

Iekšējās delēcijas saturošu hepatīta B vīrusa kora proteīna variantu raksturojums

Autors: Sabīne Brauna

Darba vadītājs: Dr.habil.Biol Tatjana Kozlovska

Konsultants: Prof., Dr.habil. Biol. Paul Pumpens

Recenzenti: Prof., Dr.Biol., MD Viesturs Baumanis

Prof., Dr.habil.Biol. Kestutis Sasnauskas

Dr. Med. Valentina Sondore



Publikāciju kopa

**Bioloģijas fakultāte
Latvijas Universitāte
Rīga, 2008**

Promocijas darbs pamatojas uz šādām publikācijām:

I) Bruvere R., Braun S., Zajakina A., Alekseeva E., Sharipo A., Meisel H., Pumpens P., Kozlovskā T. 2004. Subcellular localisation of internally deleted HBV core proteins. *Acta Universitatis Latviensis*. 676:53-64.

II) Braun S., Zajakina A., Aleksejeva J., Sharipo A., Bruvere R., Ose V., Pumpens P., Garoff H., Meisel H., Kozlovskā T. 2007. Proteasomal degradation of core protein variants from chronic hepatitis B patients. *J Med Virol*. 79(9):1312-21.

III) Sabine Braun, Ruta Bruvere, Anna Zajakina, Ekaterina Alekseeva, Tatyana Kozlovskā. Intracellular localisation of Hepatitis B virus core protein expressed from two different constructs in the Semliki Forest virus expression system. (Pieņemts publicēšanai žurnālā „Acta Universitatis Latviensis”)

Konferenču tēzes

Sabine Braun, Anna Zajakina, Tatyana Kozlovskā, Detlev H. Krüger, Anne-Sophie Endres, Paul Pumpens, Helga Meisel. Expression of Hepatitis B Core Deletion Variants In a Semliki Forest Virus Derived Expression System. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie. Erlangen, April 8th to 10th 2002.

Sabine Braun, Anna Zajakina, Tatyana Kozlovskā, Anatoly Sharipo, Paul Pumpens, Helga Meisel. Truncated Hepatitis B virus core proteins are rapidly destroyed by the ubiquitin-proteasome degradation system. 2003 Meeting on the molecular biology of Hepatitis B viruses. Bergamo, Italy, September 7th to 10th 2003.

Doktora darbs “ Iekšējās delēcijas saturošu hepatīta B vīrusa kora proteīna variantu raksturojums” tika sagatavots Proteīnu inženierijas laboratorijā, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Rīgā, Latvijā.

Doktora darbs tika pieņemts Dr.biol. grāda aizstāvēšanai molekulārajā bioloģijā Latvijas Universitātes Bioloģijas zinātņu Promocijas padomes atklātā sēdē

2008. gada pl.....

Promocijas padomes priekšsēdētājs: Prof., Dr.biol., MD Viesturs Baumanis

Darbs ir pieejams Latvijas Universitātes bibliotēkā O.Kalpaka bulv.4

Satura rādītājs

Kopsavilkums	5
Literatūras apskats	7
HBV patoģenēze	7
HBV kora proteīns (HBc)	10
HBc kora proteīna varianti	11
SFV ekspresijas sistēma	12
Pētījuma aktualitāte un mērķi	14
Īss metožu apraksts	16
Kora gēni un plazmīdu konstrukcijas	16
RNS transkripcija, transfekcija un inficēšana	18
Intracelulārās RNS analīzes	18
DNS izolēšana	18
<i>Southern</i> blots	18
<i>In vitro</i> translācija	19
Inficēto šūnu metaboliskā iezīmēšana	19
Šūnu lizēšana un HBc produktu analīze	19
<i>Western</i> blots	19
Proteīnu degradācijas inhibitori	20
<i>Pulse-chase</i> eksperiments	20
Elektromikroskopija	20
Iekšūnas HBc variantu imunocitoķīmiskā noteikšana	20
Rezultāti un diskusija	21
Iekšējās delēcijas saturošu HBc gēna variantu eikariotiskā ekspresija	21
Sintēzes ceļš: iekšējās delēcijas saturošu HBc gēnu mRNS analīze un <i>in vitro</i> translācija	24
Degradācijas ceļi	26
Iekšējās delēcijas saturošu un dabīgā tipa HBc proteīnu subcellulārā lokalizācija	29
Secinājumi	36
Atsauces	38
Saīsinājumi	49
Pateicības	50

Kopsavilkums

Hroniskie HBV nesēji bieži vien satur hepatīta B vīrusa (HBV) variantus ar iekšējām delēcijām kora gēnā (CID). Šādi mutanti arī tika izdalīti no imunosupresētiem nieru transplantācijas pacientiem, kur delēcijas saturošu kora gēnu papildus mutācijām kora promotora/enhānsa rajonā un preS rajonā uzkrāšanās ir būtiski saistīta ar aknu saslimšanas nonākšanu galējā fāzē. Tā kā šajā pacientu grupā saimnieka imūnās atbildes pazemināšana, domājams, dod lielāko ieguldījumu HBV patoģenēzē, tika aplūkoti alternatīvie patoģenie mehānismi, piemēram, tiešā citotoksicitāte.

Šajā pētījumā raksturotas proteīnu īpašības vairākiem HBV kora gēna variantiem ar delēcijām kora gēna centrālajā daļā. Šo delēciju garums mainījās no astoņām līdz trīsdesmit aminoskābēm. Eksperimentālajā modelī šie CID gēni tika ekspresēti eikariotiskajā sistēmā, kas izmantoja Semliki Forest vīrusa (SFV) replikonu.

Tā kā CID proteīnu uzkrāšanās tika uzskatīta par patoģenēzes posmu, pirmais jautājums saistījās ar iekšējās delēcijas saturošu HBV kora gēnu ekspresijas līmeni salīdzinājumā ar dabīgā tipa HBV kora gēnu. Lai atbildētu uz šo jautājumu, proteīnu sintēze tika pētīta divās atšķirīgās šūnu līnijās: (i) SFV sistēmai pielāgotās BHK šūnās un (ii) HBV specifiskās Huh šūnās. Tika noskaidrots, ka CID gēnu ekspresijas līmenis bija būtiski zemāks par dabīgā tipa HBV kora proteīna sintēzes līmeni. Tika aplūkoti iespējamie proteīnu sintēzes samazināšanas un proteīnu degradācijas pastiprināšanās iemesli. Tika parādīts, ka CID gēnu transkripcijas un translācijas procesi netika ietekmēti. Proteīnu degradācijas ceļu analīze tomēr parādīja, ka proteasomālās degradācijas ceļa inhibīcija būtiski paaugstināja CID proteīna intracelulāro līmeni.

Iepriekš parādītās atšķirības HBV kora proteīna intracelulārajā lokalizācijā ir saistītas ar patoģeno stāvokli. Tādēļ mutanto un dabīgā tipa HBV kora proteīnu subcellulāro sadalījumu pētīja ar imunokrāsošanas palīdzību. Mutanto variantu un dabīgā tipa HBc proteīnus atrada citoplazmā, bet pārsteidzošas atšķirības parādījās ar HBc proteīna lokalizāciju saimniekšūnas kodolā. Nelielu daudzumu HBc proteīna atrada to šūnu kodolos, kuras ekspresēja CID gēnus, turpretim dabīgā tipa HBc proteīnu atrada tikai citoplazmā. Svarīgi, ka HBV pregenoma ekspresija parādīja HBc proteīna atrašanos kodolā un citoplazmā, iespējams, vienlaicīgi ar replikācijas cikla iniciāciju.

Tādejādi, ir parādīts, ka CID proteīni neuzkrājas eikariotiskajās šūnās, bet tiek ātri degradēti pa proteasomālo degradācijas ceļu. Iekšējās delēcijas saturošu HBV kora

proteīnu jutība pret proteasomālo degradācijas ceļu, kā arī atšķirīgais intracellulārā sadalījuma spektrs var ietekmēt šās pacientu grupas patoģenēzi.

Literatūras apskats

HBV patoģenēze

Hepatīta B vīruss (apskats: Seeger *et al.*, 2000) pieder pie *Hepadnaviridae* dzimtas un ir daļēji divpavedienu DNS vīruss, kas replicējas ar apgrieztās transkripcijas palīdzību (Will *et al.*, 1987). Vīrusa mazais, 3,2 kb garais, genoms satur četras daļēji pārklājošās atvērtās translācijas fāzes (ORF), kas kodē virālo polimerāzi, X proteīnu, trīs dažāda garuma apvalka proteīnus un divus C gēna produktus: kora proteīnu un sekretējamo HBeAg, kam ir saīsinātas C-gala un N-gala sekvences. Daļēji dubultspiralizēto DNS saturošas kapsīdas pie kodola membrānas atbrīvo genomu, lai tas iekļūtu kodolā, kur atbrīvotā cirkulārā DNS tiek pārvērsta kovalenti noslēgtā cirkulārā DNS (cccDNS). CccDNS kalpo par matricu virālās RNS (subgenomiskās RNS un pregenomiskās RNS) transkripcijai, kas tiek iepakotas un apgriezeniski transkribētas.

Neskatoties uz efektīvas vakcīnas pieejamību kopš 1982. gada, inficēšanās ar hepatīta B vīrusu joprojām ir ļoti svarīga problēma. Vairums pacientu kļūst akūti inficēti un, galu galā, pārvar vīrusu; tomēr, no 1% (attīstītās valstīs) līdz 10% (jaunattīstības valstīs) kļūst hroniski inficēti un, galu galā, ir pakļauti augstam progresējošās aknu cirozes vai hepatocelulārās karcinomas riskam (Vispasaules Veselības Organizācijas dati) Tāpēc patoģenēzes mehānisma noskaidrošana ir ļoti svarīga.

Dažās publikācijās ir norādne par HBV proteīnu tiešo citotoksicitāti (Roingeard *et al.*, 1990) vai citotoksicitāti, kuru izraisa virālā kovalenti noslēgtā cirkulārā DNS, kura satur mutāciju preS proteīnā, kā tas parādīts pīļu HBV gadījumā (Lenhoff *et al.*, 1999). Tāpat, saistībā ar nopietnu imūno supresiju tiek ierosināta ideja par HBV tiešu citopātisku efektu, kas neierobežotās proteīnu ekspresijas dēļ noved pie virālo proteīnu uzkrāšanās, šūnu bojājumiem un, galu galā, pie šūnas nāves (Meuleman *et al.*, 2006). Parasti tomēr tiek pieņemts, ka saimnieka imūnā atbilde ir HBV patoģenēzes kritiskais elements (apskatu skatīt Chisari *et al.*, 1995). Tās loma ir duāla: no vienas puses tiek uzskatīts, ka tā ir galvenais faktors organisma atbrīvošanās procesā no vīrusa, no otras puses tā ir arī iesaistīta šūnas sabojāšanas procesā (Bertoletti *et al.*, 2000). Pēdējos gados lielāka uzmanība ir pievērsta

mehānismiem, kas inficētajai šūnai pieļauj iespēju kontrolēt virālo infekciju ar necitolītisko mehānismu palīdzību (apskatu skatīt Guidotti *et al.*, 2001).

Humorālā imūnā atbilde, kas rodas lielākoties pret apvalka proteīniem, dod savu ieguldījumu atbrīvošanās procesā no vīrusa, aizvadot brīvās vīrusa daļiņas no asins plūsmas, un pacientiem, kas veiksmīgi atbrīvojušies no vīrusa, tiek atrasta paaugstināta MHC II klases specifiskā T šūnu atbilde, kas tiek veidotas galvenokārt pret HBc un HBeAg daudzajiem epitopiem. Tomēr galveno ieguldījumu saimnieka imūnajā aizsardzībā dod šūnas imūnā atbilde ar MHC I klases specifiskajiem citotoksiskajiem T limfocītiem (CTL), kas ir atbildīgi par infekcijas iznīcināšanu, kā arī par aknu slimības attīstību (Chisari, 1997). CTL efektīvi darbojas ar divu atšķirīgu mehānismu palīdzību – hepatocītu lizēšanu apoptozes rezultātā ((Bertoletti *et al.*, 1991; Ando *et al.*, 1994) un atbrīvošanās no vīrusa necitopātiskā veidā (Guidotti *et al.*, 1994a; Guidotti, 2002). Kamēr HLA I klases atbilde ir izteikta pacientiem ar akūtu neārstētu hepatītu, pacientiem ar hronisku hepatītu tā ir vāja (Penna *et al.*, 1991). HLA I klases atbilde ir poliklonāla un vērsta tieši pret daudzajiem, lielākoties, polimerāzes un apvalka proteīna epitopiem; HBV kora proteīnā tika identificēti trīs šādi epitopi: HLA-A-2 CTL epitops 18-27 (Bertoletti *et al.*, 1991, Bertoletti *et al.*, 1993, Bertoletti *et al.*, 1997), HLA-Aw-68 CTL epitops 141-151 (Missale *et al.*, 1993) un HLA-A-11 CTL epitops 88-96 (Tsai *et al.*, 1996). Ir parādīts, ka epitopu 141-151 šķeļ imunoproteasomas (Sijts *et al.*, 2000).

Ar transgēno peļu palīdzību tika izveidots fulminantā hepatīta modelis (Ando *et al.*, 1993), kuru var uzskatīt par I klases specifiskās CTL inducētās imunopatoloģijas modeli. Šajā modelī HBsAg specifiskie CTL izsauc akūtu nekroinflatōro aknu saslimšanu, kas norit trijos atšķirīgos histopatoloģiskos posmos. Pirmajā posmā CTL piesaistās pie hepatocītiem, kas parāda apoptozes citoloģiskās īpašības, kas izpaužas kā acidofīlie Kouncilmana ķermenīši – apoptiskie hepatocīti, kas ir raksturīgi akūtajam hepatītam. Hepatocītu līze apoptozes rezultātā notiek ar Fas vadīta mehānisma palīdzību (Kondo *et al.*, 1997). Nākošajā posmā veidojas nekroinflatōrie perēkļi. CTL līdzīgi neitrofīliem, limfocītiem un makrofāģiem aptver iekaisušās šūnas. Parasti aknu saslimšana neprogresē tālāk par šo posmu, kas raksturo pārejošu saslimšanu. Trešajā, IFN- γ atkarīgajā posmā, kuru raksturo smaga nekroze, CTL skaitā vismaz 100 kārtīgi pārspēj saimniekorganisma radītās iekaisuma šūnas, lielākoties makrofāģi. Tiek uzskatīts, ka nevīrusu specifisko T-šūnu lielie infiltrāti dod savu ieguldījumu hepatocītu bojājumu radīšanā (Maini *et al.*, 2000).

