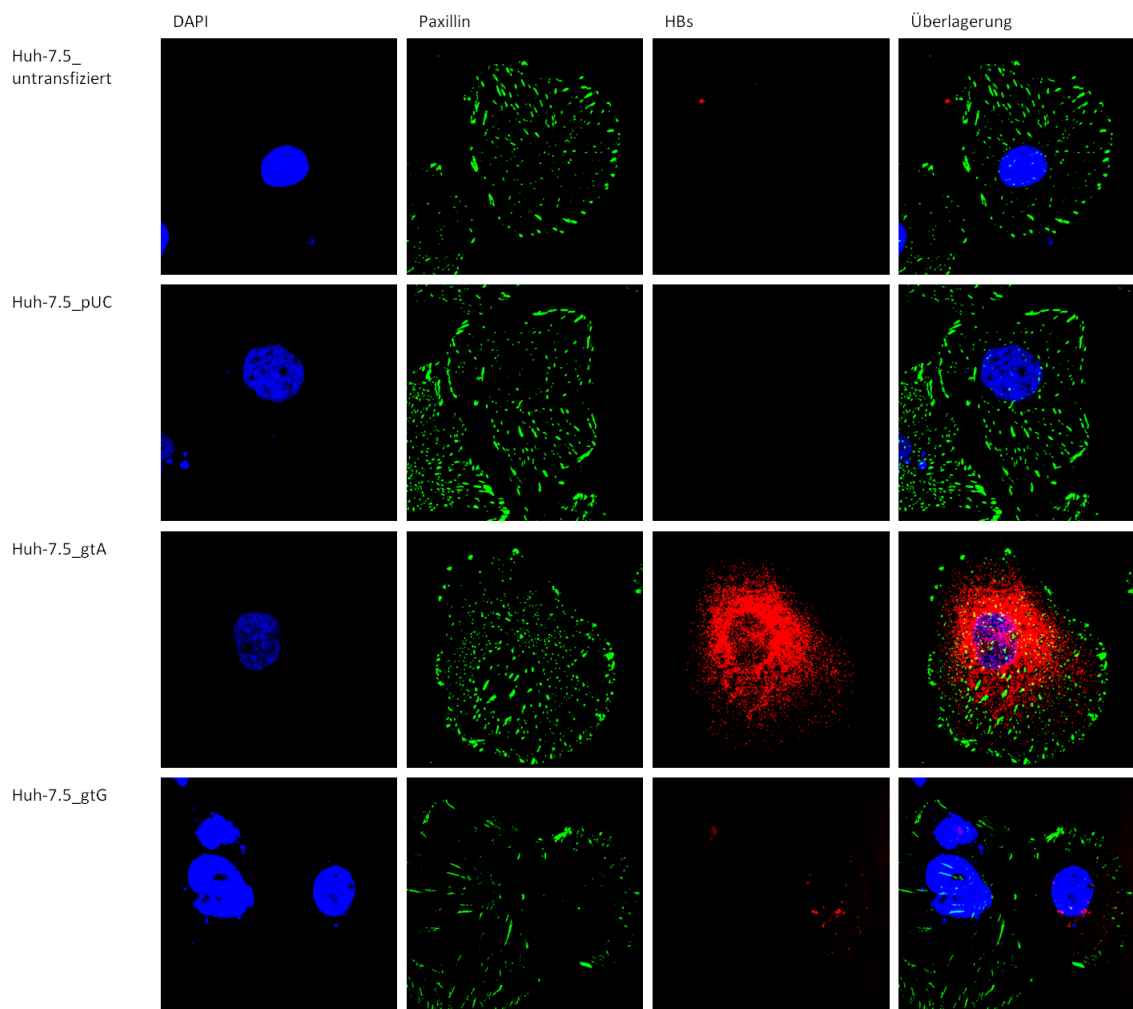


Abb. 8.16: Immunfluoreszenzanalyse von transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen (2).

Die Zellkerne sind in Blau dargestellt und wurden mit DAPI angefärbt. Für die Paxillinfärbung wurde der Anti-Paxillin-Antikörper (Kaninchen) genutzt, als zweiter Antikörper diente der Anti-rabbit IgG-Alexa488 und ist im grünen Kanal zu sehen. Zum Nachweis von HBV-positiven Zellen wurde der HB01 (Anti-HBsAg)-Antikörper verwendet (zweiter Antikörper: Anti-mouse IgG-Alexa546) und ist im roten Kanal sichtbar. Sowohl die Menge als auch die Verteilung von Paxillin in der Zelle weisen keine Veränderung zwischen HBV-positiven und -negativen Zellen auf.

8.1.6 Replikation von HBV führt zu verringerter PAXN-mRNA-Menge in infizierten primären Hepatozyten

In den *in vitro*-Experimenten konnte eine erhöhte Paxillinexpression in HBV-exprimierenden Zellen verzeichnet werden. Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung auch im Infektionsmodell festzustellen ist, wurde mit primären humanen Hepatozyten gearbeitet. Die PHHs wurden mit infektiösem Überstand von stabil HBV-exprimierenden Zelllinien (HepG2 2.2.15 oder HepAD38) über Nacht inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und analysiert. Der HBsAg-ELISA des ersten Infektionsversuches zeigt in Abb. 8.17 einen deutlichen Anstieg des HBsAg-Titers, daraus lässt sich eine erfolgreiche Infektion ableiten. Dazu wurden die verschiedenen Überstände der Erntezeitpunkte und der für die Infektion benutzte HepG2 2.2.15-Überstand gemessen. Als weiterer Nachweis einer erfolgten Infektion dient die erhöhte Menge der HBV-spezifischen Transkripten in infizierten PHHs im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen. Die Ergebnisse des ersten Infektionsexperiments (Abb. 8.18) zeigen eine verringerte mRNA-Menge, welche für Paxillin kodiert, bei erfolgreicher Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus.

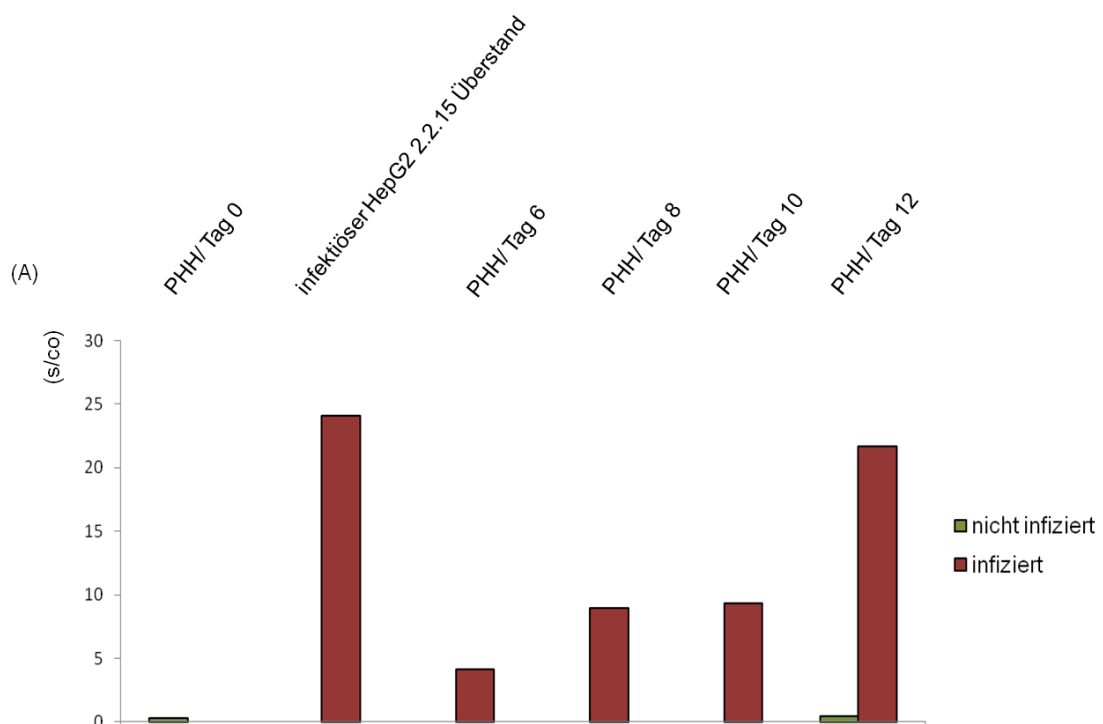


Abb. 8.17: HBsAg-ELISA zeigt erfolgte Infektion im PHH-Modell (V.1). Die Daten wurden mittels cut-off-Wert berechnet. Der HBsAg-ELISA zeigt eine erhöhte HBsAg-Menge im Überstand der infizierten PHHs, woraus sich die erfolgreiche Infektion ablesen lässt.

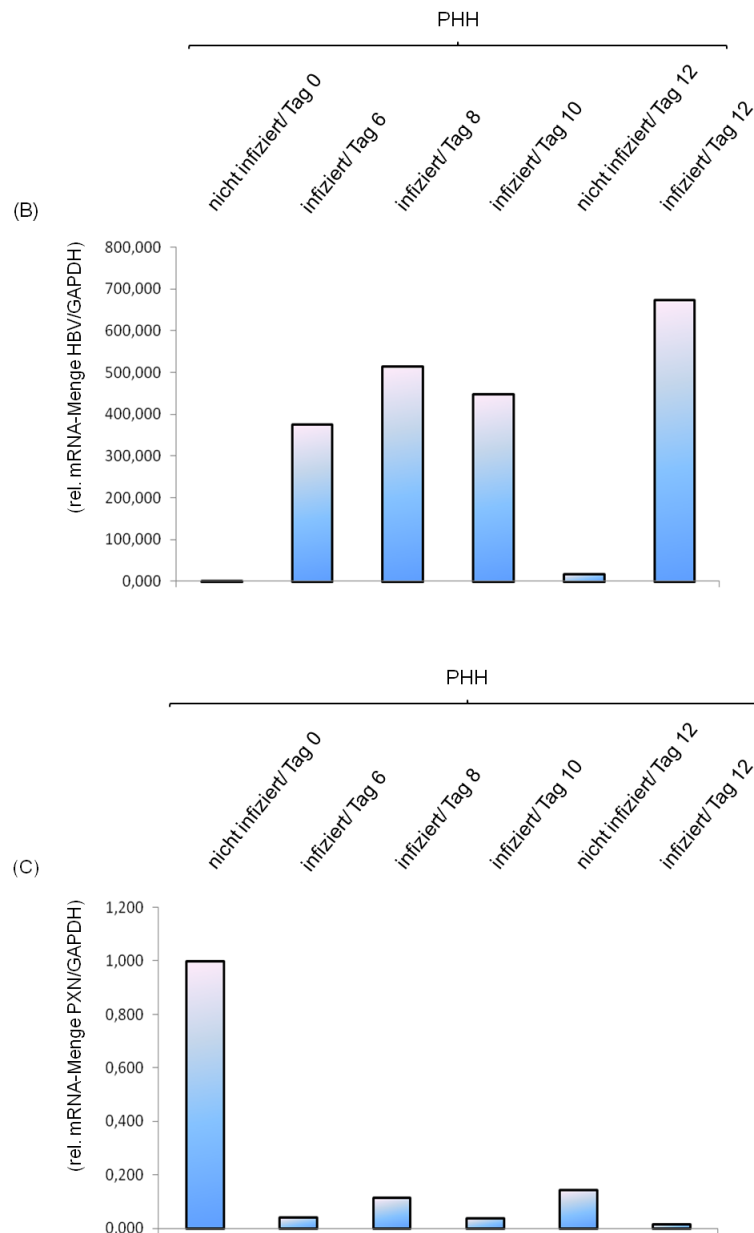


Abb. 8.18: RT-PCR-Analyse: verringerte PXN-mRNA-Menge in infizierten im Vergleich zu uninfizierten PHHs (V.1). (A) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der untersuchten cDNA zeigt eine stark erhöhte mRNA-Menge, welche für HBV kodiert, in den HBV-infizierten Zellen im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen. (B) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der cDNA weist bei erfolgter Infektion mit HBV eine verringerte Menge an PXN-spezifischen Transkripten im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen auf. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#185 und #186), PXN-spezifisch (#588 und #589), GAPDH-spezifisch (#42 und #43).

