

**GENOM- UND EXPRESSIONSANALYSE  
DES HEPATITIS-B-VIRUS IN  
HEPATOZYTENKULTUREN  
VON TUPAIA BELANGERI**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt  
von  
**Mehriar Aliakbari**  
aus  
Teheran/Iran

Gießen 2006

**Aus dem Institut für  
Medizinische Virologie**

**Direktor: Prof. Dr. phil. nat. Dr. h. c. Wolfram Gerlich  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Gerlich**

**Gutachter: HSD Dr. M. Niepmann**

**Tag der Disputation: 14.02.2007**

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Verlauf der Hepatitis-B-Infektion	1
1.2	Hepadnaviren	3
1.3	Die Struktur des Hepatitis-B-Virus	4
1.4	Genomorganisation und virale Proteine	6
1.5	Transkription und Expression viraler Proteine	8
1.6	Replikation des Hepatitis-B-Genoms	9
1.7	Ansätze und Ziele dieser Arbeit	11
<b>2.</b>	<b>Materialien</b>	<b>13</b>
2.1	Chemikalien	13
2.2	Puffer	13
2.3	Zellkulturmedium	14
2.4	Antikörper	15
2.5	Zellkulturen	16
2.6	Leberproben	17
2.7	Hepatitis-B-Viruspräparation	17
2.8	Plasmide	18
2.9	Primer und Hybprobes	18
2.10	Längenstandards	19
2.11	Enzyme	19
2.12	Geräte	20
2.13	Verbrauchsmaterialien	20

---

<b>3. Methoden</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Methoden der Zellkultur</b>	<b>21</b>
3.1.1 Kultivierung von Hepatozytenlinien	21
3.1.2 Konservierung von Hepatozytenlinien	21
3.1.3 Präparation und Kultivierung von primären Tupaia Hepatozyten	21
3.1.4 Infektion von primären Tupaia Hepatozyten Kulturen mit HBV	23
3.1.5 Hemmung der Infektion mittels Antikörper	24
3.1.6 Kinetik der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten über die ersten 8 Tage	25
3.1.7 Einfrieren von primären Tupaia Hepatozyten	26
3.1.8 Auftauen von primären Tupaia Hepatozyten	26
3.1.9 Homogenisieren von Leberzellen aus Zellkultur	26
3.1.10 Homogenisieren von humanen Leberstückchen	27
<b>3.2 Immunologische Methoden</b>	<b>27</b>
3.2.1 Nachweis von HBsAg (ELISA)	27
3.2.2 Nachweis von HBeAg	28
<b>3.3 Aufreinigung von Hepatitis B Virionen aus dem Plasma eines chronisch infizierten Patienten</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Isolierung replikativer Intermediate des HBV</b>	<b>30</b>
3.4.1 cccDNA Isolierung mittels Hirth-Extraktion	30
3.4.2 Gesamt-mRNA Isolierung	30

---

<b>3.5</b>	<b>Polymeraseketten-Reaktion (PCR)</b>	<b>31</b>
3.5.1	real-time PCR der cccDNA	31
3.5.2	real-time PCR der cccDNA von HBV	33
3.5.3	real-time PCR der X-Region von HBV	34
3.5.4	real-time Reverse Transkription PCR der viralen X-Region von HBV	34
<b>3.6</b>	<b>Agarosegel-Elektrophorese der PCR Produkte</b>	<b>35</b>
<b>3.7</b>	<b>Aufreinigung von DNA-Fragmenten im low-melting Agarosegel</b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimierung der Detektion der cccDNA</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV</b>	<b>50</b>
4.2.1	Bildung der cccDNA	50
4.2.2	Bildung der HBV mRNA	52
<b>4.3</b>	<b>Neutralisation der HBV Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen</b>	<b>55</b>
<b>4.4</b>	<b>Kinetik der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV</b>	<b>59</b>
4.4.1	Zeitpunkt des Auftretens und Verlauf der Replikation von HBV Replikationsintermediaten (cccDNA und Gesamt-RNA)	59

---

<b>4.4.2</b>	<b>Zeitpunkt des Auftretens und Sekretionsverlauf viraler Proteine (HBsAg und HBeAg)</b>	<b>62</b>
<b>4.5</b>	<b>Bestimmung der cccDNA in Biopsieproben aus HBV-Infizierten Patienten</b>	<b>62</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>Optimierung der Detektion der cccDNA</b>	<b>66</b>
<b>5.2</b>	<b>Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV</b>	<b>67</b>
<b>5.3</b>	<b>Neutralisation der HBV Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen</b>	<b>69</b>
<b>5.4</b>	<b>Kinetik der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV</b>	<b>70</b>
<b>5.5</b>	<b>Bestimmung der cccDNA in Biopsieproben aus HBV-Infizierten Patienten</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>81</b>
<b>10.</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Anti-	Antikörper gegen
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ccc DNA	covalently closed circular Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cont	continuous
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DR1 und 2	Direct Repeat 1 und 2
ds	double stranded
DTT	Dithiothreitol
E1 und 2	Enhancer 1 und 2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
Fa.	Firma
FKS	fötale Kälberserum

## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GE	Genomequivalente
GiHBV	Gibbon Hepatitis B Virus
GoHBV	Gorilla Hepatitis B Virus
GSHV	Groundsquirrel Hepatitis Virus
GTHBV	Grey Teal Hepatitis B Virus
h	Stunde
HBe	Sezernierte Form des Hepatitis B Core-Protein
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBs	Hepatitis B surface Protein
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCC	Hepatocelluläres Karzinom
HHBV	Heron Hepatitis B Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
ID	Identifikationsnummer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC	LightCycler
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
μ	mikro
M	Molar
m	milli
max.	maximal
MDHBV	Maned Duck Hepatitis B Virus

## Abkürzungsverzeichnis

---

mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHBs	Middle Hepatitis B surface protein
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	nano
N-	Amino-
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
p. i.	post infektionem
POD	Peroxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pg-mRNA	prägenomische messenger Ribonukleinsäure
PRE	Post-translationales Regulatorisches Element
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription Polymerase Chain reaction
rc	relaxed circular
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
sec	Sekunde
SGHBV	Snow Goose Hepatitis B Virus
SHBs	Small Hepatitis B surface Protein
ss	single stranded
STHBV	Storch Hepatitis B Virus

## Abkürzungsverzeichnis

---

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNE	Tris-Natrium-EDTA
TP	terminales Protein
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WHO	World Health Organisation
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WMHBV	Woolly Monkey Hepatitis B Virus
z. B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