Tiek uzskatīts, ka tiešais CTL citopātiskais efekts tiek ierobežots tikai ar dažiem hepatocītiem. Citoplazmatiskie nukleokapsīdi un tajos esošie replikatīvie starpprodukti var izdzīvot CTL inducētajā hepatocītu apoptozē (Paschetto *et al.*, 2000). Tādejādi, organisma atbrīvošanai no vīrusa nepieciešami citi mehānismi, piemēram, infekcijas necitolītiskā kontrole ar citokīnu, lielākoties IFN- γ un TNF- α , sekrēciju (apskatu skatīt Guidotti *et al.*, 2001; McClary *et al.*, 2000).

Ir identificēti divi funkcionāli neatkarīgi virocīdie ceļi: agrīnais ceļš, kas no hepatocītiem eliminē HBV nukleokapsīda daļiņas un tajās esošās vīrusa genoma replicējošās formas (Wieland *et al.*, 2000), un vēlīnais ceļš, kas post-transkripcionāli pazemina virālās RNS līmeni (Tsui *et al.*, 1995).

Agrīnajā ceļā, kuru stimulē IFN- α / β , no hepatocīta citoplazmas tiek izdalītas pregenomisko RNS saturošas kapsīdas, kā arī vienpavediena DNS saturošas kapsīdas.

Vēlīnajā ceļā kodolā un citoplazmā tiek pamatīgi samazinātas 3,5 un 2,1 kb virālās RNS, tai pat laikā transkripcijas ātrums netiek ietekmēts vai arī tikai nedaudz samazinās (Tsui *et al.*, 1995). Citokīnu inducētā atbrīvošanās no virālās RNS ir saistīta ar RNS saistošā proteīna sašķelšanu (Heise *et al.*, 1999a, Heise *et al.*, 1999b). Tā rezultātā RN-āžu šķelšanas vietas uz RNS molekulas kļūst vieglāk pieejamas (Heise *et al.*, 2001).

IFN stimulētai HBV replikācijas inhibīcijai nepieciešama Jānusa kināzes un STAT transkripcijas faktoru aktivitāte (Robek *et al.*, 2003). HBV replikācijas inhibīcijas apstākļos ar IFN- α / β un IFN- γ palīdzību tiek inducēta virkne gēnu (Wieland *et al.*, 2003). IFN inducētie antivirālie efekti ir atkarīgi no proteasomas aktivitātes (Robek *et al.*, 2002). Proteasomālās subvienības LMP2 un LMP7 tieši neietekmē vīrusa replikācijas inhibīciju, bet iedarbojas caur HBV-specifisko CD8 T šūnu atbildi (Robek *et al.*, 2007).

Līdz šim brīdim nav pilnībā izprasts par hepatocelulārās karcinomas attīstību hroniskās HBV infekcijas laikā atbildīgais patogēnais mehānisms. Domājams, ka HBV specifiskais hroniskais imūnās sistēmas inducētais aknu šūnu bojājums ir pietiekams, lai uzsāktu un turpinātu hepatokarcinogēzes procesu (Nakamoto *et al.*, 1998).

HBV kora proteīns (HBc)

Dabīgo 21 kDa HBV kora proteīnu (HBc-wt) kodē HBV kora gēns, un tas tiek translēts no pregenomiskās RNS (Cattaneo *et al.*, 1984).

HBc proteīns ir vīrusa nukleoproteīna kapsīdu strukturālais materiāls. HBV daļiņas sastāv no ar apvalku pārklātas kapsīdas, kura satur 3,2 kb daļēji divpavediena DNS genomu un virālo polimerāzi. Kapsīdu veido 180 vai 240 HBc subvienības, kuras ir organizētas T=3 vai T=4 ikosaedros, atbilstoši. T=4 izkārtojums ir nobriedušas DNS saturošas kora struktūras, kas atšķiras no RNS saturošām kora struktūrām ar hidrofobo ieloci cilpā (Roseman *et al.*, 2005).

HBc proteīns ir salocīts 2 antiparalēli orientētās α spirālēs, kuras asociē līdz dimēriem, kas izvirzās laukā no kapsīdas virsmas. Galvenais imunodominantais rajons (MIR) atrodas α spirāļu galos, kas veido cilpas uz kapsīdas virsmas (Wynne *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 1998).

Atkarībā no genotipa HBc proteīns ir 185 vai 183 aminoskābju garš. Tas sastāv amino-termināla pašsavākties spējīga domēna (aminoskābes 1. līdz 150., Birnbaum *et al.*, 1990) un karboksi-termināla protamīnam līdzīga ar arginīnu bagāta domēna. Pēdējais satur nukleārās lokalizācijas signālu (Eckhardt *et al.*, 1991) un ir iesaistīts RNS iekapsidēšanā, fosforilēšanā un nukleārajā lokalizācijā (apskatu skatīt Pumpens *et al.*, 1999). Trīs serīna atlikumi karboksi-terminālajā domēnā, kas pārklāj nukleārās lokalizācijas signālu, var būt fosforilēti un var ietekmēt HBV replikācijas regulāciju (Melegari *et al.*, 2005) un nukleāro lokalizāciju (Liao *et al.*, 1995).

Hroniskiem HBV nesējiem HBc proteīns ir atklāts gan kodolā, gan citoplazmā (Mondelli *et al.*, 1986). Tika atklāts, ka atrašanās kodolā korelē ar vieglu hepatīta formu, kamēr citoplazmatiskā lokalizācija ir saistīta ar hronisku aktīvu hepatītu (Hsu *et al.*, 1987, Chu *et al.*, 1987).

HBc proteīna subcelulāro atrašanos regulē nukleārās lokalizācijas signāla serīna atlikumu fosforilēšana (Liao *et al.*, 1995), un tā ir atkarīga no šūnas cikla, nukleārajai lokalizācijai pieaugot G1 fāzes laikā (Yeh *et al.*, 1993). Citoplazmatiskais HBc proteīns ir fosforilēts, kamēr nukleārais HBc proteīns ir nefosforilēts. Fosforilētais HBc proteīns piesaistās pie kodola poru kompleksa (Kann *et al.*, 1999), lai pie kodola membrānas atbrīvotu genomu; tā nokļūšanu iekšpusē regulē virālā polimerāze, bet iekļūšanas process ir neatkarīgs no HBc proteīna (Kann *et al.*, 1997).

HBc kora proteīna varianti

Var izšķirt divu tipu HBc variantus: HBc proteīni ar punktveida mutācijām un proteīni ar delēcijām vai insercijām (apskatu skatīt Günther *et al.*, 1999). Punktveida mutācijas rada HBV polimerāze, kas, iespējams, apgriezeniskās transkripcijas laikā zaudē precīzās nolasīšanas spēju. Polimorfismu novēro HBc daļās, kuras veido ārējo virsmu, un dabīgās kapsīdas uz ārpusi vērstajās cilpās (Chain *et al.*, 2005).

Delēcijas un insercijas rodas dažādu mehānismu rezultātā, kuri ietver matrices pārslēgšanos apgriezeniskās transkripcijas laikā, pregenomiskās RNS splaisingu (Günther *et al.*, 1997), HBV DNS topoizomerāzes I šķelšanu/ligēšanu (Wang *et al.*, 1991) un lineārās HBV DNS nehomologo rekombināciju replikācijas laikā (Yang *et al.*, 1995).

Hepatīta B vīrusa (HBV) varianti ar delēcijām kora gēnā bieži tiek atklāti pacientiem ar hronisku hepatītu un parasti tiek saistīti ar būtisku nekroinflatōro aktivitāti aknās (Marinos *et al.*, 1996). Šīs delēcijas lielākoties nemaina nolasīšanas fāzi un atrodas kora gēna centrālajā daļā. Varianti ar kora gēna iekšējām delēcijām (CID) vienmēr tiek atrastas kopā ar dabīgā tipa HBV celmiem, kuri satur pilna garuma kora gēnu (Marinos *et al.*, 1996). Šie varianti bieži vien ir replikācijas defektīvi, jo nesatur stabilu kora proteīnu, bet replikācijas spēju kompensē dabīgā tipa kora proteīns (wt) (Yuan *et al.*, 1998a, Okamoto *et al.*, 1993). CID varianti uzvedas līdzīgi defektīvām interferējošām daļiņām un tiek raksturoti pēc to spējas sasniegt relatīvu bagātināšanos, kad tiek ko-transficēti kopā ar dabīgā tipa HBc gēna variantiem (Yuan *et al.*, 1998b).

HBc variantu parādīšanos izskaidro kā imunoloģisko izvairīšanos, jo HBc mutācijas uzkrājas T šūnu epitopos (Hosono *et al.*, 1995).

Atbilstoši iepriekš minētajam, HBc gēna delēciju varianti izzūd pēc serokonversijas no HBeAg uz anti-HBe (Marinos *et al.*, 1996). CID varianti tika izolēti no nieru transplantāciju pārcietušiem pacientiem, kuriem, atšķirībā no situācijas ar imunokompetentiem hroniskiem nesējiem (apskatu skatīt Gunther *et al.*, 1999), tika novērots nopietns slimības saasinājums, kas noved pie aknu saslimšanas galējā fāzē (Gunther *et al.*, 1996, skatīt tālāk "Pētījuma aktualitāte un mērķi").

SFV ekspresijas sistēma

Kā eukariotiskā ekspresijas sistēma tika izvēlēta Semliki Forest vīrusa (SFV) ekspresijas sistēma (Liljeström *et al.*, 1991a, Liljeström *et al.*, 1991c), kas dod iespēju plašā dzīvnieku šūnu spektrā augstā līmenī sintezēt funkcionāli aktīvus rekombinantus proteīnus. SFV un Sindbis vīrusi ir alfavīrusi, apvalku saturoši vīrusi ar pozitīvās polaritātes vienpavediena RNS genomu (Frolov *et al.*, 1996). Tā 11442 nukleotīdu garā RNS var tieši kalpot kā mRNS četrus nestrukturālo gēnu (nsP1 līdz nsP4) translēšanai, veidojot RNS replikāzi, kura sintezē pilna garuma mīnuspavedienu (apskatu skatīt Strauss *et al.*, 1986). Tas kalpo par transkripcijas matricu pilna garuma (+)-pavediena genomiskajai RNS un īsākai (+)-pavediena subgenomiskajai RNS, kura kodē strukturālos gēnus. Strukturālie proteīni tiek sintezēti kā poliproteīns, kuru pēc tam secīgi sašķeļ kapsīdas un apvalka proteīnos E1 un p62, kas ir E3 un E2 prekursors (Liljeström *et al.*, 1991b).

Ekspresijas vektora konstruēšanai SFV cDNS modificē tādā veidā, lai strukturālie gēni tiktu deletēti un tos būtu iespējams aizvietot ar interesējošo gēnu (Liljeström *et al.*, 1991a). Pirms cDNS genoma varianta esošais SP6 promotors tiek transkribēts *in vitro* apstākļos, un rekombinantā RNS pēc tam tiek transficēta audu kultūru šūnās. Alternatīvi ir izstrādāta iepakšanas sistēma, kurā rekombinantā RNS un defektīvā „helpera” RNS, kas nodrošina strukturālo gēnu sintēzi, tiek kopīgi ar elektroporācijas palīdzību transficēta audu kultūras šūnās. Rezultātā rekombinantā RNS tiek iepakota infekciozās vīrusu daļiņās, kas tiek izmantotas audu kultūru inficēšanai (Berglund *et al.*, 1993, Smerdou *et al.*, 1999). Svešo gēnu ekspresija palielinās vektoros, kuros vīrusa kapsīdas gēna pirmās 102 bāzes ir saglabātas, jo tās kalpo par translācijas enhānsēru (Sjoberg *et al.*, 1994).

SFV ekspresijas sistēmas priekšrocības aptver plašo saimniekšūnu klāstu, augsto proteīnu ekspresijas līmeni un vieglo pielietojamību. Augstā līmeņa gēnu ekspresija ir savienota ar saimniekšūnas gēnu ekspresijas izslēgšanu un translācijas mehānisma pārslēgšanos uz virālo mRNS, kam seko šūnu bojāeja 12-24 stundu laikā pēc inficēšanas. Galvenais šķērslis daudzajiem praktiskajiem izmantošanas gadījumiem ir vektora citotoksicitāte ar p53 neatkarīgo apoptozi (Glasgow *et al.*, 1998), kuru izsauc nestrukturālais rajons. Nesen aprakstīti mazāk citotoksiski vektori, kas radīti, nestrukturālajā gēnā nsP2 ievadot mutācijas (Garoff *et al.*, 1998; Lundstrom *et al.*,

2001). Šie necitopātiskie vektori ir izmantojami, lai radītu kultivējamo šūnu pastāvīgu inficēšanu (Perri *et al.*, 2000).

SFV vektori (Liljestrom, 1994) ir tikuši izmantoti rekombinanto proteīnu ekspresijai, arī HBV strukturālo proteīnu ekspresijai (Zajakina *et al.*, 2004). Šie vektori arī ir domāti vakcīnām (Riezebos-Brilman *et al.*, 2006) un gēnu terapijai (Wahlfors *et al.*, 2000; Lundstrom, 2005)

Pētījuma aktualitāte un mērķi

Imunosupresētos nieru transplantācijas pacientos uzkrājas iekšējās delēcijas saturoši HBc gēni saistībā ar genomiem, kas bieži ir modificēti ar papildus mutācijām pre-S1/2 rajonā, X gēnā un kora gēna promotora rajonā (Preikschat *et al.*, 1999a; Preikschat *et al.*, 2002). To uzkrāšanās ir saistīta ar aknu saslimšanas galējās fāzes (ESLD) attīstību. Atšķirīga situācija ir imunokompetentos hroniskos HBV nesējos, kur CID variantu parādīšanās parasti ir saistīta ar slimības labvēlīgu iznākumu (Marinos *et al.*, 1996). Izmainītie vīrusa celmi nav spējīgi autonomi replicēties, bet uzrāda pastiprinātu replikāciju, kad tiek trans-komplementēti ar dabīgā tipa vīrusu (Günther *et al.*, 2000); šim fenomenam var sekot pastiprināta vīrusa proteīnu sintēze. Tā kā CID varianti tika izolēti no imunosupresētiem pacientiem, tika izvirzīta hipotēze par no imūnās sistēmas neatkarīgu tiešās citotoksicitātes patogēnais mehānismu, kas nodrošina mutanto proteīnu uzkrāšanos hepatocītos (Günther *et al.*, 1995; Günther *et al.*, 1996; Marinos *et al.*, 1996).