Auch die Daten des zweiten Infektionsversuches (Abb. 8.19 und 8.20), bei dem statt des HepG2 2.2.15-Überstandes für die Infektion der infektiöse Überstand von HepAD38-Zellen verwendet wurde, zeigen eine deutliche Abnahme der Menge an PNX-spezifischen Transkripten bei infizierten PHHs im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen.

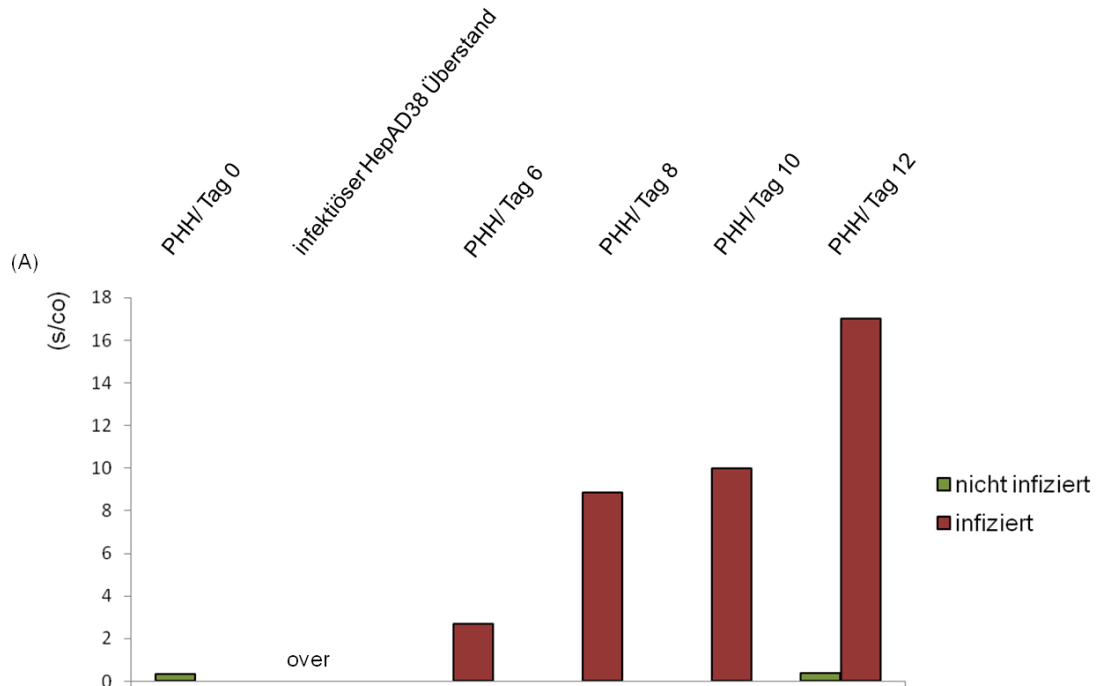


Abb. 8.19: HBsAg-ELISA zeigt erfolgte Infektion im PHH-Modell (V.2). Die Daten wurden mittels cut-off-Wert berechnet. Der HBsAg-ELISA zeigt eine erhöhte HBsAg-Menge im Überstand der infizierten PHHs, daraus lässt sich die erfolgreiche Infektion ableiten.

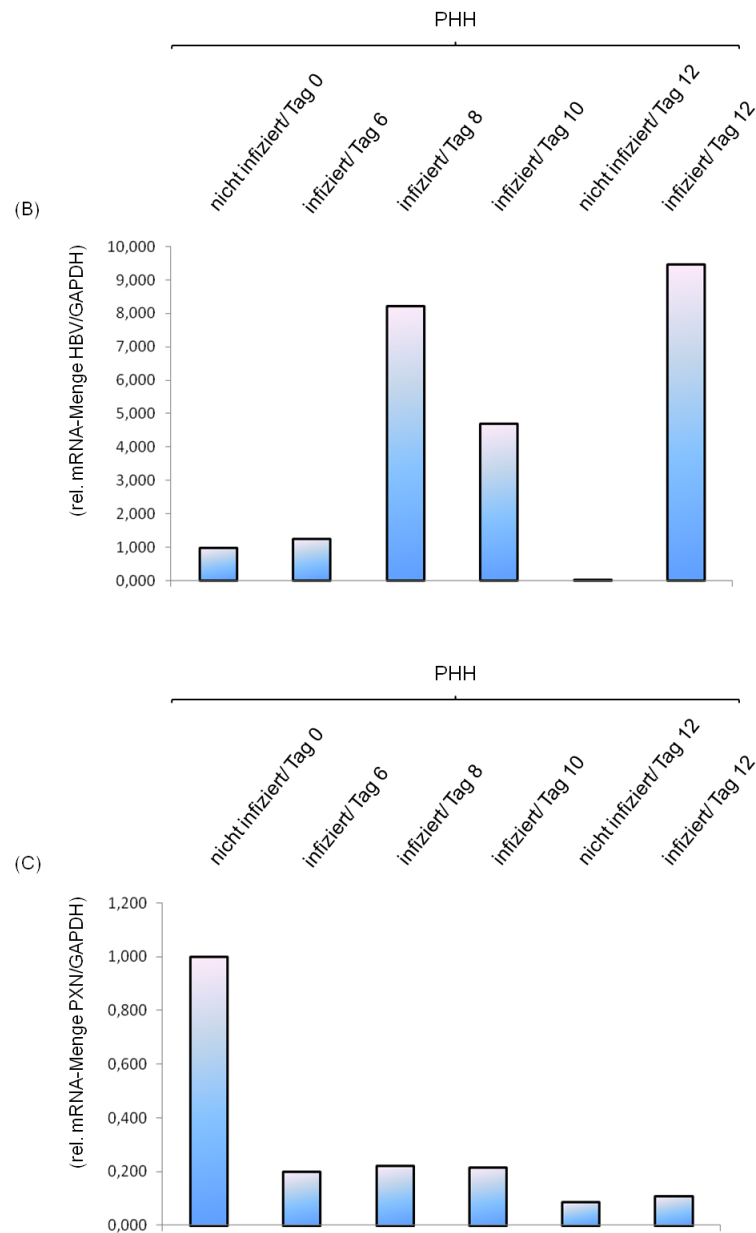


Abb. 8.20: RT-PCR-Analyse: Verringerte PXN-mRNA-Menge in infizierten im Vergleich zu uninfizierten PHHs (V.2).

(A) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der untersuchten cDNA zeigt bei erfolgter Infektion mit HBV eine stark erhöhte mRNA-Menge, welche für HBV kodiert, im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen. (B) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der cDNA weist bei erfolgter Infektion mit HBV eine verringerte Menge an PXN-spezifischen Transkripten im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen auf. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#405 und #406), PXN-spezifisch (#639 und #640), GAPDH-spezifisch (#42 und #43).

Bei einer sehr hohen Infektion im PHH-Modell ist es möglich, LHBs mittels Western Blot zu detektieren (Abb. 8.21 (A)). Die Quantifizierung zeigt keine (V.3.1) oder eine verringerte (V.3.2) Änderung im Paxillinexpressionslevel auf Proteinebene, jedoch konnte eine verringerte Menge an PXN-spezifischen Transkripten mittels RT-PCR beobachtet werden (Abb. 8.21 (B-D)).

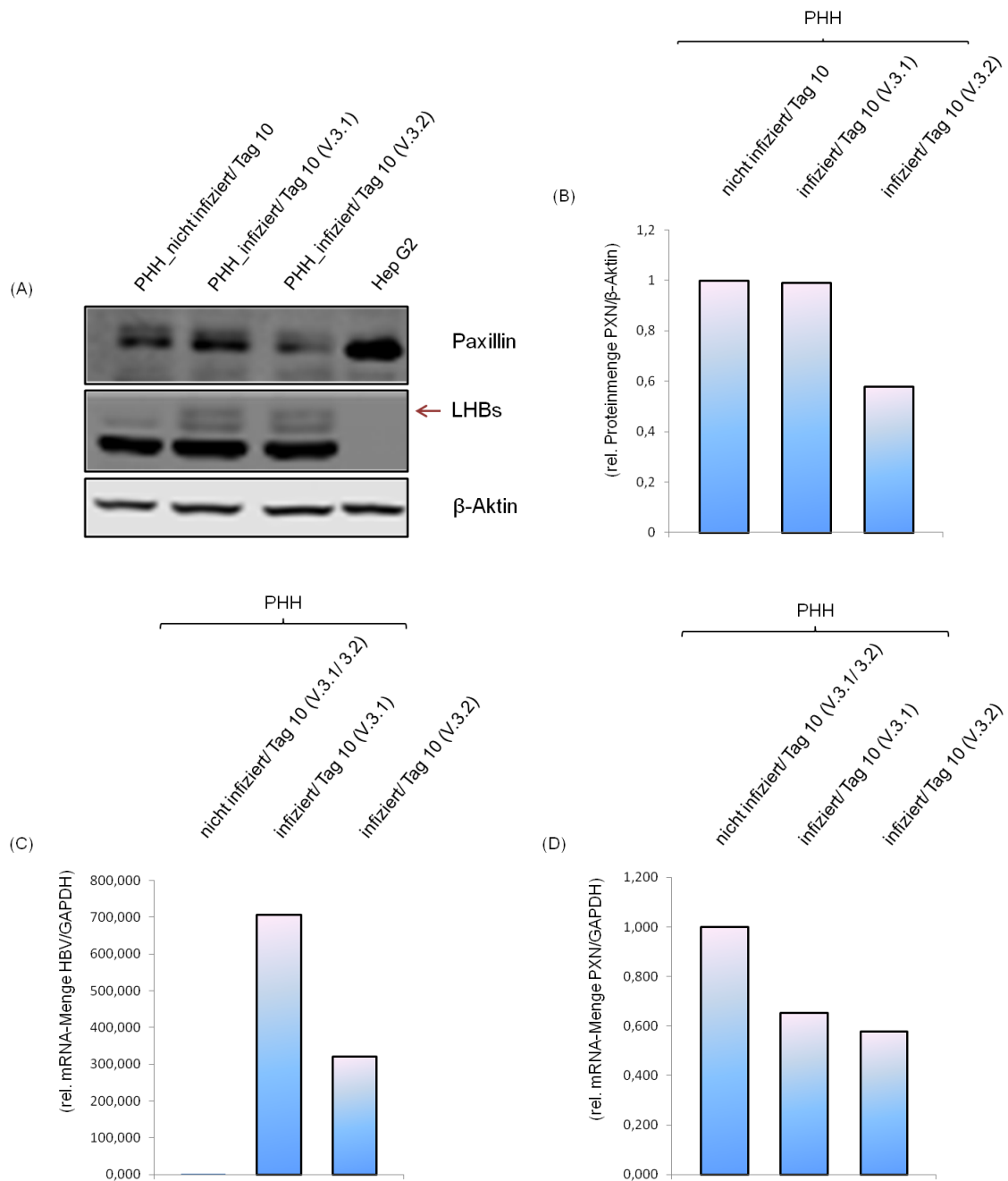


Abb. 8.21: Western Blot- und RT-PCR-Analyse: Verringerte PNXN-mRNA-Menge in infizierten im Vergleich zu uninfizierten PHHs (V.3). (A) Der Western Blot zeigt eine erfolgte Infektion, welche durch die obere spezifische LHBs-Bande nachgewiesen wurde. Verwendete Antikörper: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), MA 18/7 (LHBs), Anti- β -actin (β -Aktin). (B) Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Die Quantifizierung zeigt keine Unterschiede der Paxillinmenge auf Proteinebene der infizierten PHHs im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen. (C) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der untersuchten cDNA zeigt in den RT-PCR-Ergebnissen bei erfolgter Infektion mit HBV zeigt eine stark erhöhte Menge an HBV-spezifischen Transkripten im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen. (D) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Die Quantifizierung der cDNA weist bei erfolgter Infektion mit HBV eine verringerte Menge an PNXN-spezifischen Transkripten im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollzellen auf. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#405 und #406), PNXN-spezifisch (#639 und #640), GAPDH-spezifisch (#42 und #43).