Hepatitis (Entzündungen der Leber) können durch toxische Agentien (z.B. Alkohol, Medikamente), Autoimmunreaktionen oder am häufigsten durch infektiöse Agentien hervorgerufen werden. Bei den Infektionserregern kann es sich um Bakterien (z.B. Leptospiren), Protozoen (z.B. Amöben), Helminthen (z.B. Echinokokken) oder Viren handeln. Zu den Hepatitis hervorrufenden Viren zählen viele Vertreter der Herpes-Virus-Familie, die jedoch keinen typischen Lebertropismus haben. Die eigentlichen Hepatitis-Viren A, B, C, D und E vermehren sich dagegen bevorzugt oder ausschließlich in Hepatozyten. Diese Viren rufen zwar ähnliche Symptome hervor, unterscheiden sich aber in ihren biologischen und molekularen Eigenschaften grundlegend. Schon in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts war bekannt, dass mindestens zwei Typen von Hepatitis-Erregern existieren. Die Unterscheidung in Typ A und B betraf vorrangig klinische und epidemiologische Merkmale der Infektion, so wurde eine Typ A Hepatitis fäkal-oral übertragen, hatte 4 Wochen Inkubationszeit und wurde nicht chronisch, wohingegen der Typ B parenteral übertragen wurde, bis zu 6 Monaten Inkubationszeit hatte und häufig chronisch wurde. Typ B wurde wegen der parenteralen Übertragung auch Serum-Hepatitis genannt. Die Entdeckung der Hepatitis-A- und Hepatitis-B-Viren gelang allerdings erst in den siebziger Jahren. Bald danach stellte sich heraus, dass es noch weitere Viren gab, die Hepatitis verursachen können. Solange sie noch nicht identifiziert waren, wurden sie zunächst als „nonA, nonB“ bezeichnet. Heute unterscheidet man das Hepatitis-A-, -B-, -C-, -D- und -E-Virus.

### 1.1 Verlauf der Hepatitis-B-Infektion

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) verursacht akute und chronische Hepatitiden und trägt ursächlich zur Entstehung hepatozellulärer Karzinome bei. Mit weltweit etwa 350 Millionen chronisch HBV infizierten Menschen stellt das Hepatitis-B-Virus ein sehr bedeutendes humanpathogenes Virus dar. Beinahe die Hälfte der Weltbevölkerung hat einmal Kontakt mit dem Virus gehabt (Gerlich und Kann, 2005). Im mitteleuropäischen Raum ist der Anteil der chronisch infizierten HBV-Träger relativ gering, während er in Südostasien und in großen Teilen Afrikas bis zu 20 Prozent der Bevölkerung beträgt. In

der Liste der häufigsten Todesursachen durch Infektionen steht das Hepatitis-B-Virus an fünfter Stelle (Gerlich und Gerlich, 2005). In Deutschland wurden 2005 1.235 akute Hepatitis B Erkrankungen pro Jahr an das Robert-Koch-Institut gemeldet. Rund 0,5% der deutschen Bevölkerung sind chronische Träger, rund 7% hatten Kontakt mit dem Virus.

Das epidemische Auftreten von Gelbsucht ist schon im Altertum beschrieben worden, die Infektiosität wurde allerdings erst 1885 erkannt (Lührmann, 1885). Der Erreger ist schließlich 1963, als „Australia-Antigen“, im Blut eines australischen Ureinwohners entdeckt worden (Blumberg et al., 1967). 1970 fand Dane im Elektronenmikroskop weitere Partikel, die das Australia-Antigen auf ihrer Oberfläche trugen („Dane-Partikel“). Aus diesen Partikeln konnte 1971 June Almeida mit Detergenzien sogenannte Core-Partikel freilegen. In den darauf folgenden Jahren wurde die DNA-Polymerase (Kaplan et al., 1973) und die dazugehörige DNA (Robinson, 1977), die sich innerhalb des Core-Partikels befindet, entdeckt. Daraufhin wurde das Australia-Antigen als Hepatitis-B-Surface-Antigen und die Dane-Partikel als Hepatitis-B-Virus benannt.

Hepatitis-B-Virus wird perinatal, parenteral und sexuell übertragen. Das Virus ist in nahezu allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen, z.B. Tränen, Speichel, Liquor, Urin, Magensaft und Muttermilch. Die Infektiosität ist viel höher als beim Humanen Immundefizienz Virus (HIV). Schon weniger als 0,1 µl Blut kann für eine Übertragung ausreichend sein. Der Verlauf der HBV Infektion kann sehr variabel sein. Die Inkubationszeit beträgt sechs Wochen bis sechs Monaten, inapparente oder subklinische Verläufe sind häufig. Das Prodromalstadium dauert Tage bis Wochen und geht mit allgemeinem Krankheitsgefühl, Emesis und Nausea, Inappetenz, Fieber, Oberbauchschmerzen und Arthralgien ein. Danach beginnen leberspezifische Symptome wie Leberdruckschmerz durch Hepatomegalie, Ikterus der Konjunktiven und der Haut oder Entfärbung des Stuhls. Da das HBV selbst nicht zytopathogen ist, wird der klinische Verlauf durch die ausgelöste Immunreaktion bestimmt (Chisari und Ferrari, 1995). 90% der Hepatitis-B-Infektionen heilen spontan und folgenlos aus, davon bleiben zwei Drittel der Patienten asymptomatisch, bei einem Drittel zeigt sich klinisch eine akute Hepatitis. Bei weniger als einem Prozent kommt es zu einer fulminanten Hepatitis. Bei 5-10% der Infizierten kommt es zur so genannten HBsAg

Persistenz oftmals ohne akute Erkrankung. Bei etwa 20% der chronischen Infizierten entsteht eine chronische Hepatitis und im Gefolge oft eine Leberzirrhose oder ein primäres Leberzellkarzinom (WHO, 2004).

## 1.2 Hepadnaviren

Das HBV gehört zur Virusfamilie der so genannten Hepadnaviridae. „Hepa“ für Leber als Zielorgan und „DNA“ als Beschreibung für das virale Genom. Sie wird in zwei Gattungen eingeteilt. Dem Genus Orthohepadnavirus werden die Virusarten des Menschen (HBV), der Hörnchen (GSHV und ASHV), der Wollaffe (WMHBV) und des Waldmurmeltiers (WHV) zugeteilt. In der Gattung Avihepadnaviren sind nur Vogelviren enthalten, dabei sind die wichtigsten die Viren der Enten (DHBV) und des Graureihers (HHBV) (Tab. 1.1).

Hepadnaviren zeichnen sich durch einen starken Lebertropismus und ein enges Wirtsspektrum aus (Robinson, 1980). Sie zeigen viele biologische, morphologische und molekulare Gemeinsamkeiten und besitzen ein partiell doppelsträngiges DNA-Genom. Dabei zeigen sie keine Zytotoxizität und vermehren sich nur in differenzierten Leberzellen. In den infizierten Hepatozyten werden nicht nur infektiöse Virionen gebildet, sondern auch nicht infektiöse subvirale Partikel.