Iepriekšējā pētījumā bakteriālā ekspresijas sistēmā tika raksturots šāds dabīgi radies mutantu kopums – tika pētīta mutanto HBc proteīnu ekspresija, savākšanās spēja un antigēnās īpašības (Preikschat *et al.*, 1999b). Tikai dažos gadījumos – ar īsām delēcijām – tika novērota efektīva HBc proteīna sintēze. Dažos gadījumos HBc proteīna varianti tika stabilizēti mozaīkveida kora daļiņās, kuras tika izveidotas no mutantā un dabīgā HBc proteīna (Preikschat *et al.*, 2000). Vispār, HBc proteīni ar garākām delēcijām *E.coli* ekspresijas sistēmā uzrādīja zemāku sintēzes līmeni un nespēju savākties kapsīdās. Šie rezultāti diez vai var izskaidrot iespējamo iekšējās delēcijas saturošo HBc proteīnu citotoksisko raksturu. Tika pieņemts, ka zemais HBc proteīna variantu ekspresijas līmenis radās, pateicoties ātrajai ko-translacionālajai proteīnu degradācijai specifisko eikariotisko stabilizācijas faktoru (šaperonīnu) trūkuma dēļ (Lingappa *et al.*, 1994).

Šajā darbā tiek raksturotas ar Semliki Forest vīrusa ekspresijas sistēmas palīdzību translēto nieru transplantācijas pacientu iekšējās delēcijas saturošu HBc gēnu proteīnu īpašības.

Tika nosprausti šādi mērķi:

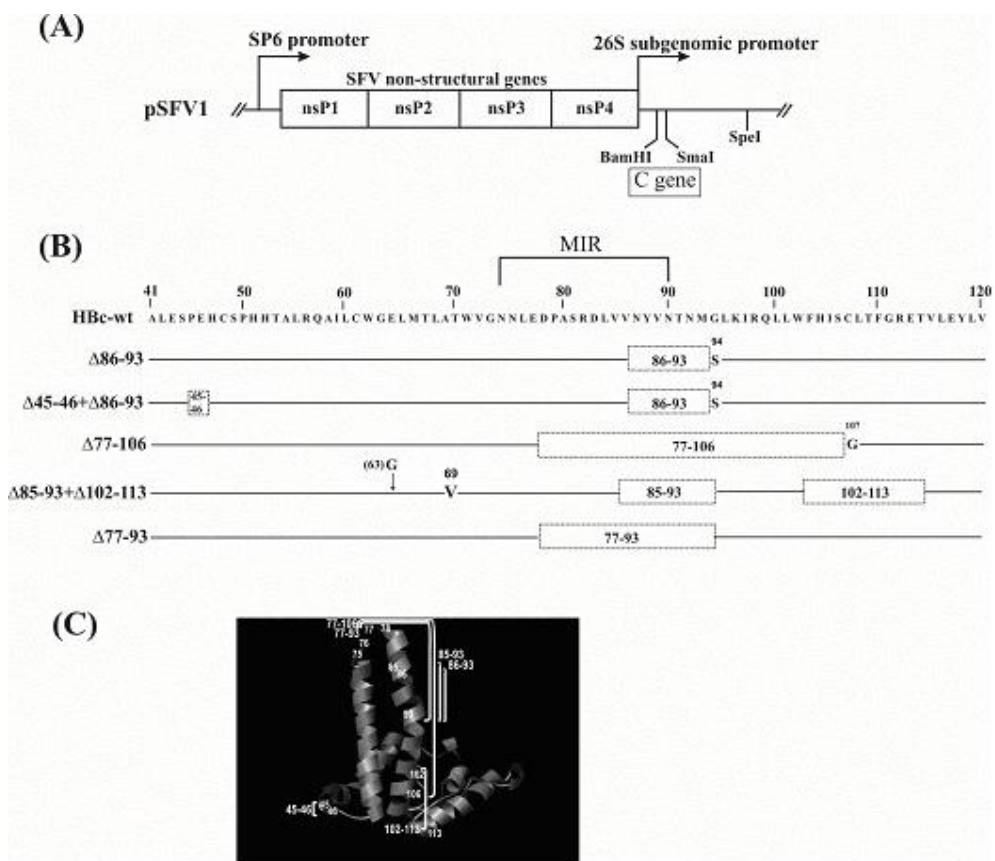
- noskaidrot SFV ekspresijas sistēmas pielietojamību HBc delēciju variantu analīzei;
- SFV ekspresijas sistēmā salīdzināt HBc proteīna variantu un natīvā HBc proteīna (HBc-wt) sintēzi;
- noskaidrot HBc proteīna variantu stabilitāti un sintēzes un degradācijas ceļus;
- noteikt HBc proteīna variantu un natīvā HBc proteīna subcelulāro lokalizāciju.

Īss metožu apraksts

Metodes detalizēti ir aprakstītas publikācijās I un II.

Vispārējās DNS metodes. Eksperimenti ar DNS tika veikti, izmantojot standarta procedūras (Sambrook *et al.*, 1989). Polimerāzes ķēdes reakcijas, DNS restrikcijas un ligēšanas reakciju apstākļi tika izvēlēti saskaņā ar fermentu piegādātāja (Fermentas) ieteikumiem. Klonēšanai un plazmīdu pavairošanai tika izmantots *E.coli* celms DH5 α .

Kora gēni un plazmīdu konstrukcijas. Šajā pētījumā izmantotie iekšējās delēcijas saturošie mutantie HBc gēni (1. attēls) ir iegūti no imunosupresētu nieru transplantācijas pacientu asins seruma (Preikschat *et al.*, 1999b). HBc gēni ir iegūti no pacientiem 8. (delēcija $\Delta 77-93$), 12. (delēcijas $\Delta 86-93$, $\Delta 45-46 + \Delta 86-93$, $\Delta 77-106$) un 36. ($\Delta 85-93 + \Delta 102-113$) ar aknu saslimšanu galējā fāzē, aknu cirozi un bez aknu cirozes, atbilstoši (Preikschat *et al.*, 2002). Klonēšana pSFV1 vektorā (Liljestrom un Garoff, 1991) kā arī plazmīdas ir aprakstītas publikācijās I un II. Īsumā, HBc gēni pēc PCR amplifikācijas no sākotnējām plazmīdām tika ievadīti pSFV1 vektorā. Nedeletētais dabīgā tipa A genotipa HBc gēns arī tika ieklonēts plazmīdā pSFV1. Iegūtās plazmīdas tika apzīmētas kā pSFV1/ $\Delta 86-93$, pSFV1/ $\Delta 45-46 + \Delta 86-93$, pSFV1/ $\Delta 77-106$, pSFV1/ $\Delta 85-93 + \Delta 102-113$, pSFV1/ $\Delta 77-93$ un pSFV1/HBc-wt (1. attēls).



1. attēls. Rekombinanto SFV konstrukciju ar iekšējās delēcijas saturošu Hbc gēna variantu shematisks attēlojums. (A) Šajā pētījumā izmantoto rekombinanto SFV konstrukciju vispārēja shēma. SFV vektors satur šādus elementus: SP6 promotoru, kas tiek izmantots rekombinantās SFV RNS *in vitro* transkripcijai, SFV nestrukturālos gēnus (nsP1-4), kas kodē SFV replikācijas kompleksu, SFV 26S subgenomisko promotoru un komplekso klonēšanas saiti. Hbc gēna delēciju variantu ievadīšanai tika izmantoti BamHI un SmaI restrikcijas saiti. (B) Iekšējās delēcijas saturošu Hbc gēnu ekspresija SFV sistēmā. Hbc-wt proteīna 41.-120. ask fragments ir parādīts augšā ar viena burta kodu, α -spirāles ir pasvītrotas. Iekšējās delēcijas saturoši Hbc proteīna varianti ir parādīti apakšā. Līnijām atbilst Hbc-wt identiska secība, deletēto aminoskābju pozīcijas ir parādītas rāmīša iekšpusē. Konstrukcijām pSFV1/ Δ 86-93 un pSFV1/ Δ 45-46+ Δ 86-93 ir apmaiņa 94. pozīcijā (G uz S). Konstrukcijā pSFV1/ Δ 77-106 ir apmaiņa 107. pozīcijā (C uz G). Konstrukcijā pSFV1/ Δ 85-93+ Δ 102-113 ir papildus G insercija 63. pozīcijā (norādīta ar bultu) un apmaiņa 69. pozīcijā (A uz V). Konstrukcijās pSFV1/ Δ 77-106 un pSFV1/ Δ 77-93 ir apmaiņa 144. pozīcijā (L uz P) (nav parādīta). MIR – Hbc proteīna galvenais imunodominantais rajons. (C) Shematisks grafisks HBV kora proteīna monomēra trīsdimensionālas struktūras attēlojums ar iezīmētām α -spirālēm. Delēciju atrašanās vietas atšķirīgos variantos ir apzīmētas ar svītrām.

Papildus D genotipa HBV pregenoms (Gēnu bankas pieejas kods: NCBI: 329640) pa Smal saitu tika ieklonēts plazmīdā pSFVdelStNrul (H. Garofa dāvana, aprakstīta publikācijā I, nosaukta kā pSFV/pg).

Šūnu kultūra un SFV ekspresijas sistēma. ir aprakstītas publikācijā I. Šeit seko īss apraksts.

RNS transkripcija, transfekcija un inficēšana. RNS *in vitro* ar SP6 polimerāzes palīdzību tika transkribēta no Spel linearizētām pSFV1 plazmīdām vai no Nrul linearizētas pSFVdelStNrul plazmīdas. *In vitro* transkribēta RNS saskaņā ar ražotāja rekomendācijām tika transficēta BHK šūnās ar elektroporāciju vai ar lipofekciju ar oligofektamīnu (*Invitrogen*). Alternatīvi, BHK (vai Huh7 šūnas) tika inficētas ar rekombinantajām SFV daļiņām (recSFV). Rekombinantās SFV daļiņas BHK šūnās tika radītas SFV daļiņās ar ko-elektroporāciju iepakojot rekombinanto RNS un SFV “palīg-RNS” (kura nodrošina SFV strukturālos gēnus).

Intracelulārās RNS analīzes (aprakstītas publikācijā II). Transficēto BHK šūnu kopējā šūnas RNS tika izolēta ar *TRIzol* (*Sigma*) un noteikta HBV specifiskās RNS klātbūtne *Northern blot*ā.

DNS izolēšana (aprakstītas publikācijā III). Pie šūnu lizātiem pievienoja DN-āzi I līdz beigu koncentrācijai 200 ūg/ml un MgCl₂ līdz beigu koncentrācijai 20 mM un inkubēja 30 minūtes pie 37 °C. Pēc tam DN-āzi inaktivēja, pieliekot EDTA līdz beigu koncentrācijai 50 mM.

Lai dezintegrētu kapsīdas, pievienoja proteīnāzi K (beigu koncentrācija - 1 mg/ml) un SDS (beigu koncentrācija - 2%) un maisījumu inkubēja 2 stundas pie 37 °C. Suspensiju nodzidrināja no proteīniem, pievienojot līdzīgu tilpumu fenola; pēc centrifugēšanas DNS tika izgulsnēta no supernatanta, pievienojot līdzīgu tilpumu izopropanola un NaCl līdz beigu koncentrācijai 0,3 M. Precipitēšanu veica pa nakti pie -20 °C. Pēc centrifugēšanas pie 11000 rpm pie 4 °C nogulsnes mazgāja 75% etanolā, izžāvēja un resuspendēja ūdenī.

Southern blots (aprakstītas publikācijā III). Paraugu elektroforēzi veica 1% agarozes gelā, un pa nakti ar kapilārā blota palīdzību veica pārneši uz neilona membrānu

(*Boehringer*). Pēc pārneses DNS imobilizēja uz membrānas, eksponējot to 3 minūtes ar ultravioleto gaismu transiluminatorā.

Noteikšana. Imobilizēto DNS pa nakti pie 58 °C hibridizēja ar DIG iezīmēto zondi (par matricu izmanto A genotipa pregenoma nejaušas zondes, Roche). Noteikšanai saskaņā ar ražotāja rekomendācijām izmantoja DIG luminiscento noteikšanas komplektu (*Roche*) un CDP (*Tropix*). Blotu attīstīja, to eksponējot uz rentgenfilmās.

In vitro translācija (publikācija II). HBc gēni Δ77-106 un Δ85-93 + Δ102-113 tika ieklonēti pSP64poly(A) vektorā (*Promega*). Atbilstošā HBc varianta RNS tika transkribēta *in vitro* ar SP6 RNS polimerāzi no *EcoRI* linearizētas plazmīdas un izmantota *in vitro* translācijai ar trušu retikulocītu lizāta sistēmu (*Amersham*). Proteīni tika iezīmēti *in vitro* translācijas reakcijas laikā ar [³⁵S]-metionīnu (*Amersham*) un analizēti ar SDS-PAGE. Izžāvētu gēlu eksponēja uz rentgenfilmās.

Inficēto šūnu metaboliskā iezīmēšana (publikācija II). Lai iezīmētu inficēto šūnu jaunsintezēto proteīnu, tika izmantots [³⁵S]-metionīns.

Šūnu lizēšana un HBc produktu analīze. Šūnu lizēšanu veica Nonidet P-40 (NP-40) saturošā līzes buferī (publikācija I), un iegūtos supernatantus izmantoja imunoprecipitācijai (IP) un imunofermentatīvajai analīzei (ELISA).

NP-40 lizātu HBc proteīna imunoprecipitācija tika veikta ar monoklonālajām anti-HBe antivielām un truša anti-HBc poliklonālo serumu (publikācija II). IP tika analizēta ar 14% SDS-PAGE un sekojošo autoradiogrāfiju. Lizēto šūnu neatšķaidīti supernatanti tika izmantoti HBc proteīna variantu imunoloģiskai noteikšanai ar HBeAg ELISA komplektu (*Diasorin*).

Western blots (publikācija II). Proteīni no inficētajām BHK šūnām tika sadalīti 14% SDS-PAGE un pārnesti uz PVDF membrānu. HBc proteīnu noteica reakcijā ar truša anti-HBc poliklonālo serumu, kam tālāk sekoja reakcija ar anti-trušu IgG, kas konjugēta ar mārrotku peroksidāzi (HRP), un hemiluminiscento substrātu, un membrānas eksponēšana uz rentgenfilmās.

Proteīnu degradācijas inhibitori (publikācija II). Pie inficētām BHK šūnām 8 stundas pēc infekcijas tika pievienoti proteasomālā metabolisma ceļa proteīnu

degradācijas inhibitori (MG132, laktacistīns) un lizosomālā metabolisma ceļa proteīnu degradācijas inhibitori (leupeptīns, pepstatīns), un inkubācija tika turpināta 12-16 stundas. No inficētām šūnām iegūtos proteīnus analizēja ar *Western blotu*.