Zusammenfassend konnten die drei unabhängigen Untersuchungen (n=3) im Infektionsmodell von primären humanen Hepatozyten die vorherigen Beobachtungen nicht bestätigen. Jedoch ist in allen PHH-Versuchen bei erfolgter Infektion eine verringerte Menge an PNXN-spezifischen Transkripten im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen zu verzeichnen.

8.2 *In vivo*

8.2.1 Expression von Paxillin in HBV-transgenen Mäusen

Um die Paxillinmenge und -verteilung im *in vivo*-System analysieren zu können, wurde das Mausmodell gewählt. Zur Beurteilung der Paxillinexpression in HBV-transgenen Mäusen wurden Leberzelllysate sowohl von männlichen als auch von weiblichen Tieren im Western Blot analysiert. Die Abb. 8.22 zeigt die Auswertung der Leberproben aus vier männlichen HBV-negativen und HBV-transgenen Mäusen. Der Nachweis von HBsAg im Blut der HBV-transgenen Tiere erfolgte mittels HBsAg-ELISA. Die Quantifizierung zeigt auf Grund der Standardabweichung keine Unterschiede in der Paxillinmenge. Eine mögliche Erklärung für die hohe Standardabweichung könnte das unterschiedlich Alter sowie der HBsAg-Titer der einzelnen Tiere sein.

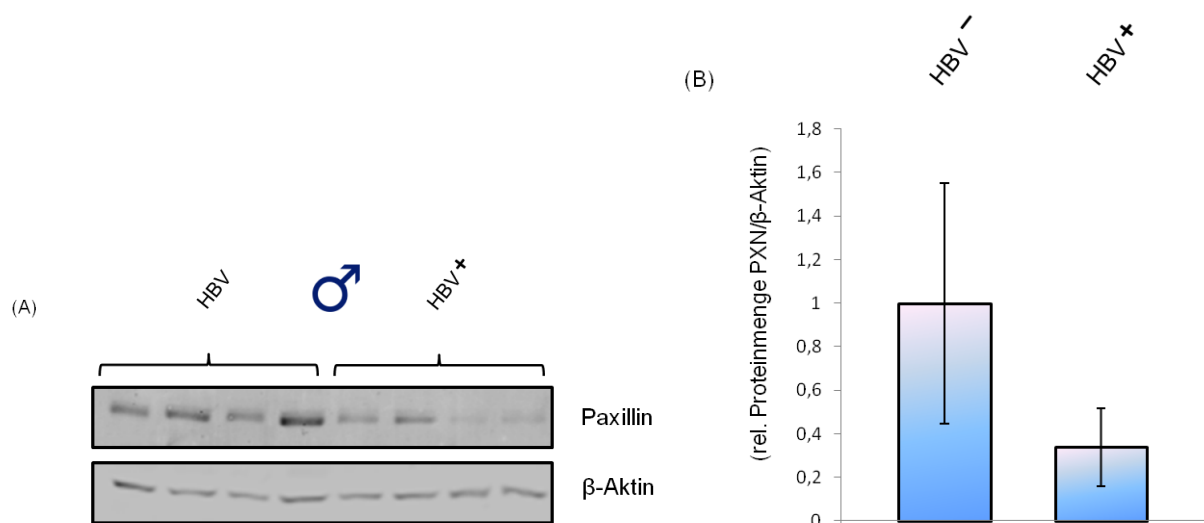


Abb. 8.22: Western Blot-Analyse von männlichen HBV-transgenen im Vergleich zu HBV-negativen Mäusen. (A) Der Western Blot aus Leberzelllysaten zeigt links die männl. HBV-negativ Mäuse und rechts die HBV-transgenen Tiere. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin genutzt. Verwendete Antikörper: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), Anti-β-actin (β-Aktin). (B) Die Daten wurden auf β-Aktin normalisiert. Die Quantifizierung (n=4) zeigt, dass es auf Grund der Standardabweichung keine Unterschiede in der Paxillinmenge auf Proteinebene zwischen männl. HBV-negativen und HBV-transgenen Mäusen gibt.

Die Analyse der weiblichen Mäuseleberzelllysate ergab auch keine Unterschiede der PNXN-Expression in den HBV-transgenen im Vergleich zu den HBV-negativen Tieren (Abb. 8.23).

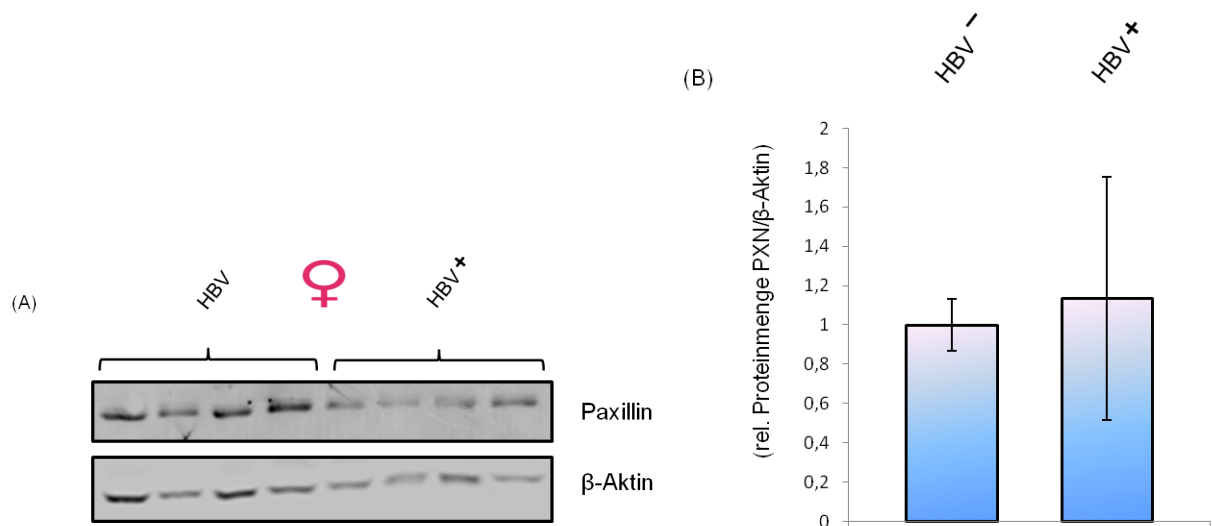


Abb. 8.23: Western Blot-Analyse von weiblichen HBV-transgenen im Vergleich zu HBV-negativen Mäusen. (A) Der Western Blot aus Leberzelllysaten zeigt links die weibl. HBV-negativ Mäuse und rechts die HBV-transgenen Tiere. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin genutzt. Verwendete Antikörper: Anti-Paxillin Kaninchen (Paxillin), Anti- β -actin (β -Aktin). (B) Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Die Quantifizierung (n=4) zeigt, dass es keine Unterschiede in der Paxillinmenge auf Proteinebene zwischen weibl. HBV-negativen und HBV-transgenen Mäusen gibt.

Als weitere Untersuchung wurde eine RT-PCR von cDNA-Proben, welche aus zuvor isolierter RNA transkribiert wurden, durchgeführt. Die Abb. 8.24 weist in männlichen HBV-transgenen im Vergleich zu HBV-negativ Mäusen eine niedrigere Menge an PNX-spezifischen Transkripten auf.

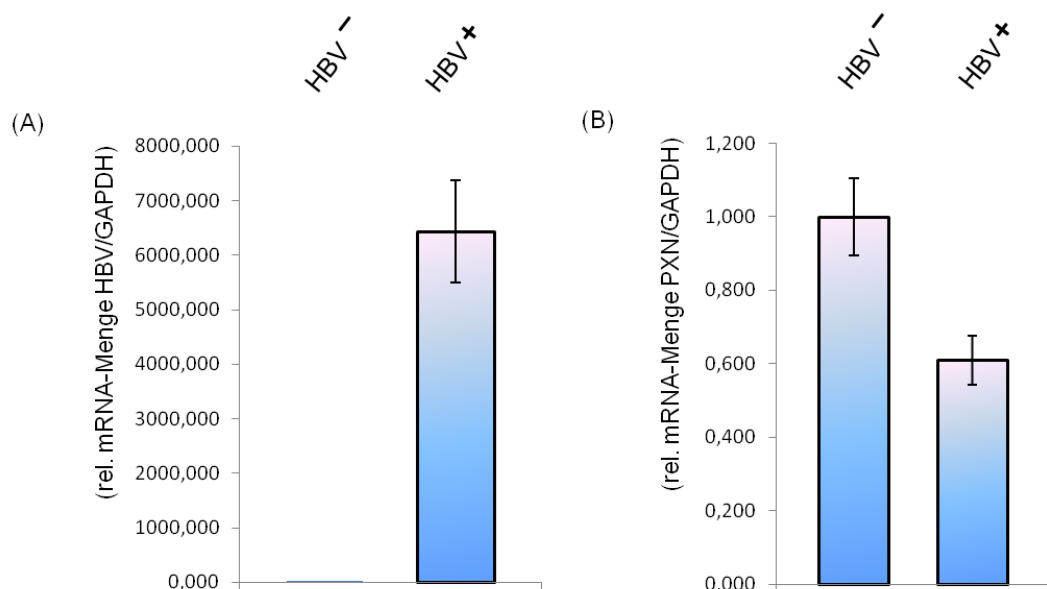


Abb. 8.24: RT-PCR-Analyse: Verringerte PNX-mRNA-Menge in männlichen HBV-transgenen im Vergleich zu HBV-negativen Mäusen. (A) Die Quantifizierung (n=4) zeigt einen sehr hohen mRNA-Anteil, welchen für HBV kodiert; dies dient als Nachweis für HBV-transgene Tiere. (B) Die Daten wurden auf GAPDH normalisiert. Zu sehen ist eine verringerte Menge an PNX-spezifischen Transkripten in den männl. HBV-transgenen im Vergleich zu den HBV-negativen Mäusen. Verwendete RT-PCR-Primer: HBV-spezifisch (#405 und #406), PNX-spezifisch (#639 und #640), GAPDH-spezifisch (#260 und #261).