**Tabelle 1.1: Übersicht über die bekannten Hepadnaviren**

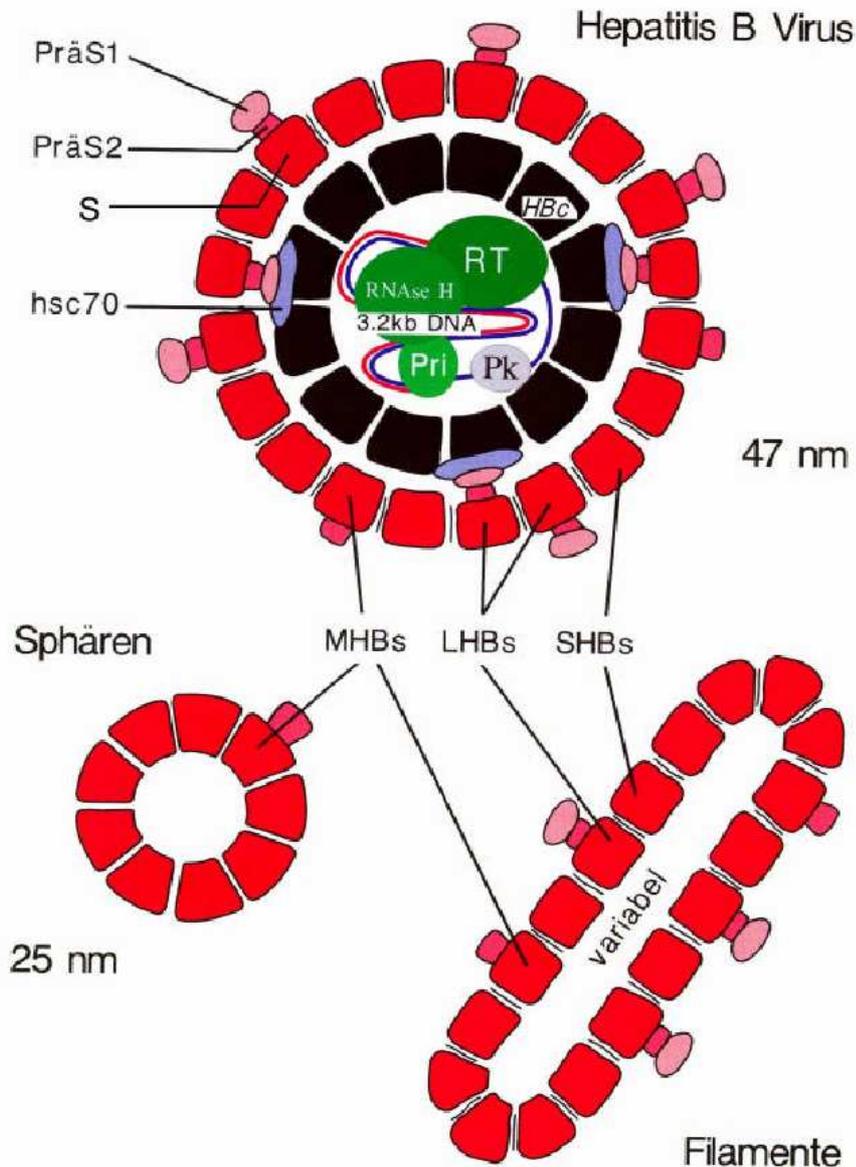
Orthohepadnavirus	Abkürzung	Wirt	Zitat
Menschen Hepatitis B Virus	HBV	Mensch <i>Homo sapiens</i>	Dane et al., 1970 [x]
Chimpanzee HepatitisBVirus	ChHBV	Schimpanse <i>Pan troglodytes</i>	Vaudin et al., 1988 [n]
Gibbon Hepatitis B Virus	GiHBV	Weißhandgibbon <i>Hylobates lar</i>	Norder et al., 1996 [m]
Orang-Utan Hepatitis B Virus	OuHBV	Orang-Utan <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>	Warren et al., 1999 [h]
Gorilla Hepatitis B Virus	GoHBV	Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>	Grethe et al., 2000 [i]
Woolly Monkey Hepatitis B Virus	WMHBV	Wollaffe <i>Lagothrix lagotricha</i>	Lanford et al., 1998 [g]
Woodchuck Hepatitis Virus	WHV	Waldmurmeltier <i>Marmota monax</i>	Summers et al., 1978 [d]

Ground Squirrel Hepatitis Virus	GSHV	Kalifornisches Erdhörnchen <i>Spermophilus beecheyi</i>	Marion et al., 1980 [o]
Arctic Squirrel Hepatitis Virus	ASHV	Arktisches Hörnchen <i>Spermophilus parryi kennicotti</i>	Testut et al., 1996 [a]
Avihepadnavirus	Abkürzung	Wirt	Zitat
Duck Hepatitis B Virus	DHBV	Pekingente <i>Anas domesticus</i>	Mason et al., 1980 [r]
Grey Teal Hepatitis B Virus	GTHBV	Weißkehlente <i>Anas gibberifrons gracilis</i>	Li et al., 1998 [w]
Heron Hepatitis B Virus	HHBV	Graureiher <i>Adrea cinerea</i>	Sprengel et al., 1988 [s]
Maned Duck Hepatitis B Virus	MDHBV	Mähnenente <i>Chemometta jubata</i>	Li et al., 1998 [c]
Ross Goose Hepatitis Virus	RGHV	Zwergschneegans <i>Anser rossi</i>	Shi et al., 1993 [d]
Snow Goose Hepatitis B Virus	SGHBV	Schneegans <i>Anser caerulescens</i>	Chang et al., 1999 [b]
Cranes Hepatitis B Virus	CHBV	Demoiselle cranes <i>Anthropoides virgo</i>	Prassolov et al, 2003
Stork Hepatitis B Virus	STHBV	Weißer Storch <i>Ciconia ciconia</i>	Pult et al., 1998 [y]

### 1.3 Die Struktur des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus ist ein komplexes DNA-Virus, das sich im Elektronenmikroskop, im wasserfreien Zustand, als ca. 45 nm durchmessendes, sphärisches Partikel präsentiert (Dane, 1970). Das mit ca. 34 nm messende Zentrum, das zentrale Nukleokapsid, das als Core (HBc oder HBcAg) bezeichnet wird, ist von einer äußeren Hülle aus Proteinen, Glykoproteinen und Lipiden umgeben (Abb. 1.1). In dieser ca. 7 nm breite Hülle, die als Surface (HBs oder HBs-Ag) bezeichnet wird, sind drei unterschiedliche HBs-Proteine verankert. Dabei handelt es sich um das Large-(LHBs), Middle-(MHBs), und Small-(SHBs) Protein. Das LHBs Protein besteht aus der S-Domäne, PräS2- und PräS1-Domäne, während das MHBs Protein die S- und PräS2-Domäne umfasst und das SHBs Protein nur aus der S-Domäne gebildet wird. Im Serum von Hepatitis-B-infizierten Menschen sind neben den HBV-Virionen auch eine große Menge subvirale Partikel zu finden. Da es sich um Hüllproteine ohne Nukleinsäure handelt, sind diese Partikel nicht