Pulse-chase eksperiments (publikācija II). Lai noteiktu HBc varianta $\Delta 86-93$ pussabrukšanas laiku BHK šūnās apstākļos, kad degradācija pa proteasomālo metabolisma ceļu ir bloķēta, ar atbilstošu recSFV inficētās BHK šūnās metaboliski iezīmēja jaunsintezētos proteīnus MG132 inhibitora klātbūtnē un bez tā. Pēc iezīmi saturošas barotnes aizvietošanas ar neiezīmētu pilnvērtīgu barotni šūnas tika lizētas pēc dažādiem laika periodiem, un HBc proteīnu šūnu lizātos noteica ar IP. HBc specifiskās joslas autoradiogrāfos noteica ar programmu TINA (*Raytest GmbH, Straubenhardt*).

Elektromikroskopija. Inficētās BHK šūnas ($\sim 10^6$) lizēja līzes buferī ar NP-40. Kora daļiņas izgulsnēja ar centrifugēšanu caur 10% (svars/tilpums, TNE buferī: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 50 mM NaCl + 1 mM EDTA) saharozes "spilvenu" SW28 rotorā (Beckman) pie 25000 rpm 90 minūtes pie 4 °C. Nogulsnes resuspendēja TNE buferī. Kora daļiņu EM analīzes veica ar JEM100C elektronmikroskopu (JOEL Ltd, Tokija, Japāna) pie 80 kV paātrināšanā sprieguma un ekrāna palielinājuma 200 000x. Paraugu negatīvi krāsoja ar 2% fosfovolframskābi.

Iekšūnas HBc variantu imunocitohīmiskā noteikšana ar monoklonālajām antivielām (publikācija I). Tika nofiksētas speciālā šūnu kultūras traukā ar segstikliņu audzētās inficētās BHK šūnas. HBc proteīnu noteica reakcijā ar monoklonālajām antivielām un sekojošajām reakcijām ar anti-peļu IgG konjugētu sārmaino fosfatāzi un ar gaismas mikroskopu detektējamu substrātu.

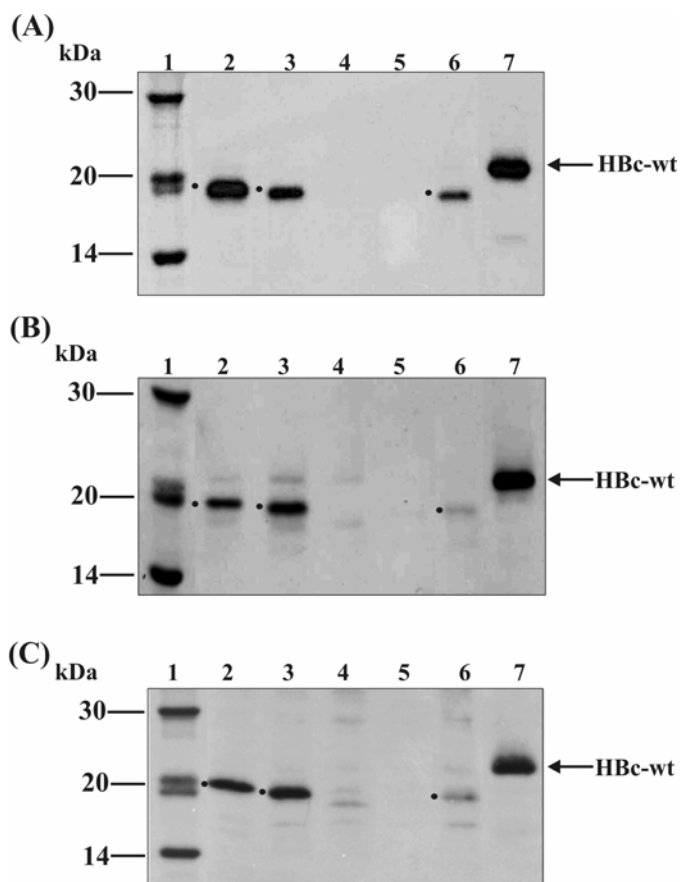
Rezultāti un diskusija

Iekšējās delēcijas saturošu HBc gēna variantu eikariotiskā ekspresija.

Tika pētīta no imunosupresētu nieru transplantācijas pacientu asins seruma izdalītu piecu iekšējās delēcijas saturošu HBc gēnu proteīnu ekspresija. Tika izvēlēta uz Semliki Forest vīrusa pamata izstrādāta ekspresijas sistēma (Liljestrom *et al.*, 1991), jo tā nodrošina mērķa proteīna efektīvu citoplazmatisko sintēzi, un ir pārbaudīta tās pielietojamība HBV proteīnu ekspresijai (Zajakina *et al.*, 2004).

Piecu mutanto HBc gēnu un delēcijas nesaturošā HBc-wt gēna (1. attēls) DNS kopijas tika insertētas pSFV1 ekspresijas vektorā, kurā kontroli nodrošināja SFV subgenomiskais (26S) promoters. Konstruktijas pSFV1/ Δ 86-93, pSFV1/ Δ 45-46 + Δ 86-93, pSFV1/ Δ 77-106, pSFV1/ Δ 85-93 + Δ 102-113, pSFV1/ Δ 77-93 un pSFV1/HBc-wt tika izmantotas kā matricas rekombinantās RNS *in vitro* transkripcijai ar SP6 RNS polimerāzi. Šī RNS tika transficēta zīdītāju šūnās (BHK un Huh7), kur mērķa dabīgais (HBc-wt) un mutantie HBc gēni tika ekspresēti ar SFV replikāžu palīdzību. Alternatīvi, šūnas tika inficētas ar rekombinantajām vīrusa daļiņām (recSFV), kuras bija radītas, SFV virionos iepakojot atbilstošo rekombinanto RNS.

Transficēto vai inficēto un pēc tam metaboliski iezīmēto BHK šūnu lizātu analīze ar SDS-PAGE parādīja paredzētās molekulāras masas HBc proteīnu klātbūtni HBc-wt konstrukcijas gadījumā (21,4 kDa). To pašu novēroja triju (no pieciem) pētīto mutantu gadījumā: Δ 86-93 (19,5 kDa), Δ 45-46 + Δ 86-93 (19,3 kDa) un Δ 77-93 (18,4 kDa). Paredzamās molekulārās masas zonu specifiskums tika apstiprināts ar HBc proteīnu imunoprecipitāciju ar monoklonālajām anti-HBe antivielām (2A. un 2C. attēli) un ar poliklonālo serumu pret HBc (2B. attēls). Gēni ar lielākām delēcijām Δ 77-106 (2. attēls, 4. līnija) un Δ 85-93 + Δ 102-113 (2. attēls, 5. līnija) neuzrādīja detektējamus atbilstošo HBc proteīnu daudzumus (17,5 kDa un 17,8 kDa, atbilstoši). Turklāt, mutanto gēnu ekspresētā HBc proteīnu daudzums, kā tas noteikts pēc SDS-PAGE zonu intensitātes, bija ievērojami zemāks par HBc-wt gēna produkta līmeni. Īsāko delēciju Δ 86-93 saturošais mutantais gēns uzrādīja augstāko detektējamā HBc proteīna līmeni, kamēr mutantā HBc proteīna līmenis delēcijas Δ 77-93 gadījumā bija ārkārtīgi zems. Šos rezultātus arī apstiprina HBe ELISA dati (rezultāti nav parādīti).



2. attēls. Iekšējās delēcijas saturošu HBc proteīnu analīzes *Ar recSFV* inficētās BHK (**A, B**) un Huh7 (**C**) šūnas tika radioaktīvi iezīmētas ar [³⁵S]-metionīnu. Šūnu lizāti tika izmantoti specifisko HBc proteīnu imunoprecipitācijai (IP) ar (**A, C**) monoklonālajām anti-HBe antivielām vai (**B**) poliklonālo serumu pret HBc, kam sekoja SDS-PAGE analīze.

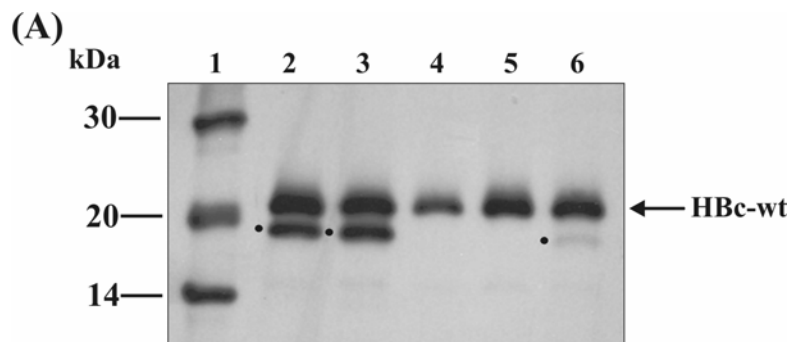
Līnija 1: proteīnu garuma marķieris; līnija 2: Δ86-93 (19,5 kDa); līnija 3: Δ45-46+Δ86-93 (19,3 kDa); līnija 4: Δ77-106 (17,5 kDa); līnija 5: Δ85-93+Δ102-113 (17,8 kDa); līnija 6: Δ77-93 (18,4 kDa); līnija 7: HBc-wt (21,4 kDa). Bultiņas norāda HBc-wt proteīna atrašanās vietu (21,4 kDa). Punkti norāda atbilstošos HBc mutantu proteīnus. Proteīnu garuma marķiera (varavīksnes [¹⁴C]metilēts, Amersham) izmēri ir doti kDa.

Šūnu lizātu elektronmikroskopiskā analīze parādīja, ka savākts raksturīgajās HBc daļiņās bija redzams tikai HBc-wt (3B. attēls).

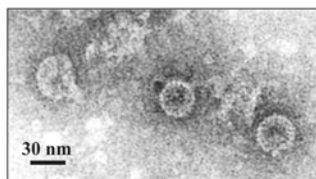
Mutanto HBc gēnu ekspresija tika pārbaudīta divās šūnu līnijās Huh7 un BHK. Abās šūnu līnijās, pārbaudot ar IP, nenovēroja atšķirības dažādu HBc proteīnu sintēzes attiecībās (2A. attēls, BHK un 2C. attēls, Huh7). Tā kā ekspresijas profili

neatšķiras Huh7 un BHK šūnās, visus tālākos eksperimentus veica BHK šūnās, kuras bija ērtākas SFV vektoru ekspresijas sistēmas izmantošanā.

E.coli sistēmā ir aprakstīts vājš stabilizējošs HBc-wt „palīg efekts” uz mutantajiem HBc proteīniem, vismaz uz Δ 77-93 proteīnu ((Preikschat *et al.*, 2000). Δ 77-93 proteīns spēja veidot mozaīkveida daļiņas ar HBc-wt, kas stabilizēja mutanto proteīnu.



(B)



3. attēls. HBc-wt un CID gēnu ko-ekspresija ar recSFV inficētās BHK šūnās. 16 stundas pēc ko-infekcijas šūnas tika iezīmētas ar [³⁵S]-metionīnu, un šūnu lizāti tika izmantoti specifisko HBc proteīnu imunoprecipitācijai (IP) ar monoklonālajām anti-HBe antivielām.

(A) Līnija 1: proteīnu garuma marķieris; līnija 2: HBc-wt un Δ 86-93 (19,5 kDa); līnija 3: HBc-wt un Δ 45-46+ Δ 86-93 (19,3 kDa); līnija 4: HBc-wt un Δ 77-106 (17,5 kDa); līnija 5: HBc-wt un Δ 85-93+ Δ 102-113 (17,8 kDa); līnija 6: HBc-wt un Δ 77-93 (18,4 kDa). Bultiņa norāda HBc-wt proteīna atrašanās vietu, punkti norāda atbilstošos HBV mutantu proteīnus.

(B) Pēc BHK šūnu inficēšanas ar recSFV/HBc-wt iegūtā HBc-wt elektronu mikrofotogrāfija (EM veikta uz JEM 100C elektronu mikroskopa, JEOL Ltd, Tokija, Japāna). Svīttra: 30 nm.

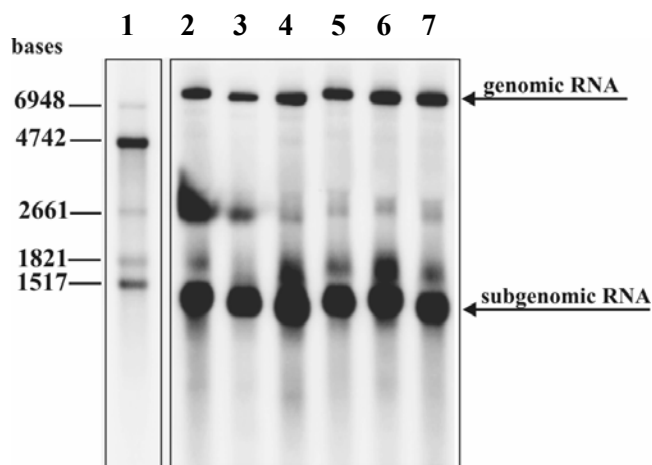
Lai pārbaudītu iespējamo HBc-wt proteīna stabilizējošo ietekmi uz iekšējās delēcijas saturošiem HBc proteīniem, tika īstenota HBc-wt un CID gēnu ko-ekspresija (3A. attēls). BHK šūnu ko-infekcija ar SFV1/HBc-wt un kādu no atšķirīgajām SFV1/HBc mutantajām konstrukcijām, kam sekoja šūnu lizātu analīze ar IP un SDS-PAGE,

parādīja HBc-wt un mutanto proteīnu Δ 86-93, Δ 45-46 + Δ 86-93 un Δ 77-93 sintēzi. Tomēr, HBc mutanto proteīnu Δ 77-106 un Δ 85-93 + Δ 102-113 sintēze netika konstatēta pat HBc-wt klātbūtnē.

Tas nozīmē, ka HBc-wt proteīns būtiski nestabilizē izmainīto kora proteīnu. Tas saskan ar rezultātiem, kādi iegūti rauga divhibrīdu sistēmā, kurā tikai Δ 86-93 variants parādīja spēcīgu mijiedarbību ar HBc-wt un pašu proteīnu, bet Δ 77-93 parādīja vidēju mijiedarbību ar HBc-wt proteīnu (R.Krenzer, 2001).

Sintēzes ceļš: iekšējās delēcijas saturošu HBc gēnu mRNS analīze un *in vitro* translācija. Tā kā CID variantu zemā, salīdzinot ar HBc-wt, proteīnu sintēze varētu būt izskaidrojama ar pazeminātu transkripciju vai translāciju, tika pētīti abi šie sintēzes posmi.