Zur Beurteilung der Lebermorphologie wurden Leberschnitte von männlichen Mäusen mit HE gefärbt. Die Abb. 8.25 weist keine Veränderungen der Leberstruktur von männlichen HBV-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf.

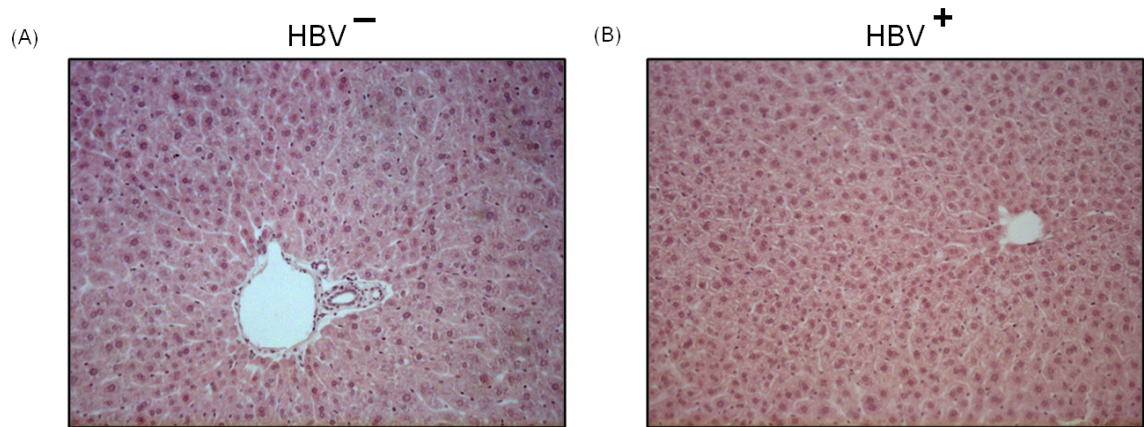


Abb. 8.25: HE-Färbung männlicher Mäuseleberschnitte. (A) HBV-negatives Tier. (B) HBV-transgenes Tier. Zwischen den Präparaten sind keine Unterschiede erkennbar.

Zur Begutachtung der intrazellulären Paxillinmenge und -verteilung im Mäusemodell wurden Leberschnitte männlicher Tiere angefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie beurteilt. Wie in Abb. 8.26 zu sehen ist, ist ein verstärktes Paxillinsignal in HBV-positiven Bereichen der HBV-transgenen Mäuse detektierbar. Die Färbung der viralen Oberflächenproteine, welche im roten Kanal sichtbar ist, ermöglicht eine genaue Unterscheidung von HBV-positiven und -negativen Zellen. Im grünen Kanal ist die Paxillinverteilung innerhalb der einzelnen Zellen zu erkennen, blau sind die Zellkerne. Die gelben Bereiche in den Überlagerungsbildern geben Hinweis auf eine mögliche partielle Kollokalisierung von Paxillin und den Oberflächenproteinen (LHBs, MHBs, SHBs) des Hepatitis-B-Virus.

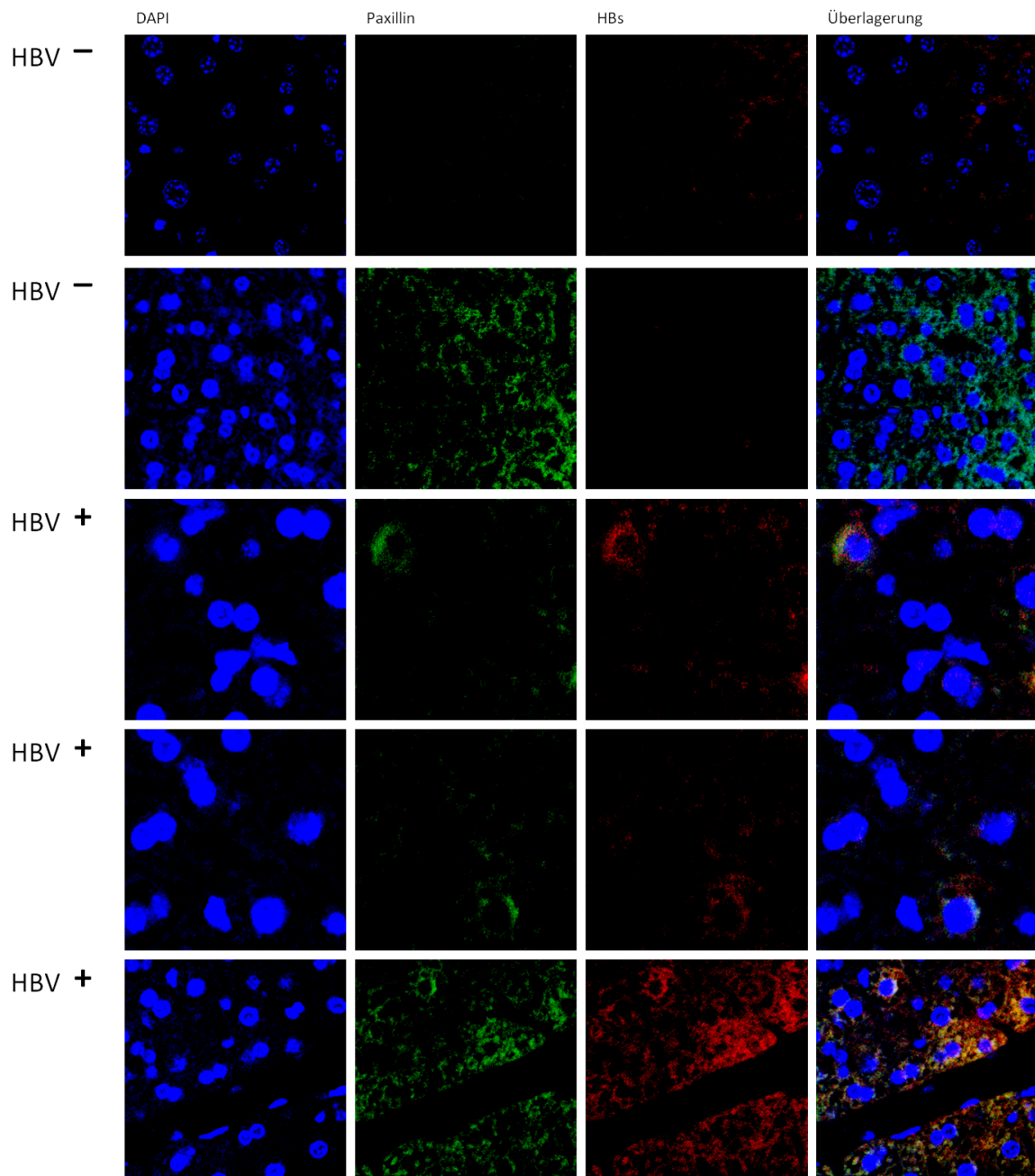


Abb. 8.26: Immunfluoreszenzanalyse: Verstärkte PAXN-Expression in männlichen HBV-transgenen Mäusen im Vergleich zu HBV-negativen Kontrolltieren. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und sind in Blau dargestellt. Für die Paxillinfärbung wurde der Anti-Paxillin-Antikörper (Kaninchen) benutzt (zweiter Antikörper: Anti-rabbit IgG-Alexa488) und ist im grünen Kanal zu sehen. Zum Nachweis von HBV-positiven Zellen wurde der Anti-HBsAg-Antikörper (Ziege) verwendet (zweiter Antikörper: Anti-goat IgG-Cy3) und ist im roten Kanal sichtbar. Die Aufnahmen zeigen eine verstärkte Paxillinanreicherung in HBV-positiven Bereichen der HBV-transgenen Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die gelben Bereiche bei der Überlagerung geben Hinweis auf eine mögliche partielle Kolo-kalisation von Paxillin und den Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus.

Abschließend konnten durch die Experimente im Mausmodell nur die vorherigen Beobachtungen auf intrazellulärer Ebene in den *in vitro*-Modell-Untersuchungen, welche ein verstärktes Paxillin-signal in HBV-positiven Zellen zeigten, bestätigt werden. Die Daten der RT-PCR decken

sich mit denen des Infektionsmodells und weisen eine verringerte Menge an PXN-spezifischen Transkripten in HBV-transgenen Tieren auf.

8.2.2 Expression von Paxillin in HBV-infizierten Patienten

Da sowohl die *in vitro*- als auch die Aufnahmen der Mäuseleberschnitte eine verstärkte Paxillinanreicherung im HBV-positiven Zell- und Gewebebereichen zeigten, wurden zudem Gewebeproben von Patienten mit HBV-assoziiertem hepatozellulärem Karzinom angefärbt und analysiert.

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie diente auch in diesem Fall der intrazellulären Beurteilung. In der Abb. 8.27 sind die Aufnahmen dargestellt und es ist erneut ein verstärktes Paxillinsignal in HBV-positiven Bereichen detektierbar. Die Färbung der viralen Oberflächenproteine, welche im roten Kanal sichtbar ist, ermöglicht eine genaue Unterscheidung von HBV-positiven und -negativen Zellen. Im grünen Kanal ist die Paxillinverteilung innerhalb der einzelnen Zellen zu erkennen, die Zellkerne sind blau. Die gelben Bereiche in den Überlagerungsbildern geben Hinweis auf eine mögliche partielle Kolo-kalisation von Paxillin und den Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus. Somit bestätigt dieser Versuch die zuvor schon im stabilen Zellkultursystem und Mäusemodell gezeigte erhöhte Paxillinexpression in HBV-exprimierenden Zellen.