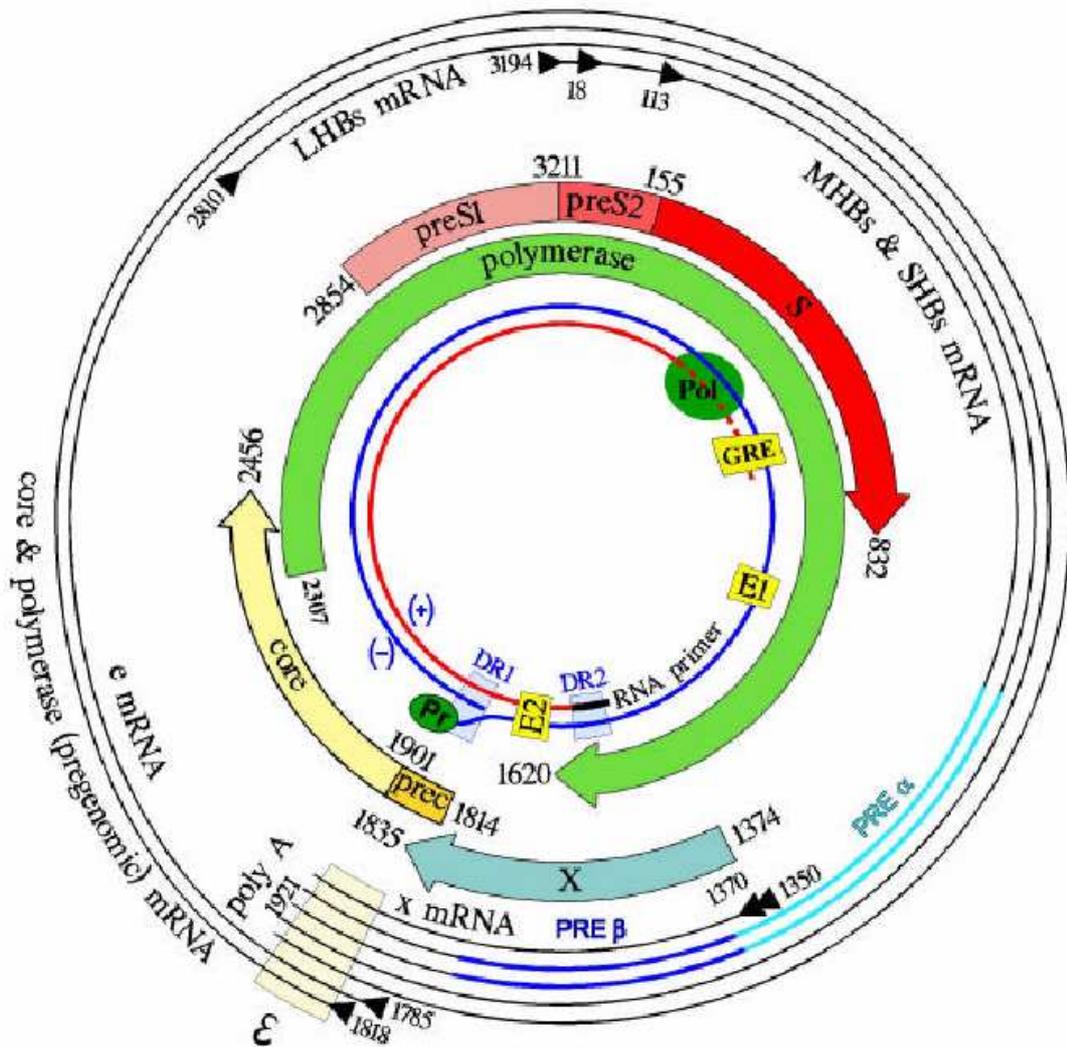
infektiös. Sie kommen in zwei verschiedene Formen vor. Die sphärischen Partikel haben einen Durchmesser von 17 bis 25 nm, während sich die so genannte Filamente bei gleichem Durchmesser durch eine variable Länge unterscheiden (Robinson, 1977).



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus (HBV) und seiner subviralen Partikel. Die obere Bildhälfte zeigt das HBV mit seiner Hülle (S), die aus drei Surface-Proteine besteht. LHBs, MHBs und SHBs: Die Large- (großes-), Middle- (mittleres-) und Small- (kleines-) Hepatitis B Surface Proteine, variieren nur im Aminoterminus um die Bereiche PräS1 und PräS2. Die Hülle umschließt das Viruskapsid, das aus dem Core-Protein (HBc) besteht. In seinem Inneren liegt das virale Genom (3,2 kb). Assoziiert daran befindet sich ein terminales Protein mit Funktionsdomänen einer viralen Polymerase (RT) und Primase-Anteil (Pri) sowie eine Proteinkinase (PK). Die untere Bildhälfte zeigt die elektronenmikroskopisch sichtbaren, genomfreien, sphärischen und filamentösen Subpartikel (nach Gerlich und Kann modifiziert).

## 1.4 Genomorganisation und virale Proteine

Das HBV besitzt eines der kleinsten Genome, die bei Viren gefunden wurden. Das Genom liegt als zirkuläres und partiell doppelsträngiges DNA-Molekül vor (Summers et al., 1975). Der Minusstrang, der im Replikationsverlauf in eine mRNA transkribiert wird, ist vollständig und hat eine konstante Länge mit definierten 5`- und 3`-Enden (Hruska et al., 1977; Landers et al., 1977). Er beinhaltet vier offene Leserahmen (ORF, open reading frame), die sich teilweise überlappen und durch alternative Nutzung von Startcodons für mehrere Proteine codieren können: Core-, Surface-, Polymerase- und X-Protein. Dadurch ist auch die Komplexität des HBV trotz seiner geringen Genomgröße zu erklären. An seinem 5`-Ende besitzt der Minusstrang ein kovalent gebundenes terminales Protein (Gerlich und Robinson, 1980), die virale Polymerase (Bartenschlager und Schaller, 1988). Der Minusstrang ist nicht kovalent geschlossen und besitzt eine terminale Redundanz von 8 bis 10 Nukleotiden. Der Plusstrang ist unvollständig und hat eine variable Länge von 1.000 bis 2.500 Nukleotiden. Daher weist der Plusstrang ein definiertes 5`-Ende, aber ein variables 3`- Ende auf. Er codiert nicht für virale Genprodukte und wird auch nicht transkribiert. Am 5`-Ende des Plusstrangs findet man ein 17 bis 19 Nukleotide langes RNA Stück mit einer Cap-Struktur (Seeger et al., 1986). Besonderes Merkmal des Hepadnavirusgenom sind die direkten Wiederholungssequenzen (die so genannten direct repeats, DR1 und DR2), die eine Länge von je 11 Basenpaaren aufweisen und ca. 225 Basenpaare voneinander entfernt sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation. Das Genom der Hepatitis-B-Viren besitzt je nach Subtyp eine unterschiedliche Länge. Die Genotypen B, C, F und H haben 3.215 Nukleotide und der HBV Genotyp D zeigt wegen einer Deletion nur 3.182 Nukleotiden. Das Genom des Genotyps A weist im Core-Gen bzw. der N-terminalen Protein-Region der Polymerase eine Insertion von 6 Nukleotiden auf und kommt dadurch auf eine Länge von 3.221 Nukleotiden. Der Genotyp E hat eine Länge von 3.212 Nukleotiden und das größte Genom mit einer Länge von 3.248 Nukleotiden besitzt Genotyp G. Die zirkuläre Struktur des Genoms wird durch Basenpaarung des Minusstrangs und dem Plusstrang ermöglicht.