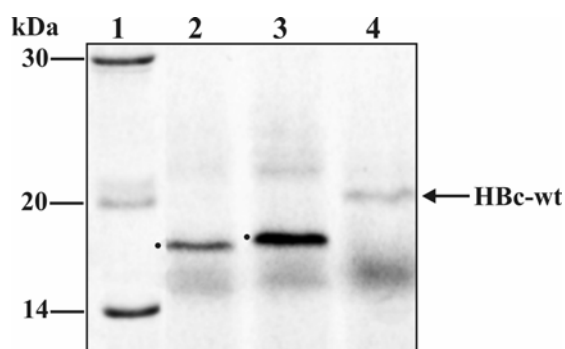
Mutanto un HBc-wt gēnu transkripcija tika analizēta, nosakot mRNS daudzumu. Lai to noskaidrotu, kopējā šūnas RNS tika izolēta no transficētām BHK šūnām, kuras ekspresēja HBc-wt vai mutantos gēnus, un tālāk veikta *Northern* blota analīze ar HBc gēna specifisko zondi.



4. attēls. No BHK šūnām, kas transficētas ar rekombinantajām SFV/HBC konstrukcijām, iegūto HBc gēnu specifisko RNS paraugu *Northern* blota analīze. Noteiktās rekombinantās SFV/HBC genomiskās (8816 bāzes HBc-wt gadījumā) un subgenomiskās (1500 bāzes HBc-wt gadījumā) RNS ir atzīmētas ar bultiņām. Līnija 1: RNS marķieris (Roche); līnija 2: Δ 86-93; līnija 3: Δ 45-46+ Δ 86-93; līnija 4: Δ 77-106; līnija 5: Δ 85-93+ Δ 102-113; līnija 6: HBc-wt; līnija 7: Δ 77-93.

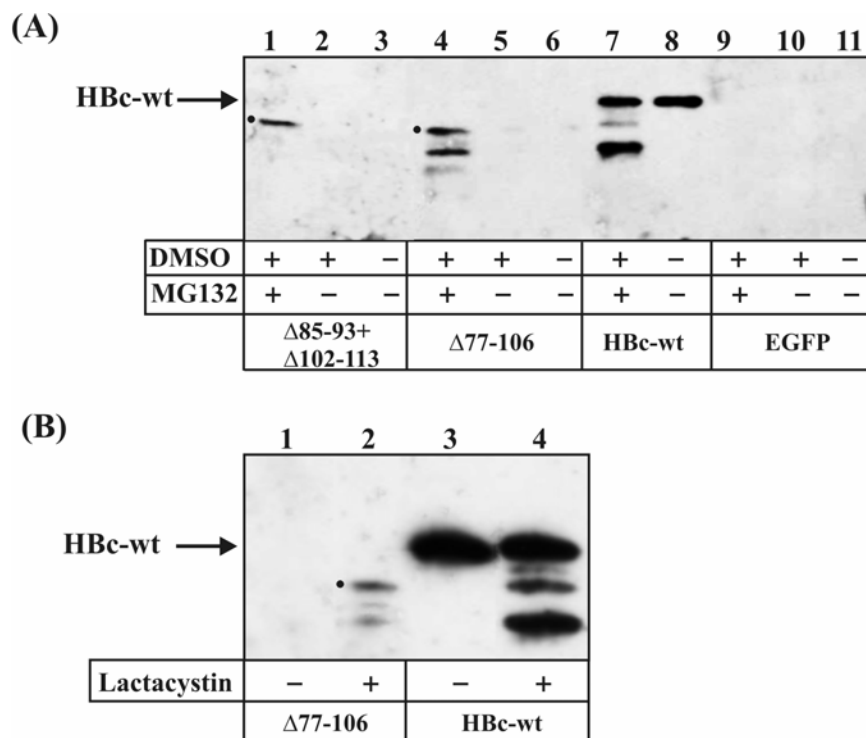
SFV replikācijas ciklā bija sagaidāmas divu veidu HBc RNS: a) replikons vai genomiskā RNS un a) subgenomiskā RNS. Ekspresējamo HBc gēna variantu gadījumā recSFV genoms atbildīs subgenomiskā RNS HBc proteīnu mRNS. Transficēto BHK šūnu kopējās RNS preparātos *Northern* blotā redzama abu tipu SFV RNS klātbūtne (4. attēls). Starp HBc-wt un mutantajiem gēniem netika atklātas atšķirības to detektējamās RNS līmenī. Netika novērota RNS degradācija. Rezultāti ierosina uz domu, ka iekšējās delēcijas saturošu HBc gēna variantu zemās ekspresijas cēlonis ir izmainītie translācijas vai pēctranslācijas procesi.

Lai atbildētu uz jautājumu, vai rekombinanto mRNS translācija norit netraucēti, atbilstošo proteīnu sintēzi šūnu kultūrā neuzrādošās HBc konstrukcijas Δ 77-106 un Δ 85-93 + Δ 102-113 tika *in vitro* translētas trušu retikulocītu lizātu sistēmā (5. attēls). Abos variantos tika noteikti paredzētās molekulārās masas proteīni – 17,5 un 17,8 kDa, atbilstoši. Tas nozīmē, ka, atšķirībā no šūnu kultūru eksperimentiem, HBc gēni ar garākām delēcijām tika efektīvi translēti *in vitro* sistēmā. Tādejādi, mēs uzskatām, ka pēctranslācijas degradācija ir atbildīga par šūnās nenovērojamiem proteīniem.



5. attēls. HBc gēnu Δ 77-106 un Δ 85-93+ Δ 102-113 translācija *in vitro* trušu retikulocītu translācijas sistēmā (Amersham). Proteīnus iezīmēja ar [³⁵S]-metionīnu un analizēja ar SDS-PAGE. Bultiņa norāda HBc-wt (4. līnija) atrašanās vietu, punkti norāda HBc variantu Δ 77-106 (2. līnija) un Δ 85-93+ Δ 102-113 (3. līnija) atrašanās vietas, atbilstoši. Proteīnu garuma marķiera (varavīksnes, [¹⁴C] metilēts, Amersham) izmēri ir doti kDa attēla kreisajā pusē (1. līnija).

Degradācijas ceļi. Tā kā HBc proteīna variantu sintēze bija normāla, radās jautājums, vai CID gēni *in vivo* tiek efektīvi translēti un ātri degradēti. Lai atbildētu uz šo jautājumu, tika pārbaudīti divi galvenie degradācijas metaboliskie ceļi – degradācija ar lizosomām un ar proteasomām, bloķējot šos ceļus ar inhibitoriem un, tādejādi, stabilizējot savādāk nestabilos proteīnus.



6. attēls. Iekšējās delēcijas saturošu HBc proteīnu iekššūnas uzkrāšanās pēc proteasomālās inhibīcijas. Šūnas tika inficētas ar recSFV, kas ekspresēja mutanto vai HBc-wt gēnu; 8 stundas pēc infekcijas šūnas vide tika aizvietota ar identisku, inhibitoru saturošu, vidi. 12-16 stundas vēlāk šūnu lizātus analizēja Western blotā ar poliklonālajām anti-HBc antivielām.

(A) Δ85-93+Δ102-113 un Δ77-106 mutanto variantu analīze pēc šūnu apstrādes ar MG132 inhibitoru; (B) Δ77-106 mutantā varianta analīze pēc šūnu apstrādes ar inhibitoru laktacistīnu. Punkti norāda mutantā HBc proteīna paredzamo atrašanās vietu. Bultiņas norāda pilna garuma HBc-wt proteīna atrašanās vietu.

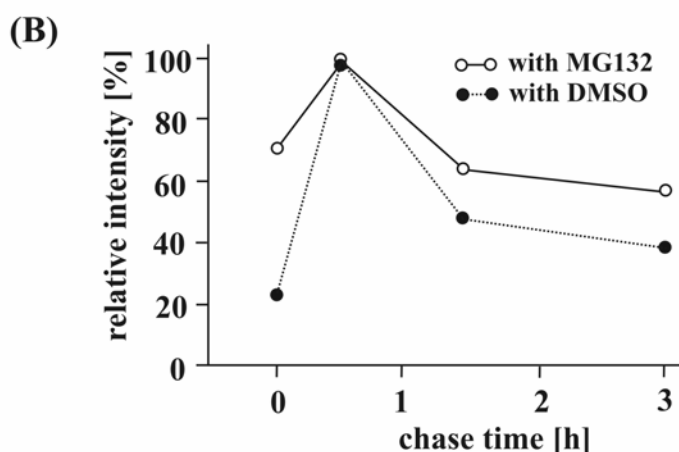
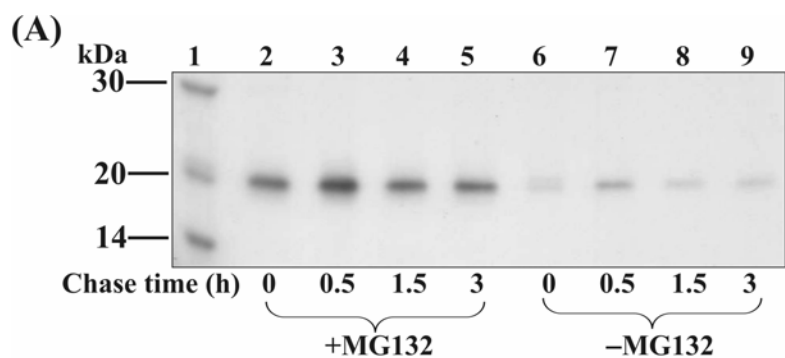
Eksperimentā ar HBc-wt vai CID gēnus saturošu recSFV inficētas BHK šūnas tika audzētas atbilstošo degradācijas ceļu inhibitoru klātbūtnē; sintezēto HBc proteīnu pēc šūnu lizēšanas analizēja Western blotā reakcijā ar poliklonālo anti-HBc

serumu. Lizosomālās degradācijas inhibitori leupeptīns, kas ir apgriezenisks serīna un cisteīna proteāžu inhibitors, un pepstatīns, kas ir spēcīgs skābo proteāžu inhibitors, neuzrādīja ietekmi uz HBc-wt un mutanto proteīnu sintēzi. Inhibitora MG132, kas ir zināms kā 26S un 20S proteasomu bloķētājs, pievienošana deva iespēju ar *Western* blota palīdzību atrast mutantos HBc proteīnus pat gadījumos ar lielākajām delēcijām Δ 85-93 + Δ 102-113 un Δ 77-106 (6A. attēls), kas nebija nosakāmi ar IP un ELISA. HBc proteīnu Δ 86-93, Δ 45-46 + Δ 86-93 un Δ 77-93 gadījumā arī tika novērota palielināta proteīna zonas intensitāte, ja tika pievienots proteasomālais inhibitors MG132 (dati nav parādīti). Apstrāde ar MG132 noveda pie pilna garuma HBc proteīnu un saīsinātu (iespējams, nošķeltu), zemākas molekulārās masas proteīnu uzkrāšanās. Konstrukcija, kas pSFV1 vektorā ekspresēja modificētu zaļo fluorescējošo proteīnu (EGFP), tika izmantota par negatīvo kontroli visos inhibīcijas eksperimentos (6A. attēls, 9.-11. līnijas)

Tā kā MG132 nav absolūti specifisks proteasomai un ietekmē arī noteiktas lizosomālās proteāzes, mēs izvēlējāmies Δ 77-106 gēna variantu, kas uzrādīja efektīvu ekspresiju pēc apstrādes ar inhibitoru MG132, tālākai analīzei ar laktacistīnu, citu proteasomālās degradācijas inhibitoru, kas specifiski inhibē proteasomālo β -subvienību, modificējot tās treonīna atlikumu (Coux *et al.*, 1996). Laktacistīns efektīvi bloķē mutanto HBc proteīnu degradāciju (6B. attēls). Mēs novērojām HBc Δ 77-106 un HBc-wt proteīnus un zemākas molekulārās masas HBc specifiskās zonas, kas nav redzamas bez proteasomālā inhibitora. Visizteiktāk tas ir gadījumā ar HBc-wt (6A. un 6B. attēli), kur varēja detektēt trīs papildus zonas. Tās varēja atbilst fāzē nolasītiem polipeptīdiem, kas tika sintezēti, ja translācija uzsākās kodona pozīcijās 66 un 92 (Kim *et al.*, 2003), vai pilna garuma proteīna degradācijas starpproduktiem.

Citos apstākļos nestabilo iekšējās delēcijas saturošo HBc proteīnu uzkrāšanās proteasomālās degradācijas inhibitoru klātbūtnē notiek mutanto proteīnu pussabrukšanas laika palielināšanās dēļ. Tas tika parādīts *pulse chase* eksperimentā, kur šūnas HBc proteīns laika gaitā tika kvantitēts. Šai analīzei tika izvēlēts Δ 86-93 variants, jo tas uzrādīja augstāko ekspresijas līmeni starp visiem HBc gēna mutantiem. Δ 86-93 ekspresējošās šūnas tika impulsveidā iezīmētas ar [³⁵S]-metionīnu ar vai bez proteasomālā inhibitora MG132; [³⁵S]-metionīna iezīmei sekoja neiezīmēta metionīna pārākums, un šūnas tika lizētas pēc atšķirīgiem laika

intervāliem. Mutantais HBc proteīns tika imunoprecipitēts no šūnu lizātiem ar anti-HBe monoklonālajām antivielām un analizēts ar SDS-PAGE (7A. attēls).



7. attēls. Proteīna $\Delta 86-93$ intracellulārā stabilitāte (A) Ar $\Delta 86-93$ recSFV inficētas BHK šūnas tika 2 stundu laikā radioaktīvi iezīmētas ar [^{35}S]-metionīnu un tad pārnestas barotnē ar neiezīmēta metionīna pārākumu. Šūnas tika lizētas iezīmes beigū punktā (nulle laiks) un pēc tam pēc dažādiem laika intervāliem (0,5, 1,5 un 3 stundas). Viens šūnu komplekts tika pakļauts MG132 iedarbībai. $\Delta 86-93$ produkts tika imunoprecipitēts no šūnu lizātiem ar anti-HBe monoklonālajām antivielām un analizēts ar SDS-PAGE. Iezīmētā proteīna pieaugums 0,5 stundas pēc iezīmes beigām izskaidrojams ar proteīnos vēl neinkorporēto brīvo intracellulāro [^{35}S]-metionīnu, kas bija saglabājies pēc garā iezīmes perioda.

(B) Autoradiogrāfs tika noskenēts un kvantitēts ar TINA programmatūru (Raytest GmbH, Štraubenharta, Germany). Rezultāti ir parādīti kā procenti no spēcīgākā signāla.

Novērtētās proteīna zonas atkarībā no laika pēc iezīmes brīža tika atliktas grafikā (7B. attēls). Kontroles šūnās (BHK šūnas, kas inficētas ar $\Delta 86-93$ ekspresējošu recSFV, bez inhibitora) proteīna pussabrukšanas laiks bija apmēram 1 stunda. Ar

MG132 apstrādātās šūnās proteīna degradācija bija lēnāka, pussabrukšanas laiks bija garāks par 3 stundām. Šie rezultāti parādīja, ka proteasomas aktivitātes bloķēšana būtiski pagarināja mutantā HBc proteīna pussabrukšanas laiku.