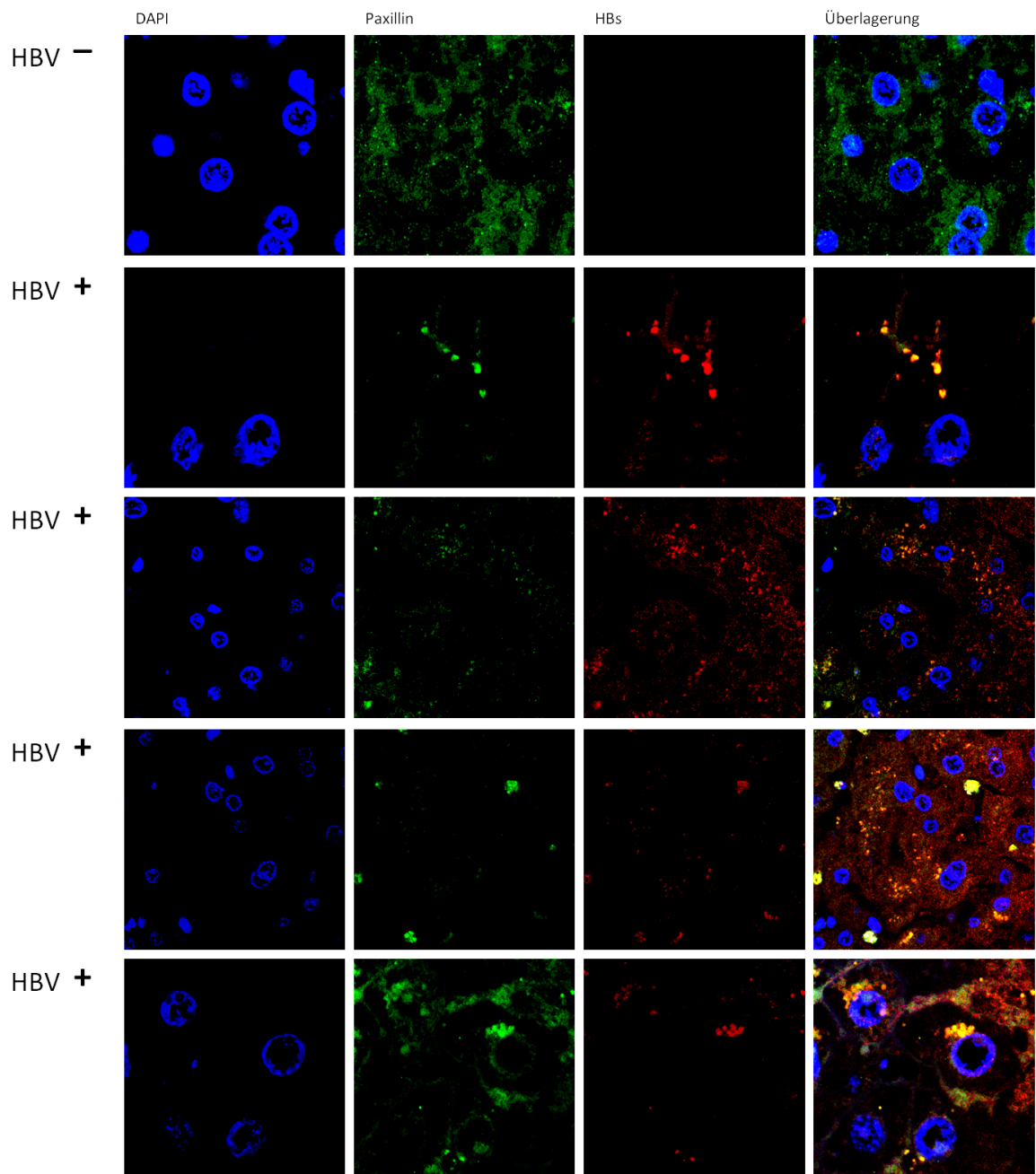


Abb. 8.27: Immunfluoreszenzanalyse: Verstärkte PXN-Expression in Gewebeproben von Patienten mit HBV-assoziiertem hepatozellulärem Karzinom im Vergleich zu Kontrollgewebe. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und sind in Blau dargestellt. Für die Paxillinfärbung wurde der Anti-Paxillin-Antikörper (Kaninchen) benutzt (zweiter Antikörper: Anti-rabbit IgG-Alexa488) und ist im grünen Kanal zu sehen. Zum Nachweis von HBV-positiven Zellen wurde der Anti-HBsAg-Antikörper (Ziege) verwendet (zweiter Antikörper: Anti-goat IgG-Cy3) und ist im roten Kanal sichtbar. Die Aufnahmen zeigen eine verstärkte Paxillinanreicherung in HBV-positiven Bereichen des Lebergewebes von Patienten. Die gelben Bereiche bei der Überlagerung geben Hinweis auf eine mögliche partielle Kolo-kalisation von Paxillin und den Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus.

9 Diskussion

Das Hepatitis-B-Virus hat weltweit eine sehr große Bedeutung, momentan sind ca. 350 Millionen Menschen chronisch erkrankt. Global betrachtet leben etwa zwei Milliarden Menschen mit einer bestehenden oder ausgeheilten HBV-Infektion. Der Schutz vor einer Infektion kann nur durch eine Impfung gewährleistet werden, wobei eine erfolgte Infektion mit HBV je nach Schwere der Infektion individuell behandelt wird. Liegt die chronische Form vor, ist mit schweren Folgen für den Körper zu rechnen. Als eine der schlimmsten Verlaufsformen gilt die Entwicklung einer Leberzirrhose, Leberinsuffizienz oder eines hepatozellulären Karzinoms. Die derzeitigen Behandlungen können nur dazu beitragen, die Virusverbreitung einzudämmen, es kann aber keine vollständige Heilung erzielt werden. Eine große Hürde für die weitere Entwicklung neuer Therapiekonzepte ist die Vielzahl ungeklärter Fragen bezüglich des Viruseintritts und seines Lebenszyklus.

Ziel dieser Arbeit war es, die Relevanz des signaltransduzierenden Adaptorproteins Paxillin für den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus zu untersuchen. Dieses Protein ist physiologisch gesehen ein wichtiger Baustein in den *focal adhesions*, welche Bedeutung sowohl für die Signalweiterleitung in sowie aus der Zelle haben als auch die Integrität dieser sicherstellen. Durch verschiedene Publikationen aus den Bereichen der Krebsforschung wurde gezeigt, dass Paxillin eine pathologisch wichtige Funktion im Tumorgeschehen einnimmt (Kap. 4.2.4). Somit ist auch eine HBV-vermittelte pathologische Veränderung der Paxillinexpression denkbar, wie dies bei anderen Tumorarten wie zum Beispiel bei Gebärmutter-, Eierstock- und Bauchspeicheldrüsenkrebs der Fall ist (Deakin et al., 2012). Das Hepatitis-B-Virus repliziert vorwiegend in sich nicht-teilenden sessilen Zellen und bevorzugt somit stabile *focal adhesion*-Komplexe, welche als reversible dynamische Strukturen anzusehen sind. Auf Grund dieses Wissens in Verbindung mit den schon gewonnenen Erkenntnissen der PXN-Funktion in speziellen Krebsarten wurde der Zusammenhang von HBV und PXN auf die mögliche Entwicklung neuer therapeutischer Strategien untersucht.

Expression von HBV führt zu erhöhter Bildung von Paxillin in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Expressionsmenge von Paxillin auf Proteinebene in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien (HepG2 2.2.15 und HepAD38) im Vergleich zu HBV-negativen Kontrollzellen (Hep G2) mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Es konnte eine erhöhte Menge an PNXN-spezifischen Transkripten in den HBV-positiven Zellen festgestellt werden (Abb. 8.1). Durch die Überprüfung der Menge an Paxillin auf Proteinebene konnte ebenfalls eine Erhöhung dieser verzeichnet werden (Abb. 8.2). Somit ist die erhöhte PNXN-Expression auf Proteinebene in den stabil HBV-exprimierenden Zellen in Bezug auf die Kontrollzellen sehr wahrscheinlich auf eine erhöhte Transkription und nicht auf einen verminderten Proteinabbau zurückzuführen. Das PCR-Ergebnis in Abb. 8.3 zeigt eine deutlich gesteigerte Menge an PNXN-spezifischen Transkripten in den stabil HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Hep G2-Zellen. Dass keine Paxillinbande trotz gut sichtbarer Ladekontrolle (GAPDH-Bande) bei den HBV-negativen Zellen zu detektieren ist, kann in der zu geringen PCR-Zyklusanzahl begründet sein. Da die Negativkontrolle keine Hinweise auf Verunreinigung zeigt, ist es möglich, dass die benötigte PCR-Zyklusanzahl eine zu große Differenz aufweist, um sowohl bei den HBV-positiven als auch bei den HBV-negativen Zellen ein gutes PNXN-Signal zu bekommen. Mittels quantitativer PCR (RT-PCR) konnte in allen Versuchen eine gesteigerte Menge an PNXN-spezifischen Transkripten in den HBV-positiven Zelllinien (HepG2 2.2.15 und HepAD38) im Vergleich zu den Kontrollzelllinie (Hep G2) gezeigt werden. Betrachtet man die Unterschiede innerhalb der stabil HBV-exprimierenden Zelllinien einzeln, so ist beim ersten Experiment (Abb. 8.4) die PNXN-mRNA-Menge in den HepAD38- höher als in den HepG2 2.2.15-Zellen; dies gilt auch für die HBV-spezifischen Transkripte. Im zweiten Experiment (Abb. 8.5) ist die gesteigerte Menge an PNXN-spezifischen Transkripten in den HepG2 2.2.15- vergleichend mit den HepAD38-Zellen zu sehen. Die höhere HBV-mRNA-Menge ist bei den HepAD38-Zellen zu verzeichnen. Das letzte der drei Experimente (Abb. 8.6) ähnelt den Ergebnissen der Quantifizierung des zweiten Versuchs. Auch hier liegt eine gesteigerte Menge an PNXN-Transkripten in den HepG2 2.2.15- im Vergleich zu den HepAD38-Zellen vor. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass immer eine gesteigerte Menge an PNXN-spezifischen Transkripten in stabil HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Zellen zu detektieren ist. Dass es beim Vergleich der Menge an Paxillin auf mRNA-Ebene der stabilen Zelllinien untereinander starke Schwankungen gibt, ist wahrscheinlich der unterschiedlichen Passagenzahl der bei den Versuchen verwendeten Zellen geschuldet.

Durch die gewonnenen Ergebnisse wurde eine erhöhte Menge an Paxillin in HBV-positiven Zellen nachgewiesen, damit konnte eine Relevanz dieses Proteins für den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus gezeigt werden. Die Bedeutung von Paxillin könnte möglicherweise in der Rolle als Helfer bei der Virusaufnahme bestehen. Bekannt ist, dass das extrazelluläre Fibronectin in den Lebersinusoiden über die PreS2-Domäne des Hepatitis-B-Virus gebunden wird und somit

eine Kontaktfläche mit diesem und Heparansulfat-Proteoglykanen entsteht (Budkowska et al., 1995; Schulze et al., 2007). So kann eine Verbindung zu den funktionsreichen *focal adhesions* geschaffen und eine Fibronektin-Paxillin-Interaktion sowie ein über die Fibronektin-Integrin-Verknüpfung medierter Einfluss auf Paxillin ausgeübt werden (Kap. 4.2.3 und 4.2.3). Somit könnte eine Abhängigkeit des Lebenszyklus von HBV von der umgebenden Matrix durch die veränderte Paxillinexpression widerspiegelt werden.

Knockdown der Paxillinexpression führt zu erhöhter Bildung von LHBs auf Proteinebene und verringerter HBV-Menge auf mRNA-Ebene in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien

Zur weiteren Untersuchung wurde der *Knockdown* von Paxillin in stabil HBV-exprimierenden Zellen (HepG2 2.2.15 und HepAD38) durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Die Abb. 8.7 zeigt, dass durch die erfolgreiche Deregulation der PXN-spezifischen Transkripte eine erhöhte LHBs-Menge im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (Hep G2) detektierbar ist. Dies ist sowohl in den HepG2 2.2.15- als auch in den HepAD38-Zellen der Fall. Betrachtet man den *Knockdown* des Proteins und dessen Folgen auf intra- und extrazellulärer Ebene, so konnte gezeigt werden, dass nicht nur die gesteigerte intrazelluläre LHBs-Menge auf Proteinebene, sondern auch eine verringerte extrazelluläre HBsAg-Menge im Überstand der Zellen in beiden stabil HBV-exprimierenden Zelllinien vorliegt (Abb. 8.8 und 8.9). Auf mRNA-Ebene ist mittels quantitativer RT-PCR eine verringerte intrazelluläre Menge an HBV- sowie PXN-spezifischer Transkripte messbar. Die Menge an extrazellulärer viraler DNA im Überstand der Zellen weist keine Veränderung auf. Der Effekt eines *Knockdowns* von Paxillin ist in beiden HBV-positiven Zelllinien gleich.