**Abbildung 1.2: Gliederung des HBV-Genoms und Darstellung der resultierenden Genprodukte.** Die inneren beiden Ringe stellen die partiell doppelsträngige DNA dar. An diese ist die virale Polymerase über die Primase gebunden. Die Blockpfeile kennzeichnen die vier viralen Leserahmen. Die dünnen Pfeile symbolisieren die virale Transkripte, die durch Nutzung alternativer Startcodons synthetisiert werden. Alle transkribierten mRNA's sind koterminale.

Pol. Aktives Zentrum der DNA-Polymerase; GRE. Glucocorticoid Response Element; E1, E2: Enhancer 1 und 2; DR1 und DR2: Direct Repeat 1 und 2; PR: Primase-Domäne der Polymerase; PRE  $\alpha$  und PRE  $\beta$ : Post-translational Regulatory Elements;  $\epsilon$  =Verpackungs- (encapsidation) Signal; (-)= DNA-Minusstrang; (+)= DNA-Plusstrang;  $\blacktriangle$  = Transkriptionsstartpunkte, (nach Kann und Gerlich, 1998, modifiziert)

## 1.5 Transkription und Expression der viralen Proteine

Das Genom wird nach der Penetration des Virus in den Zellkern transportiert, wo durch zelluläre Reparaturenzyme der Einzelstrangbereich des Virusgenoms zum Doppelstrang komplettiert wird (Köck u. Schlicht, 1993). Danach werden die Primärstrukturen an den 5'-Enden beider Stränge und der überlappende terminale Bereich des Minusstranges entfernt und anschließend verknüpft eine zelluläre DNA-Ligase die freien Enden beider Stränge miteinander. Hierdurch entsteht ein zirkuläres, kovalent geschlossenes DNA-Molekül (cccDNA), das extrachromosomal mit Nukleosomen komplexiert vorliegt (Bock et al., 1994; Newbold et al., 1995). Die Synthese der viralen mRNA wird von der RNA-Polymerase II im Kern der Wirtszelle durchgeführt. Die mRNAs des HBV haben die typische Struktur einer eukaryontischen RNA, die sich durch die Cap-Struktur am variablen 5'-Ende zeigt und ein gemeinsames, polyadenyliertes 3'-Ende haben. Alle Transkripte haben weiterhin gemeinsam, dass sie sogenannte posttranskriptionale regulative Elemente (PRE a und b) besitzen (Nukleotide 1151 bis 1684 bei HBV Genotyp A). Diese Elemente sind in der Funktion dem Rev-responsiblen Element von HIV funktionell homolog (Huang u. Liang, 1993), indem sie als cis-agierende Elemente den Zellkernexport der mRNAs erleichtern und deren Akkumulation im Zytoplasma fördern, ohne dass es zum Spleißen kommt (Zang, 1998).

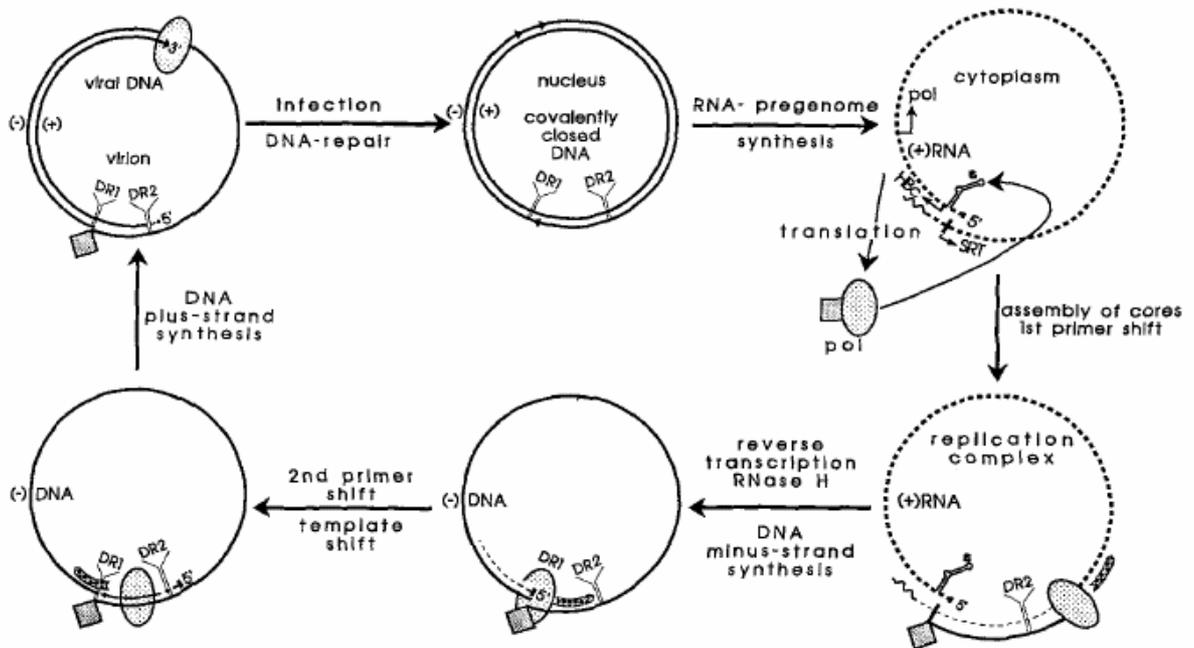
Es lassen sich drei Hauptgruppen von viralen Transkripten unterscheiden (Cattaneo et al., 1983 u. 1984; Standring et al., 1984; Will et al., 1987). Die eine hat eine Länge von 2,1 bis 2,4 Kilobasen (kb) und kodiert für die drei Oberflächenproteine (Abb.1.2). Eine 2,4 kb lange mRNA kodiert für das LHBs-Protein. Ungefähr 30 Nukleotide stromaufwärts der Cap-Stelle liegt der PräS1-Promotor (Will et al., 1987), der hoch leberspezifisch wirkt. Die MHBs- und SHBs-Proteine werden durch etwas kürzere mRNAs mit zwei verschiedenen Startpunkten kodiert. Je nachdem, ob das Transkriptionsstartsignal oberhalb oder unterhalb des MHBs-Startpunktes benutzt wird, entsteht eine PräS2- bzw. S-mRNA. Die Transkription wird vom PräS2/S-Promotor reguliert, der sich vor dem PräS2-Start befindet und nicht leberspezifisch ist (Pourcel et al., 1982). Die zweite mRNA-Gruppe ist mit einer Länge von 3,5 kb sogar etwas größer als das virale Genom und wird daher auch als supergenomisch bezeichnet. Sie trägt zum einen die Information zur Synthese der HBc-, HBe-, Polymerase-Proteine (Enders et al., 1985; Yaginuma et al., 1987) und zum anderen stellt sie die RNA-Matrize als Vorläufer