Mutanto HBc proteīnu detekcija MG132 un laktacistīna klātbūtnē norāda, ka *in vivo* šie proteīni ātri tiek degradēti pa proteasomālo degradācijas ceļu. Iespējams, delēcijas izjauc HBc proteīna formu tādā veidā, ka tas kļūst vismaz daļēji nesavākts. Kā šādu nepareizu struktūru mutanto HBc proteīnu proteasoma atpazīst un degradē. Pētītajos HBc proteīna variantos delēcijas atrodas rajonā, kas gandrīz pilnībā ir α -spirālisks (Wynne *et al.*, 1999) (1C. attēls), un tāpēc tas nepieļauj mutācijas (Koschel *et al.*, 1999).

Degradācija pa proteasomālo degradācijas ceļu tika atklāta arī citam HBV proteīnam – HBx proteīnam (Hu *et al.*, 1999). Šajā gadījumā tika norādīts, ka mijiedarbība starp X proteīnu un proteasomu var radīt izmaiņas proteasomas darbībā un noteikt X proteīna patogēno efektu inficētajās šūnās.

Proteasomas ģenerē vairumu MHC I klases prezentēto epitopu. HBc proteīnam ir raksturoti trīs CTL epitopi: HLA-A2 specifiskais CTL epitops 18-27 (Bertoletti *et al.*, 1991; Bertoletti *et al.*, 1993), HLA-Aw68 specifiskais CTL epitops 141-151 (Missale *et al.*, 1993) un HLA-A11 specifiskais CTL epitops 88-96 (Tsai *et al.*, 1996). HLA-Aw68 specifisko HBc CTL epitopu 141-151 šķeļ imunoproteasomas (Sijts *et al.*, 2000). Tālāk, ir ticis parādīts, ka interferona stimulēta HBV replikācijas inhibīcija ir proteasomas atkarīga (Robek *et al.*, 2002). Mutantais HBc proteīns tādejādi var veicināt patoģenēzi ar ātru nesavāktā mutantā proteīna apriņķī šūnā, tā degradāciju un CTL epitopu ģenerēšanu. Visos pētītajos variantos bija saglabāti epitopi 18-27 un 141-151, bet CTL epitops 88-96 ir pilnībā vai daļēji deletēts vairumā mutanto HBc varaintu. Ir arī iespējams, ka delēcijas rada jaunus epitopus, kuri neatrodas HBc-wt. Hipotēzi, ka radītie epitopi var dot ieguldījumu HBV patoģenēzē, apstiprina fakts, ka šīs grupas pacientiem imunosupresējošās zāles pilnībā nelikvidē CTL atbildi.

Iekšējās delēcijas saturošu un dabīgā tipa HBc proteīnu subcellulārā lokalizācija. Hroniskiem HBV nesējiem HBc proteīns ir atklāts gan kodolā, gan citoplazmā (Mondelli *et al.*, 1986). Saskaņā ar dažādu hepatīta formu sadalījuma profilu tika konstatēts, ka atrašanās kodolā korelē ar vieglu hepatīta formu, kamēr citoplazmatiskā lokalizācija ir saistīta ar hronisku aktīvu hepatītu ((Hsu *et al.*, 1987, Chu *et al.*, 1987). Tā kā CID varianti tika izolēti no hroniskiem vīrusa

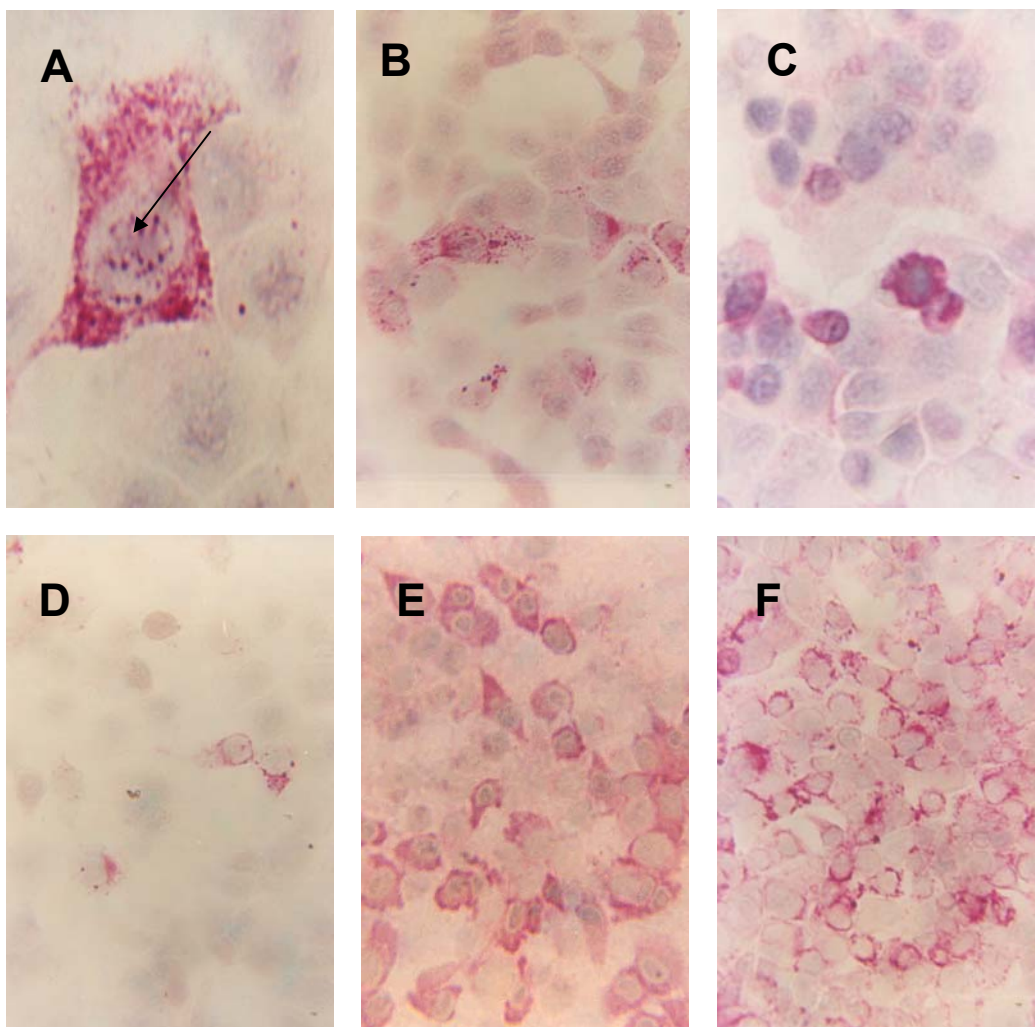
nesējiem, kuriem aknu saslimšana atradās galējā fāzē, mēs bijām ieinteresēti izpētīt no šīs hronisko nesēju grupas izdalīto HBc variantu subcellulāro sadalījumu.

Lai to noskaidrotu, tika veikta ar CID un HBc-wt gēnus ekspresējošu recSFV inficētu BHK šūnu kultūru imunocitoķīmiskā analīze. HBc sintēze tika kontrolēta ar gaismas mikroskopiju pēc reakcijas ar monoklonālajām antivielām, kuru piesaistes vieta 134.-140. ask bija saglabāta visos CID variantos. SFV sistēmā HBc-wt tika ekspresēts no divām atšķirīgām konstrukcijām: viena konstrukcija, kas kodē vienu pašu HBc gēnu, un otra konstrukcija, kas kodē visu HBV pregenomu.

Pirmo 24 stundu laikā pēc inficēšanas pieauga to šūnu procentuālais skaits, kas krāsojās pozitīvi. Vairumā gadījumu šajā laikā tika sasniegts maksimālais līmenis. Tādēļ HBc gēna ekspresija tika kontrolēta vienu dienu pēc inficēšanas. Nokrāsoto šūnu skaits un krāsojuma intensitāte būtiski mainījās. Nokrāsoto šūnu skaits lielākais bija HBc-wt gadījumā (ar abām konstrukcijām), maksimālās vērtības sasniedzot virs 60% (un līdz pat 80%); atbilstošās vērtības CID mutantiem bija daudz zemākas.

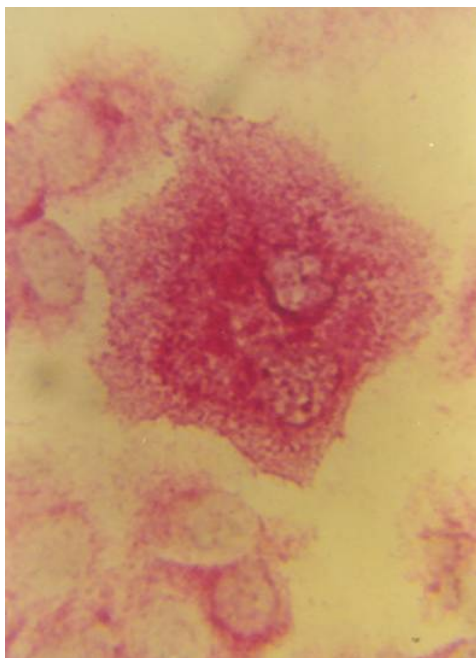
Citoplazmatiskā krāsošanās tika detektēta visos gadījumos, kad HBc proteīns tika ekspresēts no CID un HBc-wt gēniem (8. attēls). Stipra citoplazmatiskā krāsošanās tika novērota HBc-wt gadījumā, kad ekspresijai tika izmantotas abas konstrukcijas, kur HBc proteīns uzkrājās šūnas telpā ap kodolu. CID proteīnu citoplazmatiskā krāsošanās bija mazāk intensīva.

Tālāka HBc proteīna iekššūnas sadalījuma analīze parādīja, ka CID proteīnu gadījumā neliels HBV kora proteīna daudzums ir detektējams BHK šūnu kodolos (apmēram 5% variantam Δ 86-93, mazāk par 5% citu variantu gadījumā). Tas pats ekspresijas sadalījums – citoplazmatiskā un nukleārā krāsošanās – tika novērots, kad HBc-wt proteīns tika ekspresēts kopā ar HBV pregenomu (9. attēls). Pārsteidzoši, ka no SVF1/core-wt ekspresētais HBc-wt uzrādīja stipru citoplazmatisko, bet ne reizi - nukleāro krāsošanos (8F. attēls)



8. attēls. *Imunocitoķīmiskā HBc kora proteīna noteikšana BHK-21 šūnu kultūrās, kas ir tikušas inficētas ar SFV1/HBV kora variantiem un SFV1/HBc-wt. HBc tika detektēts reakcijā ar monoklonālo antivielu 10C6. Δ 86-93 (A) uzrāda gan nukleāro (bultiņa), gan citoplazmatisko krāsošanos.*

Attēlos parādītas BHK-21 šūnas, kas ekspresē šādus HBV kora variantus: (A) Δ 86-93 (palielinājums x 270), (B) Δ 45-46+ Δ 86-93 (palielinājums x 108), (C) Δ 77-93 (palielinājums x 270), (D) Δ 85-93+ Δ 102-113 (palielinājums x 108), (E) Δ 77-106 (palielinājums x 108), (F) dabīgais kora proteīns no pSFV1/HBc-wt (palielinājums x 108).



9. attēls. *Imunocitoķīmiskā HBc kora proteīna noteikšana BHK-21 šūnu kultūrās, kas ir tikušas inficētas ar vīrusa daļiņām, kuras ekspresē HBV pregenomu. HBc kora proteīns tika detektēts reakcijā ar monoklonālo antivielu 10C6.*

No konstrukcijas pSFV1/HBVpg ekspresētais HBc kora proteīns tika atrasts šūnu citoplazmā un kodolos (palielinājums x 270).

Šis krāsošanās sadalījums varētu atspoguļot atšķirīgu HBc proteīnu stabilitāti un to spēju pašsavākties kapsīdveida struktūrās.

HBc proteīns savā karboksi-galā satur nukleārās lokalizācijas signālu. Tā kā pētītajos HBc proteīna variantos delēcijas atrodas rajonā, kas gandrīz pilnībā ir α -spirālisks (Wynne *et al.*, 1999), un tāpēc tas nepieļauj mutācijas (Koschel *et al.*, 1999), delēcijas, iespējams, izsauc deformāciju un vismaz daļēju nespēju pieņemt konformāciju, kāda nepieciešama normālam kapsīdas pašsavākšanās procesam. Nepareizās konformācijas dēļ nukleārās lokalizācijas signāls kļūst eksponēts, un HBc proteīns tiek transportēts uz kodolu.

Šie rezultāti neatbalsta hipotēzi, ka HBc proteīna nukleārā lokalizācija atbilst vieglākām hepatīta formām. Visi delēciju varianti, izņemot Δ 85-93 + Δ 102-113, tika izdalīti no pacientiem ar aknu cirozi un ESLD. Tā kā mēs novērojam nukleāro HBc proteīniem ar CID, kam tika parādīta saistība ar ESLD, ir vilinoši izskaidrot to nukleārās lokalizācijas saistību ar patoģenēzi. HBc proteīna funkcija kodolā joprojām

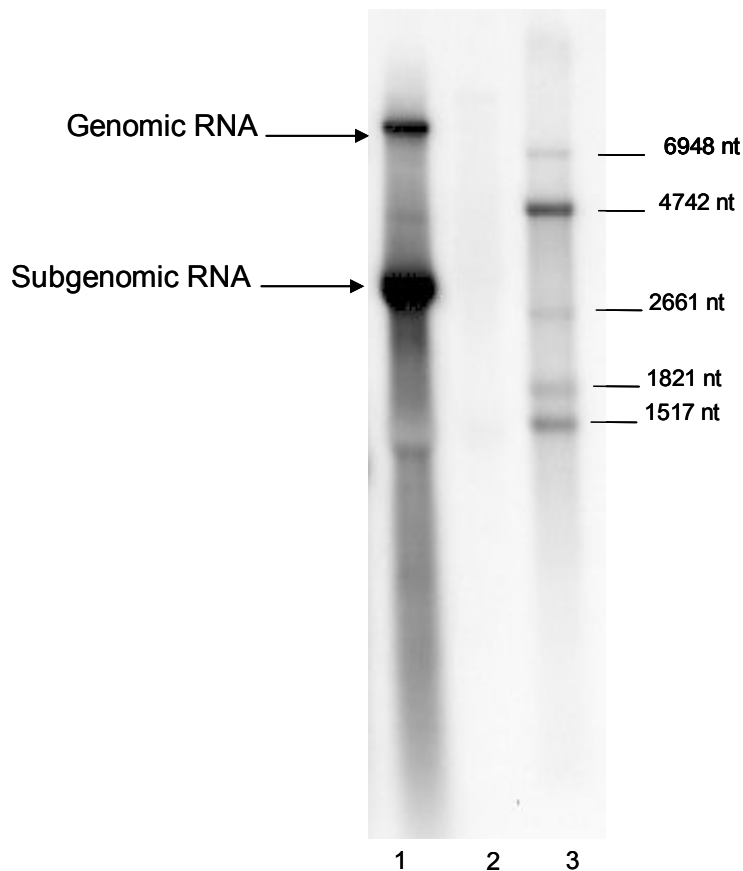
nav īsti skaidra. Šķiet, ka HBc proteīns nav nepieciešams HBV genoma importēšanai (Kann *et al.*, 1997). Liao *et al.* (1995) izvirza domu, ka tas varētu piesaistīt superspiralizēto DNS un, tādejādi, supresēt virālās mRNS transkripciju, izveidojot pastāvīgās inficēšanās stāvokli.