Ein Reduktion der Paxillinexpression hat eine gesteigerte LHBs-Menge auf Proteinebene in stabil HBV-exprimierenden Zellen zur Folge. Zudem ist eine verminderten Menge an HBV-Transkripten detektierbar. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Erhöhung der Viruslast durch einen verzögerten Proteinabbau bedingt ist. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die 2.4- und 2.1-kb HBV-Transkripte stärker betroffen sind als das 3.5-kb HBV-Transkript. Dies würde zu einer geringeren Menge an SHBs führen und hätte eine unveränderte Menge an Virus im Überstand sowie von intrazellulärem LHBs zur Folge. Bedingt ist, da die gesunkene Menge an HBV-Transkripten in den behandelten Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen eigentlich eine verringerte Transkription von HBV bewirken müsste. Somit ist eine positiv-regulatorische Funktion von Paxillin möglich.

Intrazelluläre Paxillinverteilung: Akkumuliertes Verteilungsmuster in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien

Die Aufnahmen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (Abb. 8.10) zeigen eine wesentlich höhere Paxillinmenge auf intrazellulärer Ebene der HBV-positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Hep G2, HBV-negativ). Die Verteilung von Paxillin ist in akkumulierter Form rings um den Zellkern zu sehen. Das Verteilungsmuster in den HBV-negativen Zellen ist diffus und es stellt sich eine geringere Menge an Paxillin innerhalb der Zelle dar. Die gelben Bereiche, welche in den Überlagerungsbildern zu sehen sind, zeigen sich in den HBV-positiven HepG2 2.2.15-Zellen. Das bedeutet, dass es möglicherweise eine partielle Kollokalisierung, was eine Verbindung zu den *focal adhesions* nachweisen würde. Diese Verknüpfung könnte medien Einfluss auf Paxillin haben und damit dem HBV-Lebenszyklus dienen.

Transiente Expression von HBV führt zu erhöhter Bildung von Paxillin in transfizierten Zellen

Um weitere Hinweise auf die Paxillinmenge und -verteilung in HBV-positiven Zellen zu erlangen, wurde diese Fragestellung im transient HBV-exprimierenden Zellkultursystem untersucht. Die Quantifizierung der Western Blot-Analyse (Abb. 8.11 und 8.12) zeigt eine höhere Paxillinmenge auf Proteinebene in den mit verschiedenen Genotypen transfizierten Zellen (Huh-7.5_pJo19/gtA/gtD/gtG) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Huh-7.5_pUC-Zellen (HBV-negativ). Der höchste Anstieg ist bei den Genotypen A und G zu verzeichnen, gefolgt von den mit pJo19 transfizierten Zellen. Bei der Analyse der Zellen mittels Western Blot und RT-PCR ist zu beachten, dass sowohl transfizierte als auch untransfizierte Zellen einbezogen werden. Das bedeutet, es wird die Gesamtheit aller vorhandenen Zellen untersucht. Somit ist der Effekt an die Transfektionseffizienz gekoppelt. Die RT-PCR-Auswertung (Abb. 8.14) zeigt eine verstärkte Bildung der Menge an PXN-spezifischen Transkripten in den transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den HBV-negativen Zellen (Huh-7.5_pUC). Die Durchführung des Luziferase Assay (Abb. 8.13) zeigt zudem eine gesteigerte PXN-Promotoraktivität in HBV-positiven Zellen (Huh7.5_pJo19/gtA/gtG). Die IF-Aufnahmen (Abb. 8.15 und 8.16) zeigen keinen Unterschied in der Paxillinmenge sowie -verteilung in transient HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Zusammenfassend konnte der zuvor beobachtete Effekt der erhöhten Paxillinexpression in stabil HBV-exprimierenden Zellen im Vergleich zu HBV-negativen Kontrollzellen auch im transient HBV-exprimierenden Zellkultursystem nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall ist die gesteigerte Menge an Paxillin auf Proteinebene durch die erhöhte Transkription und nicht durch verminderten Proteinabbau sehr wahrscheinlich. Dies wurde durch die gesteigerte Menge an PXN-spezifischen Transkripten in den Genotypen-transfizierten Zellen deutlich. Die

Tatsache, dass in die humane Hepatomzelllinie Huh-7.5 die Einbringung des HBV-Genoms durch Transfektion möglich ist, diese Zellen jedoch gegenüber einer HBV-Infektion nicht suszeptibel sind, könnte eine mögliche Erklärung für den nicht vorhandenen Unterschied der Paxillinmenge sowie -verteilung in den LSM-Aufnahmen im transient HBV-exprimierenden Zellkultursystem im Vergleich zu den Aufnahmen der stabil HBV-exprimierenden HepG2 2.2.15 sein (Gripon et al., 2002).

Replikation von HBV führt zu verringerter PXN-mRNA-Menge in infizierten primären Hepatozyten

Die Verwendung von Zellen, welche gegenüber einer HBV-Infektion suszeptibel sind, ist auf Grund der stark beschränkten Verfügbarkeit, der unterschiedlichen Qualität und des rapiden Verlustes der Suszeptibilität starken Schwankungen und Beschränkungen unterlegen (Gripon et al., 2002). Die hier verwendeten primären humanen Hepatozyten wurden nach erfolgreicher Isolation umgehend in das Institut verbracht und mit Hilfe von infektiösem HBV-enthaltenden Überstandes infiziert. Die Ergebnisse zeigen eine Reduzierung der Menge an PXN-spezifischen Transkripten bei erfolgreicher Infektion mit HBV (Abb. 8.18, 8.20 und 8.21). Als denkbare Ursache kann der zu kurze Beobachtungszeitraum von 12 Tagen angeführt werden. Es ist abzuklären, ob bei einer länger bestehenden HBV-Infektion die PXN-Expressionsmenge steigt und dann derselbe Effekt wie im stabil HBV-exprimierenden Zellkultursystem zu beobachten ist. Zudem ist ein unter Umständen starker Einfluss auf die Paxillinexpression durch das Herauslösen der PHHs aus der intakten Leberzellmatrix und die nur kurze Adaptionszeit an die neue Kollagen-Matrix ohne Fibronectin auf den Platten bei der Interpretation der Ergebnisse mit einzubeziehen. Denn wie bereits angesprochen, könnte so eine Verbindung zu den funktionsreichen *focal adhesions* geschaffen werden und eine Fibronectin-Paxillin-Interaktion sowie ein über die Fibronectin-Integrin-Verknüpfung mediiertes Einfluss auf Paxillin ausgeübt werden (Kap. 4.2.3 und 4.2.3). Damit wäre der beobachtete HBV-abhängige Effekt eher als sekundär zu betrachten.

Expression von HBV in *in vivo*-Modellen

Weiterhin wurde der Einfluss von HBV auf die Paxillinexpression in einem HBV-transgenen Mausmodell untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen auf der Proteinebene (Abb. 8.22 und 8.23) keine Veränderung der Paxillinmenge. Auf mRNA-Ebene (Abb. 8.24) ist in den männlichen HBV-transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren (HBV-negativ) eine verringerte Menge der PXN-mRNA detektierbar. Da nun Lebergewebeproben von einem lebenden Organismus verwendet und nicht im Zellkultursystem behandelt wurden, müssen Schwankungen zum Beispiel durch Alter und unterschiedlichen HBsAg-Titer berücksichtigt

werden. Das bedeutet, dass möglicherweise kein Unterschied im Western Blot nachweisbar ist, da die Leber durch Blutperfusion versorgt wird und bei der Isolation des Lebergewebes mit anschließender Analyse auf Protein- und mRNA-Ebene die Bestandteile des Blutes ebenfalls in die Messungen miteinbezogen werden. So könnten vorhandene Serumreste bei der Normalisierung interferieren. Die verringerte Menge an PXN-spezifischen Transkripten war auch zuvor in den HBV-positiven Zellen im PHH-Versuch der Fall. Die Mäuse sind jedoch nicht empfänglich für eine HBV-Infektion, deshalb wurden gentechnisch veränderte Tiere auf Basis der C57BL/6-Linie verwendet, welche das HBV-Genom besitzen (Guidotti et al., 1995). Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie zeigen jedoch wie in den zuvor beschriebenen HepG2 2.2.15-Zellversuchen eine gesteigerte Paxillinexpression in HBV-positiven Bereichen des untersuchten Lebergewebes. Auch hier zeigen die gelben Bereiche eine möglicherweise partielle Kolo-kalisation von Paxillin und den HBV-spezifischen Oberflächenproteinen an (Abb. 8.26). Es ist möglich, dass HBV-spezifische Proteine eine Verbindung zu den *focal adhesions* über eine Paxillinbindung erhalten.

Bei der Untersuchung, ob die Paxillinexpression nach einer HBV-Infektion auch im humanen System regulatorische Veränderungen aufweist (Abb. 8.27), wurde ähnlich wie bei den Aufnahmen der Lebergewebeschnitte der Mäuse verfahren. Es ist, ebenso wie bei den Gewebeschnitten der Mäuse, eine erhöhte Paxillinmenge in den HBV-positiven Bereichen in den mit einem HBV-assoziierten HCC-Gewebeproben von Patienten im Vergleich zu den Kontrollschnitten zu sehen. Zu beachten ist, dass es wahrscheinlich andere Regulationsmechanismen im murinen System bezüglich der Paxillinsteuerung gibt. Sowohl die Gewebeschnitte der Mäuse als auch die der Patienten zeigen eine möglich partielle Kolo-kalisation von Paxillin und den Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus. Durch zukünftige Experimente muss genauer charakterisiert werden, welche der drei Oberflächenproteine des HBV daran beteiligt sind und über welche Mechanismen sie Einfluss auf Paxillin nehmen. Offensichtlich ist jedoch, dass es einen Zusammenhang zwischen der PXN-Expression und dem Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus gibt und somit auch des Virus-induzierten HCCs.

Ausblick

Durch die gezeigte Relevanz des signaltransduzierenden Adaptorproteins Paxillin auf den Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus müssen zukünftige Untersuchungen klären, inwieweit diese Erkenntnis, dass die Expression von HBV zu einer erhöhten Menge an Paxillin in stabil HBV-exprimierenden Zellen führt, für die Bekämpfung der HBV-Erkrankung genutzt werden kann. Die umfangreichen Daten aus den stabil HBV-exprimierenden HepG2 2.2.15- und HepAD38-Zellen zeigen, dass dieser Effekt eindeutig in stabil HBV-exprimierenden Zelllinien beobachtet werden kann. In den transient HBV-exprimierenden Zellen ist durch die Steigerung der Transfektionseffizienz und eventuell eine längere Zeit nach der Transfektion und vor der Analyse der intrazellulären Verteilung ein stärkerer Effekt auf die Veränderung der Paxillinexpression zu

erzielen. Es muss weiter an der Verbesserung der Konditionen in den *in vivo*-Modellen gearbeitet werden, um die Veränderung der Paxillinexpression durch äußere Schwankungen auf ein äußerst geringes Maß zu reduzieren. Mit Hilfe der Analyse von Paxillinüberexpressionsversuchen kann die andere Seite in HBV-exprimierenden Zellen untersucht werden. Zudem ist zu klären, welche direkten oder indirekten Strategien HBV nutzt, um Einfluss auf Paxillin zu nehmen. Ein nächster denkbarer Schritt wäre die genaue Bestimmung des Einflusses von Fibronectin auf Paxillin im HBV-Lebenszyklus und die Betrachtung weiterer Proteine der *focal adhesions* bezüglich ihrer Bedeutung für die von HBV benötigte Zellstabilität und -integrität. Die hier erfolgten ersten Schritte der HBV-PXN-Grundlagenforschung sollen den Anstoß geben für die weitere gezielte Suche nach neuen Ansätzen für therapeutische Strategien im Kampf gegen die Hepatitis-B-Erkrankung.