des DNA-Genoms für den Replikationszyklus dar (Ganem u. Varmus, 1987). Die Transkription dieser RNAs wird durch Promotoren reguliert, die vor und zwischen den beiden repetitiven Sequenzen DR1 und DR2 lokalisiert sind und vorwiegend leberspezifisch wirken (Rall et al., 1983). Für eine maximale Transkriptionsaktivität sind zu dem die beiden Enhancer I (Shaul et al., 1985) und II (Yuh et al., 1992), die zwischen der Region S und dem Beginn der Region C liegen, von Bedeutung. Auch diese beiden Enhancer zeigen eine ausgeprägte Gewebespezifität (Treinin und Laub, 1987; Yuh et al., 1992). Die kleinste subgenomische RNA ist 0,9 kb groß und kodiert für das HBx-Protein (Kaneko und Miller, 1988). Die Transkription wird durch den HBx-Promotor und den Enhancer I vor dem HBx-Start reguliert (Shaul et al., 1985; Treinin und Laub, 1987). Die Funktion des HBx-Protein ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. In vitro wirkt das HBx auf viele virale und zelluläre Promotoren transaktivierend (Aufiero 1990, Zhou 1990, Henkler 1995). Dafür wird ein indirekter Mechanismus über Protein-Protein-Wechselwirkungen angenommen, da bisher noch keine HBx-spezifische DNA-Bindesequenz gefunden wurde (Maquire 1991, Ritter 1991). In Zellkulturen aktiviert HBx die HBV-Replikation (Bouchard et al., 2003). Wichtig scheinen auch die Einflüsse des Virus auf das Proteasom (Zhang et al., 2004) und auf NF-KB (Su und Schneider, 1997).

## 1.6 Replikation des Hepatitis-B-Genoms

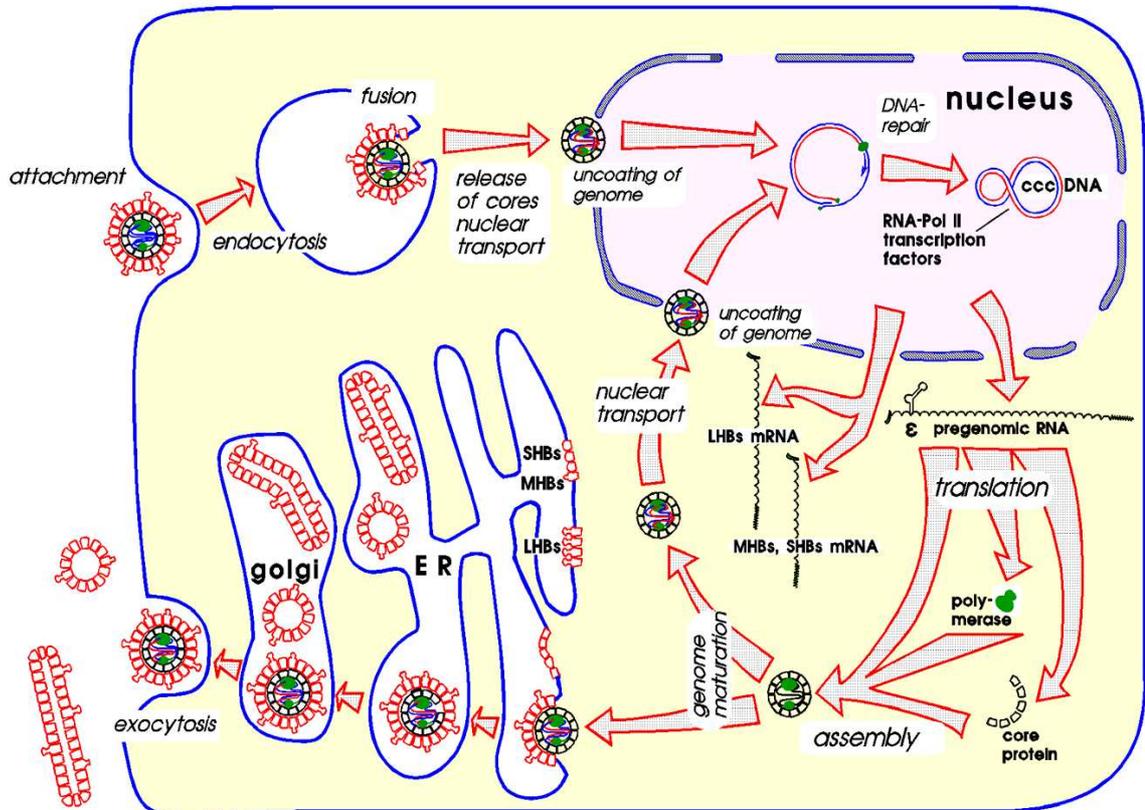
Nicht alle Stufen des Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus sind geklärt, z.B. sind das Anbinden an die Wirtszelle und die Aufnahme in diese nur unvollständig aufgeklärt. Nach Eintritt in die Wirtszelle liegt das HBV Genom innerhalb eines Tages im Zellkern vor (Kann und Gerlich, 2004). Zunächst wird der unvollständige Plusstrang durch die DNA-Polymerase vervollständigt, das RNA-Oligonukleotid abgebaut, die Polymerase entfernt und die Lücke geschlossen. So entsteht ein zirkuläres, kovalent geschlossenes DNA-Molekül, die cccDNA, die in einem zweiten Schritt in eine superhelikale Form überführt wird. Die cccDNA dient als nukleäre Matrize für die Transkription der viralen prägenomischen mRNA (pg-mRNA). Diese RNA besitzt einen Polyadenosinschwanz am 3`-Ende, sowie eine Cap-Struktur am 5`-Ende, wobei sich das Startcodon oberhalb des DR1 auf dem Minusstrang befindet. Von der pg-mRNA wird im Zytoplasma die

Polymerase und das Core-Protein translatiert. Anschließend wird die pg-mRNA zusammen mit der Polymerase in das Corepartikel verpackt. Das Corepartikel kann nun zwei Wege einschlagen. Zum einen kann die pg-mRNA im Corepartikel reverse transkribiert und in den Zellkern zurück transportiert werden (Flint et al., 2000), dort dient sie als weiteres Template für die Bildung von cccDNA, zum anderen kann die pg-mRNA im Zytoplasma die Transkription der HBV mRNAs für die Hüllproteine starten.



**Abbildung 1.3: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus.** Der Replikationszyklus beginnt mit der Komplettierung des inkompletten (+)-Stranges im Wirtskern, erst jetzt kann das Prägenom transkribiert werden. Während dieser Zeit wird im Zytoplasma bereits das virale Core-Protein synthetisiert, das durch seine DNA-Affinität einen Komplex mit dem ins Zytoplasma eingewanderten Prägenom bildet. Innerhalb dieses Corepartikels entstehen schließlich die viralen mRNAs, bzw. der (-)-Strang, an dem sich der komplementäre (+)-Strang ausbilden kann und so zum fertigen Virus wird. (-)= DNA-Minusstrang; (+)= DNA-Plusstrang; DR 1 und 2: direkt repeat 1 und 2; pol: virale Polymerase (nach Gerlich und Thomssen, 1999).