No divām dažādām konstrukcijām ekspresētā HBc-wt proteīna atšķirīgo subcellulārā sadalījumu spektru arī var izskaidrot ar stabilitātes atšķirībām.

No tikai HBc gēnu kodējošās recSFV ekspresētais HBc-wt proteīns ir stabils un savācas kapsīdās, kuras ir nosakāmas ar elektronu mikroskopiju (3B. attēls) un kuras nešķērso kodola membrānu. Transgēno peļu modelī intaktā kora daļiņas neiet cauri kodola membrānai (Guidotti *et al.*, 1994b), un kapsīdu izjukšana tika novērota kā nepieciešamais priekšnoteikums HBc proteīna transportam saimniekšūnas kodolā. Šo viedokli apstrīd nesenie pētījumi. Tika atklāts, ka kodola poru diametrs ir lielāks (Pante *et al.*, 2002) par sākotnēji domāto (Dworetzki *et al.*, 1988), tāpēc HBV kapsīdas var izkļūt cauri neskartā veidā (Rabe *et al.*, 2003). Jebkurā gadījuma notiek zināma kapsīdas reorganizācija, jo fosforilēšanas rezultātā HBc proteīna nukleārās lokalizācijas signālu saturošās C-terminālās sekvenču kļūst eksponētas (Rabe *et al.*, 2003).

No HBc pregenoma ekspresētais HBc-wt proteīns tiek importēts uz kodolu, iespējams, vienlaicīgi ar HBV replikācijas cikla inducēšanu.

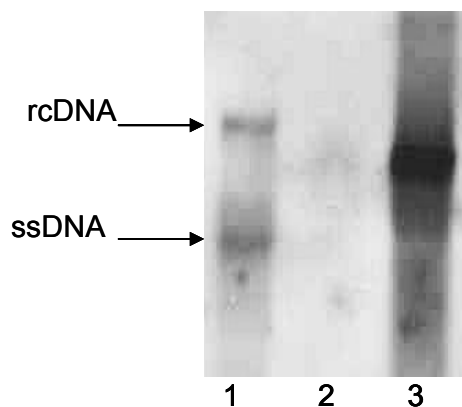
Replikācijas indukcijas eksperimentālais pierādījums ir divu veidu HBV specifisko DNS paraugu noteikšana ar *Southern* blotu (11. attēls) pēc BHK šūnu inficēšanas ar HBV pregenomu ekspresējošām vīrusu daļiņām. Fakts, ka pregenoma ekspresija ir pietiekama, lai uzsāktu HBV replikāciju alfavīrusu sistēmā, jau iepriekš ir aprakstīts pīļu HBV ekspresijai Sindbis vīrusa sistēmā (Huang *et al.*, 1991). Huang *et al.*, 1991, arī demonstrēja modeli, kā alfavīrusu sistēmā notiek HBV replikācija. Alfavīrusu sistēmā transficētā vai inficētā (+)-RNS tiek transkribēta *in vivo* par (-)-RNS, no kuras tiek transkribētas (+)-genomiskā RNS un subgenomiskā RNS. Šie RNS paraugi pēc kopējās šūnas RNS izdalīšanas no transficētām BHK šūnām tika noteikti ar *Northern* blotu (10. attēls).



10. attēls. BHK-21 šūnas tika lipofektētas ar rekombinanto SFV, kas ekspresēja HBV preģenomu, un analizēta HBV specifiskās RNS transkripcija. Kopējā RNS tika izolēta no šūnām, elektroforētiski sadalīta agarozes gēlā denaturējošos apstākļos un blotēta uz nitrocelulozes membrānas, kur specifisko RNS vizualizēja ar CCD kameru pēc reakcijas ar DIG iezīmētu zondi pret HBV ģenomu. Augšējā zona atbilst ģenomiskajai RNS, apakšējā zona – subģenomiskajai RNS, kas kalpo par matricu proteīnu translācijai. Līnija 1: izolētā RNS no BHK šūnām, kas transficētas ar HBV preģenomu kā iepriekš aprakstīts; līnija 2: negatīvā kontrole (neinficētas šūnas); līnija 3: RNS marķieris.

Plazmīdā pSFV/pg alfavīrusu strukturālie gēni subģenomiskās RNS rajonā tika aizvietoti ar HBV preģenoma sekvenci. No šīs RNS tiek translēti HBV proteīni. HBV polimerāzes proteīna translācijas laikā HBV preģenoma apgrieziskā transkripcija par (-)-DNS noved pie nepilnīgi pabeigtas (+)-DNS sintēzes. Šos replikācijas cikla pirmos soļus mēs varam parādīt. Parādās divu veidu DNS (11. attēls): lielākā DNS, kas migrē lēnāk par HBV ģenoma PCR fragmentu un kuru

var attiecināt uz divpavedienu relaksētu cirkulāru DNS, kamēr mazākais fragments varētu būt vienpavediena DNS.



11. attēls. BHK-21 šūnas tika inficētas ar HBV pregenomu ekspresējošām SFV daļiņām. Kopējā DNS tika izolēta no šūnām, elektroforētiski sadalīta agarozes gēlā un blotēta uz nitrocelulozes membrānas, kur specifisko DNS vizualizēja ar CCD kameru pēc reakcijas ar DIG iezīmētu zondi pret HBV genomu.

No inficētām BHK šūnām izdalītā DNS uzrādīja divas HBV specifiskas zonas, augšējā zona ir ar neredzami lielāku molekulāro svaru par HBV genoma PCR produktu un, tādejādi, atbilst relaksētai cirkulārai DNS, apakšējā ir mazāka, kā tas sagaidāms ssDNS formai. Līnija 1: no ar pSFV1/pregenomu inficētām BHK šūnām izolēta DNS; līnija 2: negatīvā kontrole (neinficētas šūnas); līnija 3: HBV pregenoma PCR fragments.

Lai gan mēs nevaram pierādīt pilnu HBV pregenoma replikācijas ciklu SFV sistēmā, jo nav iespējams noteikt kovalenti noslēgtu cirkulāru HBV DNS, kam par pamatu varētu būt fakts, ka tas ir neefektīvs process, mēs pieļaujam, ka DNS tiek pārnesta uz kodolu. Mēs pieņemam, ka vienlaicīgi HBc proteīns tiek importēts uz saimniekšūnas kodolu vai nu kapsīdu dezintegrācijas rezultātā, vai arī savāktā veidā. Rezultātā dabīgā tipa HBc proteīnu atrod kodolā, kad tas tiek ekspresēts kopā ar HBV pregenomu.

Secinājumi

1) SFV sistēma izrādījās piemērota sākotnēji no imunosupresētu nieru transplantācijas slimnieku asins seruma izdalītu iekšējās delēcijas saturošu HBC kora gēna variantu pētījumiem. Pieci atšķirīgi CID varianti tika ekspresēti ar SFV replikona palīdzību, un dažāda tipa šūnās (BHK, Huh7) tika pētīts proteīnu sintēzes līmenis salīdzinājumā ar dabīgo HBc. Mutanto HBc proteīnu sintēzes līmenis izrādījās ievērojami zemāks par HBc-wt sintēzi un divos gadījumos pat zemāks par izmantoto metožu jutības robežu.

2) CID proteīnu zemās sintēzes iemesli tika analizēti transkripcijas un translācijas līmenī. CID variantu mRNS līmenis nebija samazināts salīdzinājumā ar HBc-wt. Divu HBc mutantu, kuru sintēze nebija detektējama IP un ELISA, *in vitro* translācija bija veiksmīga. Tika izdarīts secinājums, ka sintēzes ceļa – transkripcijas un translācijas – soļi mutantajiem HBc notiek normāli, bet posttranslācijas process ir atbildīgs par zemu CID proteīnu līmeni šūnā.

3) Degradācijas ceļu analīze parādīja, ka lizosomālā ceļa inhibīcijai nebija ietekme uz CID proteīnu intracellulāro daudzumu, bet proteasomālā degradācijas ceļa inhibīcija visos gadījumos palielina CID proteīna līmeni līdz detektējamam līmenim. Šā fakta iemesls ir pagarinātais CID proteīna pussabrukšanas laiks.

CID proteīna subcellulārā lokalizācija tika pētīta salīdzinājumā ar HBc-wt. CID proteīni lielākoties atradās citoplazmā, tomēr, neliels daudzums CID proteīna tika detektēts inficēto BHK šūnu kodolos. HBc-wt tika ekspresēts no divām atšķirīgām konstrukcijām: viena konstrukcija, kas kodē vienu pašu HBc gēnu, un otra konstrukcija, kas kodē HBV pregenomu. No SFV/HBc-wt ekspresētais HBc-wt atradās tikai citoplazmā, kamēr no SFV-pg ekspresētais HBc-wt atradās gan citoplazmā, gan kodolā. Nukleāro lokalizāciju var saistīt ar HBc proteīna stabilitāti. CID variantos proteīna struktūra ir pārrauta ar delēcijām, un proteīns nevar ieņemt pareizo telpisko struktūru; tā rezultātā, nukleārās lokalizācijas signāls kļūst eksponēts, un CID proteīns tiek translocēts caur kodola membrānu. No SFV/HBc-wt ekspresētais HBc-wt savācas stabilās kora daļiņās, kuras paliek citoplazmā; HBc

kapsīdu savākšanās ir pierādīta ar elektronu mikroskopiju. No SFV/pg ekspresētais HBc-wt iniciē replikācijas ciklu un vienlaicīgi tiek transportēts uz kodolu.

5) SFV vektorā ir ievadīts HBV pregenoms. Ar *Southern* blota palīdzību ir demonstrēti HBV replikācijas cikla agrīnie etapi. Šajā aspektā ar SFV replikona palīdzību ekspresētais HBV pregenoms var tikt izmantots HBV bioloģijas pētījumiem. Tomēr nepieciešama tālāka optimizācija.

Hipotēze par CID variantu ietekmi uz HBV patoloģiju ar HBc deletantu uzkrāšanos netika pierādīta. Iekšējās delēcijas saturošie HBc proteīni ātri tiek degradēti proteasomālajā degradācijas ceļā; tas varētu ietekmēt patoģenēzi ar nepareizo konformāciju ieguvušo proteīnu ātro apriti šūnā, degradāciju un CTL epitopu radīšanu, ieskaitot arī jaunus CTL epitopus, kādus nerada dabīgais kora gēns. Nukleārā lokalizācija arī var ietekmēt patoģenēzi. Tālākajā pētījumā šiem aspektiem vēlams pievērst uzmanību.

Atsauces

Ando K., Moriyama T., Guidotti L.G., Wirth S., Schreiber R.D. et al. (1993). Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 178: 1541-1554.

Ando K., Guidotti L.G., Wirth S., Ishikawa T., Missale G. et al. (1994). Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytotoxic for their target cells in vivo. *J Immunol* 152(7): 3245-53.

Berglund P., Sjöberg M., Garoff H., Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljeström P. (1993): Semliki Forest Virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology*, 11(8): 916-20.

Bertoletti A., Ferrari C., Fiaccadori F., Penna A., Margolskee R. (1991). HLA class I-restricted cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10445-10449.

Bertoletti A., Chisari F.V., Penna A., Guilhot S., Galati L. et al. (1993). Definition of a minimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J Virol* 67(4): 2376-80.

Bertoletti A., Southwood S., Chesnut R., Seite A., Falco M. et al. (1997): Molecular features of the Hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 17-27: interaction with HLA and T-cell receptor. *Hepatology* 26(4): 1027-1033.

Bertoletti A, Mala K.M. (2000). Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and D infection? *Current Opinion in Microbiology* 3: 387-392.

Bichko V., Schodel F., Nassal M., Gren E., Berzinsh I. et al. (1993): Epitopes recognized by antibodies to denatured core protein of hepatitis B virus. *Mol Immunol* 30(3):221-31.

Birnbaum F., Nassal M. (1990): Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: Primary structure requirements in the core protein. *J Virol*, 64(7): 3319-3330.

Cattaneo R., Will H., Schaller H. (1984). Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.* 3: 2191-2196.

Chain B.M., Myers R. (2005). Variability and conservation in hepatitis B virus core protein. *BMC Microbiology* 5:33.

Chisari F.V., Ferrari C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1, 29-60.

Chisari F.V. (1997). Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 99 (7): 1472-1477.

Chu C.M., Liaw Y.F. (1987): Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B infection. Hepatocyte with cytoplasmic/membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 92(1):220-5.

Conway J.F., Cheng N., Zlotnick A., Stahl S.J., Wingfield P.T. et al. (1998): Hepatitis B virus capsid: localization of the putative immunodominant loop (residues 78-83) on the capsid surface, and implications for the distinctions between c and e-antigens. *J Mol Biol* 279:1111-1121.

Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65:801-847.

Dworetzky S.I., Feldherr C.M. (1988): Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* 106:575-584.

Eckhardt S.G., Milich D.R., McLachlan A. (1991): Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol*: 65 (2) 575-82.

Frolov I., Hoffman T.A., Pragai B.M., Dryga S.A., Huang H.V., Schlesinger S., Rice C.M. (1996): Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci. USA* 93:11371-11377.

Garoff H., Li K.-J. (1998): Recent advances in gene expression using alphavirus vectors. *Curr Opin Biotech* 9: 464-469.

Glasgow G., McGee M.M., Tarbatt C.J., Mooney D.A., Sheahan B.J., Atkins G.J. (1998): The Semliki Forest Virus vector induces p53-independent apoptosis. *J Gen Vir*, 79: 2405-2410.

Guidotti L.G., Ando K., Hobbs M.V., Ishikawa T., Runkel L. et al. (1994a). Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3764-3768.

Guidotti L.G., Martinez V., Loh Y.T., Rogler C.E., Chisari F.V. (1994b). Hepatitis B virus nucleocapsid particles do not cross the hepatocyte nuclear membrane in transgenic mice. *J Virol*: 68(9):5469-75.

Guidotti L.G., Chisari F.V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune system. *Annu Rev Immunol* 19: 65-91.