Literaturverzeichnis

- Alisi, Anna, Mario Arciello, Stefania Petrini, Beatrice Conti, Gabriele Missale and Clara Balsano (2012), 'Focal adhesion kinase (fak) mediates the induction of pro-oncogenic and fibrogenic phenotypes in hepatitis c virus (hcv)-infected cells', *PloS one* **7**(8), e44147.
- Almog, Y., A. Klein, R. Adler, O. Laub and R. Tur-Kaspa (1992), 'Estrogen suppresses hepatitis b virus expression in male athymic mice transplanted with hbv transfected hep g-2 cells', *Antiviral research* **19**(4), 285–293.
- Aspinall, E. J., G. Hawkins, A. Fraser, S. J. Hutchinson and D. Goldberg (2011), 'Hepatitis b prevention, diagnosis, treatment and care: a review', *Occupational medicine (Oxford, England)* **61**(8), 531–540.
- Bayliss, Julianne, Tin Nguyen, Lesmana, C Rinaldi A, Scott Bowden and Peter Revill (2013), 'Advances in the molecular diagnosis of hepatitis b infection: providing insight into the next generation of disease', *Seminars in liver disease* **33**(2), 113–121.
- Beasley, R. P. (1988), 'Hepatitis b virus. the major etiology of hepatocellular carcinoma', *Cancer* **61**(10), 1942–1956.
- Beck, Juergen (2007), 'Hepatitis b virus replication', *World Journal of Gastroenterology* **13**(1), 48.
- Bellis, S. L., J. T. Miller and C. E. Turner (1995), 'Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase', *Journal of Biological Chemistry* **270**(29), 17437–17441.
- Berrier, Allison L. and Kenneth M. Yamada (2007), 'Cell-matrix adhesion', *Journal of cellular physiology* **213**(3), 565–573.
- Bialecki, Eldad S. and Di Bisceglie, Adrian M (2005), 'Diagnosis of hepatocellular carcinoma', *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* **7**(1), 26–34.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979), 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna', *Nucleic acids research* **7**(6), 1513–1523.
- Blight, Keril J., Jane A. McKeating and Charles M. Rice (2002), 'Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis c virus rna replication', *Journal of virology* **76**(24), 13001–13014.

- Blumberg, B. (1977), 'Australia antigen and the biology of hepatitis b', *Science* **197**(4298), 17–25.
- Blumberg, Baruch S. (2002), *Hepatitis B: The hunt for a killer virus*, Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Bradford, M. M. (1976), 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- Brown, M. C., J. A. Perrotta and C. E. Turner (1998), 'Serine and threonine phosphorylation of the paxillin lim domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin', *Molecular biology of the cell* **9**(7), 1803–1816.
- Brown, Michael C. and Christopher E. Turner (2004), 'Paxillin: adapting to change', *Physiological reviews* **84**(4), 1315–1339.
- Bruns, M., S. Miska, S. Chassot and H. Will (1998), 'Enhancement of hepatitis b virus infection by noninfectious subviral particles', *Journal of virology* **72**(2), 1462–1468.
- Budkowska, A., P. Bedossa, F. Groh, A. Louise and J. Pillot (1995), 'Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis b virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-s2 domain', *Journal of virology* **69**(2), 840–848.
- Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996), 'Focal adhesions, contractility, and signaling', *Annual review of cell and developmental biology* **12**, 463–518.
- Chang, J. Judy and Sharon R. Lewin (2007), 'Immunopathogenesis of hepatitis b virus infection', *Immunology and cell biology* **85**(1), 16–23.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987), 'Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction', *Analytical biochemistry* **162**(1), 156–159.
- Cornberg, M., U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer, T. Berg, W. Jilg, A. Erhardt, S. Wirth, C. Sarrazin, M. M. Dollinger, P. Schirmacher, K. Dathe, I. B. Kopp, S. Zeuzem, W. H. Gerlich and M. P. Manns (2011), 'Aktualisierung der s 3-leitlinie zur prophylaxe, diagnostik und therapie der hepatitis-b-virusinfektion', *Zeitschrift für Gastroenterologie* **49**(7), 871–930.
- Crockett, Seth D. and Emmet B. Keeffe (2005), 'Natural history and treatment of hepatitis b virus and hepatitis c virus coinfection', *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **4**, 13.
- Dane, D. S., C. H. Cameron and Moya Briggs (1970), 'Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis', *The Lancet* **295**(7649), 695–698.
- Daoudaki, Maria and Ioannis Fouzas (2014), 'Das hepatozellular karzinom', *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* .

- Deakin, Nicholas O. and Christopher E. Turner (2008), 'Paxillin comes of age', *Journal of cell science* **121**(Pt 15), 2435–2444.
- Deakin, Nicholas O., Jeanine Pignatelli and Christopher E. Turner (2012), 'Diverse roles for the paxillin family of proteins in cancer', *Genes & cancer* **3**(5-6), 362–370.
- Dienstag, J. L. (1981), 'Hepatitis b as an immune complex disease', *Seminars in liver disease* **1**(1), 45–57.
- Filippelli, Martina, Elena Lionetti, Alessia Gennaro, Angela Lanzafame, Teresa Arrigo, Carmelo Salpietro, Mario La Rosa and Salvatore Leonardi (2014), 'Hepatitis b vaccine by intradermal route in non responder patients: an update', *World journal of gastroenterology : WJG* **20**(30), 10383–10394.
- Gallant, Nathan D., Jeffrey R. Capadona, A. Bruno Frazier, David M. Collard and Andrés J. García (2002), 'Micropatterned surfaces to engineer focal adhesions for analysis of cell adhesion strengthening', *Langmuir* **18**(14), 5579–5584.
- Gerlich, Wolfram H. (2013), 'Medical virology of hepatitis b: how it began and where we are now', *Virology journal* **10**, 239.
- Gitlin, N. (1997), 'Hepatitis b: diagnosis, prevention, and treatment', *Clinical chemistry* **43**(8 Pt 2), 1500–1506.
- Gripon, Philippe, Sylvie Rumin, Stephan Urban, Jacques Le Seyec, Denise Glaise, Isabelle Cannie, Claire Guyomard, Josette Lucas, Christian Trepo and Christiane Guguen-Guillouzo (2002), 'Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis b virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(24), 15655–15660.
- Guidotti, L. G., B. Matzke, H. Schaller and F. V. Chisari (1995), 'High-level hepatitis b virus replication in transgenic mice', *Journal of virology* **69**(10), 6158–6169.
- Guidotti, L. G., T. Ishikawa, M. V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber and F. V. Chisari (1996), 'Intracellular inactivation of the hepatitis b virus by cytotoxic t lymphocytes', *Immunity* **4**(1), 25–36.
- Hagel, M., E. L. George, A. Kim, R. Tamimi, S. L. Opitz, C. E. Turner, A. Imamoto and S. M. Thomas (2002), 'The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling', *Molecular and Cellular Biology* **22**(3), 901–915.
- Heermann, K. H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten and W. H. Gerlich (1984), 'Large surface proteins of hepatitis b virus containing the pre-s sequence', *Journal of virology* **52**(2), 396–402.
- HOELLERER, M., M. NOBLE, G. LABESSE, I. CAMPBELL, J. WERNER and S. AROLD (2003), 'Molecular recognition of paxillin Id motifs by the focal adhesion targeting domain', *Structure* **11**(10), 1207–1217.

- Hwang, Mi Young (1999), '<title>prevent hepatitis b infection</title>', *JAMA* **282**(18), 1790.
- Janahi, Essam M. (2014), 'Prevalence and risk factors of hepatitis b virus infection in bahrain, 2000 through 2010', *PloS one* **9**(2), e87599.
- Jelic, S. and G. C. Sotiropoulos (2010), 'Hepatocellular carcinoma: Esmo clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **21 Suppl 5**, v59–64.
- Kane, M. (1995), 'Global programme for control of hepatitis b infection', *Vaccine* **13 Suppl 1**, S47–9.
- Kidd-Ljunggren, Karin, Yuzo Miyakawa and Alistair H. Kidd (2002), 'Genetic variability in hepatitis b viruses', *The Journal of general virology* **83**(Pt 6), 1267–1280.
- Knowles, B. B., C. C. Howe and D. P. Aden (1980), 'Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis b surface antigen', *Science (New York, N.Y.)* **209**(4455), 497–499.
- Komatsu, Haruki (2014), 'Hepatitis b virus: where do we stand and what is the next step for eradication?', *World journal of gastroenterology : WJG* **20**(27), 8998–9016.
- Krajden, Mel, Gail McNabb and Martin Petric (2005), 'The laboratory diagnosis of hepatitis b virus', *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale / AMMI Canada* **16**(2), 65–72.
- Kuehn, Bridget M. (2014), 'Task force recommends screening high-risk individuals for hepatitis b infection', *JAMA* **311**(23), 2370.
- Kwon, So Young and Chang Hong Lee (2011), 'Epidemiology and prevention of hepatitis b virus infection', *The Korean journal of hepatology* **17**(2), 87–95.
- Kyhse-Andersen, J. (1984), 'Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose', *Journal of biochemical and biophysical methods* **10**(3-4), 203–209.
- Ladner, S. K., M. J. Otto, C. S. Barker, K. Zaifert, G. H. Wang, J. T. Guo, C. Seeger and R. W. King (1997), 'Inducible expression of human hepatitis b virus (hbv) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of hbv replication', *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**(8), 1715–1720.
- Laemmli, U. K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4', *Nature* **227**(5259), 680–685.
- Legate, Kyle R., Eloi Montañez, Oliver Kudlacek and Reinhard Fässler (2006), 'Ilk, pinch and parvin: the tipp of integrin signalling', *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**(1), 20–31.
- Liang, T. Jake (2009), 'Hepatitis b: the virus and disease', *Hepatology (Baltimore, Md.)* **49**(5 Suppl), S13–21.

- Lin, Kenneth W. and Jeffrey T. Kirchner (2004), 'Hepatitis b', *American family physician* **69**(1), 75–82.
- Locarnini, Stephen (2004), 'Molecular virology of hepatitis b virus', *Seminars in liver disease* **24 Suppl 1**, 3–10.
- Lupberger, Joachim, Stephanie Schaedler, Alexander Peiran and Eberhard Hildt (2013), 'Identification and characterization of a novel bipartite nuclear localization signal in the hepatitis b virus polymerase', *World journal of gastroenterology : WJG* **19**(44), 8000–8010.
- Mekada, Kazuyuki, Kuniya Abe, Ayumi Murakami, Satoe Nakamura, Hatsumi Nakata, Kazuo Moriwaki, Yuichi Obata and Atsushi Yoshiki (2009), 'Genetic differences among c57bl/6 substrains', *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* **58**(2), 141–149.
- Melegari, M., P. P. Scaglioni and J. R. Wands (1998), 'Cloning and characterization of a novel hepatitis b virus x binding protein that inhibits viral replication', *Journal of virology* **72**(3), 1737–1743.
- Mitka, Mike (2014), 'Uspstf advises hbv screening for us groups at high risk of infection', *JAMA* **311**(10), 1004.
- Nikolopoulos, S. N. and C. E. Turner (2001), 'Integrin-linked kinase (ilK) binding to paxillin Id1 motif regulates ilK localization to focal adhesions', *The Journal of biological chemistry* **276**(26), 23499–23505.
- Nogalski, Maciej T., Gary Chan, Emily V. Stevenson, Scarlet Gray and Andrew D. Yurochko (2011), 'Human cytomegalovirus-regulated paxillin in monocytes links cellular pathogenic motility to the process of viral entry', *Journal of virology* **85**(3), 1360–1369.
- Norder, Helene, Anne-Marie Couroucé, Pierre Coursaget, José M. Echevarria, Shou-Dong Lee, Isa K. Mushahwar, Betty H. Robertson, Stephen Locarnini and Lars O. Magnius (2004), 'Genetic diversity of hepatitis b virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and hbsag subtypes', *Intervirology* **47**(6), 289–309.
- Ott, J. J., G. A. Stevens, J. Groeger and S. T. Wiersma (2012), 'Global epidemiology of hepatitis b virus infection: new estimates of age-specific hbsag seroprevalence and endemicity', *Vaccine* **30**(12), 2212–2219.
- Pourkarim, Mahmoud Reza, Samad Amini-Bavil-Olyaei, Fuat Kurbanov, Marc van Ranst and Frank Tacke (2014), 'Molecular identification of hepatitis b virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions', *World journal of gastroenterology : WJG* **20**(23), 7152–7168.
- Rehermann, Barbara and Michelina Nascimbeni (2005), 'Immunology of hepatitis b virus and hepatitis c virus infection', *Nature reviews. Immunology* **5**(3), 215–229.