## Intracellular Life Cycle of Hepatitis B Virus



**Abbildung 1.4: Intrazellulärer Lebenszyklus des HBV.** Beginnend mit der bisher noch unbekanntem Anbindung und Aufnahme an die Wirtszelle wird das Virus in den Kern transportiert, wo nur das DNA-Genom nachweisbar ist. Nach komplexen Schritten, die der DNA Kompletierung und der Bildung des Prägenoms dienen, wird die prägenomische RNA ins Zytoplasma geschleust und dient dort als Matrix für die viralen RNAs, aus denen schließlich die verschiedenen Virusproteine synthetisiert werden. Das Prägenom wird schließlich vom HBc-Protein umschlossen und bildet zusammen mit der viralen Polymerase das Core. Dieses kann entweder in den Wirtskern zurücktransportiert werden und den Viruspool erhöhen oder mit den Hüllproteinen assemblieren und die Wirtszelle verlassen. (nach Kann und Gerlich, 1998)

### 1.7 Ansätze und Ziele dieser Arbeit

Das Hepatitis-B-Virus weist wie alle Hepadnaviren eine hohe Wirtsspezifität auf, was die Suche nach einem adäquaten Infektionsmodell für die HBV sehr schwierig macht. Bekannt ist, dass das HBV natürlicherweise sowohl den Menschen als auch den Schimpansen infiziert. Für die HBV-Forschung sind verschiedene Zelllinien etabliert

(z.B. HepG2-, Huh7-, HepG2215-Zellen). Diese Zellen stammen jedoch ausnahmslos aus Leberzelltumoren und ermöglichen ein gutes Verständnis der späten Schritte der HBV-Replikation. Für die Forschung der frühen Phasen der Infektion gab es bislang noch keine susceptible Zelllinie. Eine Ausnahme stellt die etablierte humane HepaRG-Zelllinie dar, die jedoch zum Zeitpunkt des Beginns der Doktorarbeit nicht zur Verfügung stand. Die meisten Untersuchungen früherer Infektionsschritte sind an primären, humanen Hepatozyten vorgenommen worden. Diese Hepatozyten stammen in der Regel aus Leberbiopsaten, die meist nicht in ausreichender Menge vorhanden sind und größtenteils aus pathologisch verändertem Gewebe stammen. Zudem sind Tierversuche an Schimpansen aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen nicht durchführbar.

Seit einigen Jahren ist aber bekannt, dass das ostasiatische Spitzhörnchen *Tupaia belangeri* sich mit HBV infizieren lässt. Wir konnten zeigen, dass sich Primärzellen aus Tupaia-Hepatozyten auch nach der Infektion für einige Zeit stabil halten lassen. Da ihre Herkunft nicht aus einem Tumor hervorgeht steht damit zum ersten Mal ein Versuchsmodell zur Verfügung, das den physiologischen Bedingungen im humanen Wirt entspricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand des zur Verfügung stehenden Tupaia-Tiermodells die frühen, unbekannt Phasen einer HBV Infektion genauer untersucht. Dazu wurde die Isolierung der primären Tupaia Hepatozyten und die Infektion mit HBV optimiert. Die Inhibition der Infektion durch verschiedene Antikörper kartierte den Virusbereich, der bei der Bindung des Virus relevant ist. Durch Quantifizierung der cccDNA mittels real-time PCR wurde die Infektionsrate schließlich in messbare Größen umgesetzt. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass die Methodik der Quantifizierung von cccDNA mittels real-time PCR für den Nachweis von cccDNA geeignet ist, was durch die Verwendung von Leberbiopsaten dokumentiert wurde.

Ein weiteres Ziel war, den Zeitpunkt des Auftretens und die Menge an neusynthetisiertem HBeAg und HBsAg als Hinweis auf die Virusreplikationsrate bestimmen zu können, indem eine Kinetik dieser Parameter in den ersten Tagen einer Infektion mit HBV protokolliert wurde.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Auf anderswo erworbene Produkte wird im Text hingewiesen.

### 2.2 Puffer

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage (Ionenaustauscher, Millipore, Eschborn) des Instituts (Medizinische Virologie der Universität Gießen) angesetzt.

PBS-Puffer:	137	mM	NaCl
	3,4	mM	KCl
	10	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	1,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7		
TNE-Puffer:	20	mM	Tris-HCl
	140	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	pH 7,4		
ELISA-Beschichtungs-Puffer (NaPP):	183	mM	NaCl
	8,6	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	2,2	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4		
Zell-Lysat-Puffer:	15	ml	dH <sub>2</sub> O
	1	Tablette	Tris-Buffered-Saline, pH 7,6
	750	µl	Trixon-X-100 (10%)
	75	µl	MgCl <sub>2</sub>
Hirth-Extraktions-Puffer:	0,6	%(w/v)	SDS
	10	mM	EDTA, pH 8
	5	M	NaCl

50 x TAE-Puffer:	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	mit dH <sub>2</sub> O auf 1 liter auffüllen	
6 x Agarse-Laufpuffer:	60 ml	Glycerin
	0.1 g	Bromphenolblau
	mit TAE auf 100 ml auffüllen	

## 2.3 Zellkulturmedien

D-MEM	Ausgangsmischungen der Firma Bio Whittaker, Belgien	
	19,72 g	Instamed Medium 199 Eagle
	83,2 g	Instamed RMPI 1640
	20,0 g	NaHCO <sub>3</sub>
	100 ml	L-Glutamin
	100 ml	nicht essentielle Aminosäuren
	100 ml	Antibiotika/Antimykoticum
	100 ml	Natriumpyruvat (100 mM)
	ad 9000 ml ddH <sub>2</sub> O	
	das Medium wird steril filtriert und mit CO <sub>2</sub> auf einen pH 7,0 eingestellt. Lagerung bei 4° C.	

Gefriermedium:	60%	D-MEM
(Hepatozytenlinien)	20%	Fötale Kälberserum (FKS)
	20%	Dimethylsulfoxid (DMSO)

Gefriermedium:	70%	UW-Lösung (University of Wisconsin), alternativ WILLIAMS-E-Medium oder D-MEM
(Primäre Tupaia Hepatozyten)	20%	Fötale Kälberserum (FKS)
		PAN (Biotech), Aidenbach
	10%	Dimethylsulfoxid (DMSO)

Tupaia Anheftungsmedium:	Williams-E-Medium mit Glutamax I
100 µl/ml	Gentamycin
0,25 µg/ml	Amphotericin B
10%	Fötale Kälberserum (FKS)
Tupaia Infektionsmedium:	Williams-E-Medium mit Glutamax I
100 µl/ml	Gentamycin
0,25 µg/ml	Amphotericin B
0,1%	BSA, kristallisiert
2%	Dimethylsulfoxid (DMSO)
20 mM	HEPES
Tupaia Kultivierungsmedium:	Williams-E-Medium mit Glutamax I
0,1%	BSA, kristallisiert
0,5 mg/ml	Insulin
0,5 mg/ml	Transferin
0,5µg/ml	Selen
0,4µM	Dexamethason
50 µM	Hydrocortison
20 mM	HEPES
100 µl/ml	Gentamycin
0,25 µg/ml	Amphotericin B
2%	Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das fötale Kälberserum (FKS) zur Verwendung in Zellkulturen wurde von Firma PAN (Biotech), Aidenbach, bezogen.