Guidotti L.G. (2002). The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 20:A80-A82.

Günther S., Bi-Chen L., Miska S., Krüger D.H., Meisel H., Will H. (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol* 69(9): 5437-5444.

Gunther S., Baginski S., Kissel H., Reinke P., Krüger D.H., Will H., Meisel H. (1996). Accumulation and persistence of Hepatitis B virus core gene deletion mutants in

renal transplant patients are associated with end-stage liver disease. *Hepatology* 24, 751 – 758.

Günther S., Sommer G., Iwanska A., Will H. (1997). Heterogeneity and common features of defective Hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology* 238: 363-371.

Günther S., Fischer L., Pult I., Sterneck M., Will H. (1999). Naturally occurring variants of Hepatitis B virus. *Adv Vir Research*: 52:25-137.

Gunther S., Piwon N., Jung A., Iwanska A., Schmitz H., Will H. (2000). Enhanced replication contributes to enrichment of Hepatitis B virus with a deletion in the core gene. *Virology* 273, 286-299.

Heise T., Guidotti L.G., Cavanaugh V.J., Chisari F.V. (1999a). Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice. *J Virol* 73(1): 474-481.

Heise T., Guidotti L.G., Chisari F.V. (1999b). La autoantigen recognizes a predicted stem-loop in Hepatitis B virus RNA. *J Virol* 73(7): 5767-5776.

Heise T., Guidotti L.G., Chisari F.V. (2001). Characterization of nuclear RNases that cleave Hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. *J Virol* 75(15): 6874-6883.

Hosono S., Tai P.C., Wang W., Ambrose M., Hwang D.G. et al. (1995). Core antigen mutations of human hepatitis B virus in hepatomas accumulate in MHC class II-restricted T cell epitopes. *Virology* 212(1): 151-62.

Hsu H.C., Su I.J., Lai M.Y., Chen D.S., Chang M.H., Chuang S.M., Sung J.L. (1987). Biologic and prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expressions in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 5(1):45-50.

Hu Z., Zhang Z., Doo E., Coux O., Goldberg A.L., Liang T.J. (1999). Hepatitis B Virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 73(9), 7231-7240.

Huang M., Summers J. (1991). Infection initiated by the RNA pregenome of a DNA virus. *J Virol* 1991; 65 (10): 5435-5439.

Kann M., Bischof A., Gerlich W.H. (1997): In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* 1310-1316.

Kann M., Sodeik B., Vlachou A., Gerlich W.H., Helenius A. (1999). Phosphorylation-dependent binding of Hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 145 (1), 45-55.

Kim J.H., Kang S., Kim J., Ahn B.Y. (2003). Hepatitis B virus core protein stimulates the proteasome-mediated degradation of viral X protein. *J Virol* 77, 7166-7173.

Kondo T., Suda T., Fukuyama H., Adachi M., Nagata S. (1997). Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nature medicine* 3(4): 409-413.

Koschel M., Thomssen R., Bruss V. (1999). Extensive mutagenesis of the Hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation. *J Virol* 73, 2153 – 2160.

Krenzer R. (2001). MD thesis. Humboldt University Berlin.

Lenhoff R.J., Luscombe D.A., Summers J. (1999). Acute liver injury following infection with a cytopathic strain of duck hepatitis B virus. *Hepatology* 29 (2): 563-571.

Liao W., Ou J.H. (1995). Phosphorylation and nuclear localization of the Hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J Virol* 69(2): 1025-1029.

Liljestrom, P., Garoff, H. (1991a). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)* 9, 1356-1361.

Liljeström P., Garoff H. (1991b). Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest Virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol* 65(1): 147-154.

Liljeström P., Lusa S., Huylebroeck D., Garoff H. (1991c): In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest Virus: the small 6.000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J Virol* 65(8): 4107-4113.

Liljestrom, P. (1994). Alphavirus expression systems. *Curr Opin Biotechnol* 5, 495-500.

Lingappa J.R., Martin R.L., Wong M.L., Ganem D., Welch W.J., Lingappa V.R. (1994). A eukaryotic cytosolic chaperonin is associated with a high molecular weight intermediate in the assembly of hepatitis B virus capsid, a multimeric particle. *J Cell Biol* 125, 99- 111.

Lundstrom K., Rotmann D., Hermann D., Schneider E.M., Ehrenguber M.U. (2001). Novel mutant Semliki Forest virus vectors: gene expression and localization in neuronal cells. *Histochem Cell Biol*, 115: 83-91.

Lundstrom, K. (2005). Biology and application of alphaviruses in gene therapy. *Gene Ther* 12 Suppl 1, S92-S97.

Maini M.K. Boni C., Lee C.K., Larrubia J.R., Reignat S. et al. (2000). The role of virus-specific CD8+ cells in liver damage and viral control during persistent Hepatitis B virus infection. *J Exp Med*. 1269-1280.

Marinos G., Torre F., Günther S., Thomas M.G., Will H., Williams R., Naoumov N.V. (1996). Hepatitis B virus variants with core gene deletions in the evolution of chronic Hepatitis B infection. *Gastroenterology* 111, 183 – 192.

McClary H., Koch R., Chisari F.V., Guidotti L.G. (2000). Relative sensitivity of Hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 74(5): 2255-2264.

Melegari M., Wolf S.K., Schneider R.J. (2005). Hepatitis B virus replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 79(15): 9810-9820.

Meuleman P., Libbrecht L., Wieland S., De Vos R., Habib N. et al. (2006). Immune Suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the Hepatitis B virus. *J Virol* 80(6): 2797-2807.

Missale G., Redeker A., Person J., Fowler P., Guilhot S., Schlicht H.J., Ferrari C., Chiari F.V. (1993). HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J Exp Med* 177(3), 751-62.

Mondelli M., Tedder R.S., Ferns B., Pontisso P., Realdi D., Alberti A. (1986): Differential distribution of hepatitis B core and E antigens in hepatocytes: analysis by monoclonal antibodies. *Hepatology*: 6(2): 199-204.

Nakamoto Y., Guidotti L.G., Kuhlen C.V., Fowler P., Chisari F.V. (1998). Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med* 188: 341-350.

Okamoto H., Wang Y., Tanaka T., Machida A., Miyakawa Y., Mayumi M. (1993). Trans-complementation among naturally occurring deletion mutants of Hepatitis B virus and integrated viral DNA for the production of viral particles with mutant genomes in hepatoma cell lines. *J Gen Virol* 74, 407-414.

Pante N., Kann M. (2002). Nuclear Pore Complex is able to transport macromolecules with diameters of ~ 39 nm. *Molecular biology of the cell* 13: 425-434.

Pasquetto V., Wieland S., Chisari F. (2000). Intracellular Hepatitis B virus nucleocapsids survive cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J Virol* 74(20):9792-9796.

Penna A., Chisari FV, Bertolotti A, Missale G, Fowler P. et al. (1991). Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 174(6): 1565-70.

Perri S., Driver D.A., Gardner J.P., Sherrill S., Belli B.A. Dubensky T.W., Polo J.M. (2000): Replicon vectors derived from Sindbis virus and Samliki Forest virus that establish persistent replication in host cells. *J Virol*, 74 (20): 9802-7.

Preikschat P., Meisel H., Will H., Günther S. (1999a). Hepatitis B virus genomes from long-term immunosuppressed virus carriers are modified by specific mutations in several regions. *J Gen Vir* 80:2685-2691.

Preikschat P., Borisova G., Borschukova O., Dislers A., Mezule G., Grens E., Krüger D., Pumpens P., Meisel H. (1999b). Expression, assembly competence and antigenic properties of hepatitis B virus core gene deletion variants from infected liver cells. *J Gen Virol* 80, 1777 – 1788.

Preikschat P., Kazaks A., Dislers A., Pumpens P., Krüger D., Meisel H. (2000). Interaction of wild-type and naturally occurring deleted variants of hepatitis B virus core polypeptides leads to formation of mosaic particles. *FEBS Lett* 478, 127 – 132.

Preikschat P., Gunther S., Reinhold S., Will H., Budde K., Neumayer H.H., Kruger D.H., Meisel H. (2002). Complex HBV populations with mutations in core promoter, C gene, and pre-S region are associated with development of cirrhosis in long-term renal transplant recipients. *Hepatology* 35:466-477.

Pumpens P., Grens E. (1999): Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Letters*: 442: 1-6.

Rabe B, Vlachou A, Pante N, Helenius A, Kann M (2003). Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. PNAS 100: 9849-9854.

Riezebos-Brilman, A., de, M. A., Bungener, L., Huckriede, A., Wilschut, J. & Daemen, T. (2006). Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. J Clin Virol 35, 233-243.

Robek M.D., Wieland S.F., Chisari F.V. (2002). Inhibition of Hepatitis B virus replication by interferon requires proteasome activity. J Virol 76(7): 3570-3574.

Robek M.D., Boyd B.S., Wieland S.F., Chisari F.V. (2003). Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. PNAS 101(6):1743-1747.

Robek M.D., Garcia M.L., Boyd B.S., Chisari F.V. (2007). Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to Hepatitis B virus. J Virol. 81(2):483-91.

Roingard P., Romet-Lemonne A.L., Leturcq D., Goudeau A., Essex M. (1990). Hepatitis B virus core antigen (HBc Ag) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect. Virol 179, 113-120.

Roseman A.M., Berriman R.A. Wynne S.A., Butler G., Crowther R.A. (2005). A structural model for maturation of hepatitis B virus core. PNAS 102(44): 15821-15826.

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. Cold Spring Harbor.

Seeger C., Mason W.S. (2000): Hepatitis B Virus Biology (Microbiology and Molecular Biology Reviews, Mar. 2000, p. 51 – 68)

Sijts A., Ruppert T., Rehmann B., Schmidt M., Koszinowski U., Kloetzel P.M. (2000). Efficient generation of a Hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. J Exp Med 3, 503-513.

Sjoberg E.M., Suomalainen M., Garoff H. (1994): A significantly improved Semliki Forest virus expression system based on translation enhancer segments from the viral capsid gene. *Biotechnology*, 12(11): 1127-31.

Smerdou C., Liljeström P. (1999): Two-Helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest Virus particles. *J Virol*: 1092-1098.

Strauss E.G., Strauss J.H. (1986). Structure and replication of the alphavirus genome, p. 35-90. In S.S. Schlesinger and M.J. Schlesinger (ed.), *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press, New York.

Tsai S.L., Chen M.H., Yeh C.T., Chu C.M., Lin A.N., Chiou F.H., Chang T.H., Liaw Y.F. (1996). Purification and characterisation of a naturally processed Hepatitis B virus peptide recognized by CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 97(2), 577-584.

Tsui L.V., Guidotti L.G., Ishikawa T., Chisari F. (1995). Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12398-12402.

Wahlfors, J. J., Zullo, S. A., Loimas, S., Nelson, D. M. & Morgan, R. A. (2000). Evaluation of recombinant alphaviruses as vectors in gene therapy. *Gene Ther* 7, 472-480.

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

Wieland S.F., Guidotti L.G., Chisari F.V. (2000). Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in Hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 74(9): 4165-4173.

Wieland S.F., Vega R.G., Müller R., Evans F.E., Hilbush B. et al. (2003). Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes. *J Virol* 77(2): 1227-1236.

Will H., Reiser W., Weimer T, Pfaff E., Büscher M., Sprengel R., Cattaneo R., Schaller H. (1987). Replication strategy of human Hepatitis B virus. *J Virol* 61 (3): 904-911.

Wynne S.A., Crowther R.A., Leslie A.G.W. (1999). The crystal structure of the human Hepatitis B Virus capsid. *Molecular Cell*: 3, 771 – 780.

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

Yeh C.T., Sunny W.W., Fung Y.K., Ou J.H. (1993): Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6459-6463.

Yuan T.-T., Lin M.-H., Qiu S.M., Shih C. (1998a). Functional characterization of naturally occurring variants of human Hepatitis B virus containing the core internal mutation. *J Virol* 72, 2168 – 2176.

Yuan T.-T., Lin M.-H., Chen D.-S., Shih C. (1998b). A defective interference-like phenomenon of human Hepatitis B virus in chronic carriers. *J Virol* 72, 578-584.

Zajakina, A., Kozlovska, T., Bruvere, R., Aleksejeva, J., Pumpens, P. & Garoff, H. (2004). Translation of hepatitis B virus (HBV) surface proteins from the HBV pregenome and precore RNAs in Semliki Forest virus-driven expression. *J Gen Virol* 85, 3343-3351.

Saīsinājumi

ask	aminoskābe
BHK	kāmju nierēs šūnu kultūra (baby hamster kidney)
cccDNA	kovalenti noslēgta cirkulārā DNS
CID	Kora iekšējās delēcijas
ESLD	Aknu saslimšanas galējā fāze
h	stunda
HBc	Hepatīta B kors
HBV	Hepatīta B vīruss
HRP	mārrutku peroksidāze
Huh	cilvēka hepatomas šūnu līnija
IP	imunoprecipitācija
kDA	kilodaltoni
Mab	monoklonālās antivielas
PAGE	elektroforēze poliakrilamīda gēlā
pg	pregenoms
PVDF	polivinilidēndifluorīds
recSFV	rekombinantas SFV daļiņas
S	svedbergi
SDS	nātrija dodecilsulfāts
SDS PAGE	elektroforēze poliakrilamīda gēlā nātrija dodecilsulfāta klātbūtnē
SFV	Semliki Forest vīruss
wt	dabīgais

Pateicības

Šis darbs tika izstrādāts Proteīnu inženierijas laboratorijā, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Rīgā, Latvijā un Virusoloģijas institūtā, Universitātes Šarite klinikā, – Berlīnē, Vācijā.

Es vēlos pateikties šādām personām:

- profesoram Paulam Pumpēnam par viņa zinātnisko un morālo atbalstu un iedrošinājumu,
- Dr.habil.Biol Tatjanai Kozlovskai par zinātnisko atbalstu un manis uzņemšanu savā darba grupā,
- Dr.Biol Annai Zajakinai, Jekaterinai Aleksejevai, Ārijai Osei un Irēnai Timofējevai par palīdzību un draudzīgu atmosfēru,
- Dr.Biol Anatolijam Šaripo par zinātnisko palīdzību,
- Dr.Med Rutai Brūverei un Natālijai Gabruševai par imunokrāsošanu,
- Dr.habil.Biol Veltai Osei par elektronu mikroskopijas analīzēm,
- kā arī Dr.Biol Irīnai Sominskai un viņas grupai, Dr.Biol Andrim Dišleram un viņa grupai un Dr.Biol Dacei Skrastiņai.

Berlīnē es vēlos pateikties Heikei Lerchai par tehnisko palīdzību un Dr.Med Helgai Meizelei par projekta uzsākšanu.