- Robert-Koch-Institut (2000), 'Hepatitis-b-virus (hbv): Stellungnahmen des arbeitskreises blut', *Springer-Verlag* (43), 240–24.
- Robert-Koch-Institut (2013), 'Empfehlungen der ständigen impfkommision (stiko) am rki', *Epidemiologisches Bulletin PRINT* (Nr. 34).
- Roskoski, Robert (2004), 'Src protein-tyrosine kinase structure and regulation', *Biochemical and biophysical research communications* **324**(4), 1155–1164.
- Salgia, R., J. L. Li, D. S. Ewaniuk, Y. B. Wang, M. Sattler, W. C. Chen, W. Richards, E. Pisick, G. I. Shapiro, B. J. Rollins, L. B. Chen, J. D. Griffin and D. J. Sugarbaker (1999), 'Expression of the focal adhesion protein paxillin in lung cancer and its relation to cell motility', *Oncogene* **18**(1), 67–77.
- Samal, Jasmine, Manish Kandpal and Perumal Vivekanandan (2012), 'Molecular mechanisms underlying occult hepatitis b virus infection', *Clinical microbiology reviews* **25**(1), 142–163.
- Schädler, Stephanie and Eberhard Hildt (2009), 'Hbv life cycle: entry and morphogenesis', *Viruses* **1**(2), 185–209.
- Schaefer, Stephan (2007), 'Hepatitis b virus taxonomy and hepatitis b virus genotypes', *World journal of gastroenterology : WJG* **13**(1), 14–21.
- Schaller, M. D. (2001), 'Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein', *Oncogene* **20**(44), 6459–6472.
- Schulze, Andreas, Philippe Gripon and Stephan Urban (2007), 'Hepatitis b virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans', *Hepatology (Baltimore, Md.)* **46**(6), 1759–1768.
- Seeger, C. and W. S. Mason (2000), 'Hepatitis b virus biology', *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(1), 51–68.
- Sells, M. A., M. L. Chen and G. Acs (1987), 'Production of hepatitis b virus particles in hep g2 cells transfected with cloned hepatitis b virus dna', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(4), 1005–1009.
- Sun, Hsin-Yun, Wang-Huei Sheng, Mao-Song Tsai, Kuan-Yeh Lee, Sui-Yuan Chang and Chien-Ching Hung (2014), 'Hepatitis b virus coinfection in human immunodeficiency virus-infected patients: A review', *World journal of gastroenterology : WJG* **20**(40), 14598–14614.
- Teh, Benjamin W. and Joseph J. Sasadeusz (2014), 'Guarding the sleeping giant: hepatitis b screening and management in patients with hematological malignancy', *Leukemia & lymphoma* **55**(11), 2426–2427.
- Torpy, Janet M., Alison E. Burke and Robert M. Golub (2011), 'Jama patient page. hepatitis b', *JAMA* **305**(14), 1500.

- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979), 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(9), 4350–4354.
- Tumbarello, David A., Michael C. Brown and Christopher E. Turner (2002), 'The paxillin Id motifs', *FEBS Letters* **513**(1), 114–118.
- Turner, C. E. (1991), 'Paxillin is a major phosphotyrosine-containing protein during embryonic development', *The Journal of Cell Biology* **115**(1), 201–207.
- Turner, C. E. (2000), 'Paxillin and focal adhesion signalling', *Nature cell biology* **2**(12), E231–6.
- Turner, Christopher E. (1998), 'Molecules in focus paxillin', *The international journal of biochemistry & cell biology* **30**(9), 955–959.
- Umar, Muhammad, Hamama-Tul-Bushra, Shifa Umar and Haider Ali Khan (2013), 'Hbv perinatal transmission', *International journal of hepatology* **2013**, 875791.
- University of Reading (n.d.), 'Entnommen am 04.01.2015, 17.00 uhr'.
URL: <http://www.reading.ac.uk/cellmigration/adhesion.htm>
- Vadlamudi, R., L. Adam, B. Tseng, L. Costa and R. Kumar (1999), 'Transcriptional up-regulation of paxillin expression by heregulin in human breast cancer cells', *Cancer research* **59**(12), 2843–2846.
- Valenzuela, P. (1990), 'Hepatitis a, b, c, d and e viruses: structure of their genomes and general properties', *Gastroenterologia Japonica* **25 Suppl 2**, 62–71.
- van Herck, K., E. Leuridan and P. van Damme (2007), 'Schedules for hepatitis b vaccination of risk groups: balancing immunogenicity and compliance', *Sexually transmitted infections* **83**(6), 426–432.
- Villanueva, Augusto, Virginia Hernandez-Gea and Josep M. Llovet (2013), 'Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence', *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **10**(1), 34–42.
- Watashi, Koichi, Stephan Urban, Wenhui Li and Takaji Wakita (2014), 'Ntcp and beyond: opening the door to unveil hepatitis b virus entry', *International journal of molecular sciences* **15**(2), 2892–2905.
- Webb, Donna J., J. Thomas Parsons and Alan F. Horwitz (2002), 'Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again', *Nature cell biology* **4**(4), E97–100.
- Webb, Donna J., Melanie J. Schroeder, Cynthia J. Brame, Leanna Whitmore, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt and A. Rick Horwitz (2005), 'Paxillin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry', *Journal of cell science* **118**(Pt 21), 4925–4929.
- WHO (2009), *The Weekly Epidemiological Record* (No. 40), 405–420.

- WHO, Publication (2010), 'Hepatitis b vaccines: Who position paper–recommendations', *Vaccine* **28**(3), 589–590.
- Widmaier, Moritz, Emanuel Rognoni, Korana Radovanac, S. Babak Azimifar and Reinhard Fässler (2012), 'Integrin-linked kinase at a glance', *Journal of cell science* **125**(Pt 8), 1839–1843.
- World Hepatitis Day (2014), 'Entnommen am 16.10.2014, 13.00 uhr'.
URL: <http://worldhepatitisday.org/en>
- Xiao, Li-Jun, En-Hong Zhao, Shuang Zhao, Xin Zheng, Hua-Chuan Zheng, Yasuo Takano and Hong-Ru Song (2014), 'Paxillin expression is closely linked to the pathogenesis, progression and prognosis of gastric carcinomas', *Oncology letters* **7**(1), 189–194.
- Yeo, Winnie, Pei-Jer Chen, Junji Furuse, Kwang-Hyub Han, Chiun Hsu, Ho-Yeong Lim, Hanlim Moon, Shukui Qin, Ee-Min Yeoh and Sheng-Long Ye (2010), 'Eastern asian expert panel opinion: designing clinical trials of molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma', *BMC cancer* **10**, 620.
- Zuckerman, J. N. (1996), 'Nonresponse to hepatitis b vaccines and the kinetics of anti-hbs production', *Journal of medical virology* **50**(4), 283–288.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Sutter übernahm freundlicherweise meine Betreuung an der LMU München und hatte jederzeit ein offenes Ohr für mein Anliegen. Durch die Präsentation der Ergebnisse in seiner Abteilung konnte ich wichtige Anregungen und Hinweise bekommen und so meine Arbeit weiter voranbringen. Ich danke sehr für die Unterstützung einer tiermedizinischen Doktorarbeit auf humanmedizinischem Gebiet.

Prof. Dr. Hildt gab mir die großartige Möglichkeit, ein Teil seines Teams zu werden und begleitete mich durch die Zeit der Doktorarbeit. Durch seine hervorragende wissenschaftliche Hilfestellung gelang es mir, mich in einen neuen Themenkomplex einzuarbeiten. Die ständige Diskussionen der Daten ermöglichte eine zielgerichtete und erfolgreiche Arbeit.

Dagmar und Jasminka danke ich für die tolle Unterstützung! Ohne euch wären wir doch alle verloren ☺. Ihr seid immer da, wenn's brennt und helft, wo ihr nur könnt. Einen großen Dank an Dagmar für das Korrekturlesen der Arbeit.

Klaus habe ich jederzeit um Rat und Tat fragen können, wenn es um das LSM ging. Durch seine große Hilfsbereitschaft und die fantastische Art, Technik zu erklären, gelang es mir, die IF-Aufnahmen für meine Arbeit anzufertigen.

Kiyoshi war vom ersten Moment an ein super Betreuer ☺!! Ich wüsste nicht, was ich ohne seine immer geduldige, hilfsbereite und kompetente Art gemacht hätte. Er half mir nicht nur über die ersten Verluste meiner Versuchszellen, sondern auch bei allen nur erdenklichen Aufgaben im täglichen Laborgeschehen. Zum Glück kam der Spaß nie zu kurz und ich werde die Zusammenarbeit mit dir vermissen.

Das Laborteam war in all der Zeit immer an meiner Seite und ich danke euch sehr, dass ich ein Teil des Teams werden konnte! Es braucht nicht mehr Worte, ihr wisst, was ich sagen will. Es wird mir fehlen, euch nicht mehr jeden Tag zu sehen. Deshalb herzlichen Dank an Gert, Andrea, Bingfu, Mei, Ramon, Regina, Wiebke, Matthias, Tanjo, Sami, Meli, Stef, Dani, Fabi, Christian und natürlich Meike! Euer Buch werde ich in Ehren halten.

Martina und Malin möchte ich von ganzem Herzen danken, dass sie mich durchs Leben begleiten. Es ist unglaublich toll, solche Freunde zu haben, die immer da sind, egal wo man gerade auf der Welt ist! Durch euch habe ich immer wieder Kraft geschöpft, um die nächsten Aufgaben bewältigen zu können. Die Auszeit in den Bergen war großartig.

Meiner Familie möchte ich diese Arbeit widmen, denn ihr seid wundervoll!!! Vielen Dank für alles, durch euch konnte ich diesen Weg gehen und ihr stärkt mir jederzeit den Rücken.

Matze hat wohl die schwerste Aufgabe übernommen, als er mir während der gesamten Zeit der Arbeit bedingungslos das Seil zum Klettern hielt ☺. Ich danke dir von Herzen für dein Verständnis, die Geduld und die Motivation. Ich bin froh, dass es durch dich auch immer jede Menge Abwechslung gab und ich trotz des anstrengenden Weges all die schönen Dinge mit dir erleben durfte!