## 2.4 Antikörper

### Anti-S C20/2

Affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsabhängig die Aminosäuresequenz 120-160 des kleinen Hüllproteins erkennt. Er reagiert nur mit der gruppenspezifischen konformationellen Determinante *a* (persönliche Mitteilung W.H. Gerlich).

**Anti-PreS2 2-12F2**

Affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 18-24 des mittleren Hüllproteins erkennt (Sobotta et al., 2000).

**Anti-PreS2 S26**

Antikörper aus Ascites, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz 13-16 des mittleren Hüllproteins erkennt (Sominskaya et al., 1992). Der Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. P. Pumpens, Biochemisches Institut Riga, zur Verfügung gestellt.

**Anti-PreS1 MA 18/7**

Affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsunabhängig die Aminosäuresequenz DPAF 20-23 (Genotyp D) des großen Hüllproteins erkennt. Die Antikörper wurden zum Teil affinitätsgereinigt, zum Teil als Hybridoma-Überstand eingesetzt.

**2.5 Zellkulturen**

Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen erfolgten unter einer Sterilbank. Die Zellmedien und Puffer wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage der Firma Millipore angesetzt und steril filtriert oder autoklaviert.

**HepG2** (Aden et al., 1979 [1])

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um hochdifferenzierte Leberparenchymzellen aus einem primären humanen Leberzellkarzinom. Die Zellen wurden aus Biopsiematerial isoliert und enthalten nachweislich keine HBV-DNA. Ursprünglich wurde diese Zelllinie von D. Ganem, UCSF, San Francisco, USA, bezogen und seit mehreren Jahren im Institut für Medizinische Virologie, Gießen kultiviert.

**HepG2215** (Sells et al., 1987 [173])

Hierbei handelt es sich um ein Derivat der HepG2-Zelle, die mit einem Plasmid stabil transfiziert wurde, das das Resistenzgen für G418 und vier Tandemkopien des Hepatitis B Virus-Genoms (Genotyp D) trägt. Die vier HBV-Genome sind auf dem Plasmid so positioniert, dass jeweils zwei Dimere in 3'-Orientierung aneinander grenzen (3'-3').

Das Plasmid wurde an einer nicht bekannten Position chromosomal integriert. Die Zelllinie produziert hohe Titer an HBe-Ag und HBs-Ag. Außerdem können im Zellkulturüberstand 22 nm Sphären und Filamente sowie 42 nm Dane-Partikel nachgewiesen werden.

### **Primäre Tupaia Hepatozyten**

Bei diesen Zellen handelt es sich nicht um eine stabile Zelllinie. Diese Primärzellen werden aus der Leber eines asiatischen Spitzhörnchens (*Tupaia belangeri*) isoliert und in Kultur genommen. Durch verschiedene Reinigungsschritte wird der Anteil an anderen Leberzelltypen (wie Epithelzellen, Gallenzellen oder Bindegewebszellen) auf maximal 1% reguliert (siehe Methoden Teil 3.1.3). Die ausplattierten Hepatozyten werden in DMSO-haltigen Medium inkubiert. Durch den so induzierten Zellzyklusarrest sind sie teilungsunfähig. Deshalb werden diese Primärzellen für längere Versuchsreihen in einem bestimmten Medium kryokonserviert und bei Bedarf frisch ausplattiert.

## **2.6 Leberproben**

Humanes Lebergewebe von verschiedenen Patienten wurde freundlicherweise von PD Dr. Böcher vom der Medizinischen Klinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Die Entnahme des Gewebes wurde von der Ethikkommission der Universität Mainz genehmigt.

## **2.7 Hepatitis-B-Viruspräparationen**

Es standen Seren von Hepatitis-B-Virussträger zur Verfügung. Das Plasma war HBeAg und HBsAg positiv. Alle Seren und Blutplasmen wurden aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Daraus wurden gereinigte Viren hergestellt. Die Aliquots wurden jeweils nur einmalig für die jeweilige Anwendung aufgetaut. Die Seren stammen aus der Serumsammlung des Instituts für Medizinische Virologie, Gießen.

Alle Seren wurden mit den üblichen diagnostischen Screening-Verfahren auf das Vorhandensein von HCV, HBV und HIV getestet. Für die Infektionsversuche dieser Arbeit standen folgende Präparationen zur Verfügung:

P24 (ID1) :  $5,7 \times 10^{10}$  Virionen/ml

P18 (ID1) :  $2,6 \times 10^{10}$  Virionen/ml

P14 (ID259) :  $4,5 \times 10^{10}$  Virionen/ml

## 2.8 Plasmide

### pBs HBV 991 T7 Dimer

In den 2,7 kB großen prokaryonten Vektor pBlueskript II SK+ der Firma Stratagene, U.S.A., wurde ein Dimer des Hepatitis B Virus Gesamtgenoms aus pUC991 (HBV Genotyp A, Gen-Bank X51970) einkloniert. Das Genomdimer steht unter der regulatorischen Kontrolle des T7-Promotors. Das Plasmid wurde als Positivkontrolle innerhalb der PCR verwendet.

## 2.9 Primer und Hybprobes

Alle Primer und Hybprobes wurden bei TIB MOLBIOL, Berlin, bestellt. Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf den Genotyp A des Hepatitis B Virus.

Zur cccDNA-PCR:

C1 sense Primer:	5'-tgcacttcgcttcacct	(Nukleotide 1580 bis 1596)
C1 antisense Primer:	5'-aggggcatttggtggtc	(Nukleotide 2314 bis 2298)
3FL CB Hybprobe:	5'-caatgtcaacgaccgacctt-FL	(Nukleotide 1678 bis 1697)
5LC CB Hybprobes:	5'-LC Red 640-aggcmtacttcaaagactgtgtgt-PH m=A/C      k=G/T	(Nukleotide 1699 bis 1722)

Zur X-PCR:

X2 sense Primer:	5'-gacgtcctttgtytacgtcccgtc y=C/T	(Nukleotide 1413 bis 1436)
X2 antisense Primer:	5'-tgcagagttgaagcgaagtgcaca	(Nukleotide 1579 bis 1601)
3FL CB Hybprobe:	5'-acggggcgcacctctctttacgcgg-FL	(Nukleotide 1519 bis 1543)
5LC CB Hybprobes:	5'-LC Red 640-ctccccgtctgtgccttctcatctgc-PH	(Nukleotide 1545 bis 1570)

Zur X-RT-PCR:

X2 sense Primer:	5`-gacgtcctttgtytacgtcccgtc y=C/T	(Nukleotide 1413bis 1436)
X2 antisense Primer:	5`-tgcagagttgaagcgaagtgcaca	(Nukleotide 1579 bis 1601)
3FL CB Hybprobe:	5`-tgcagagttgaagcgaagtgcaca	(Nukleotide 1579 bis 1601)
5LC CB Hybprobe:	5`-LC Red 640-ctccccgtctgtgccttctcatctgc-PH	(Nukleotide 1545 bis 1570)

## 2.10 Längenstandards

### Protein-Standard

Rainbow-Marker low:

(Fa. Amersham, Braunschweig, Kat. Nr. RPN 755) mit folgenden Molekulargewichten (in kD): 45/ 30/ 20,1/ 14,3/ 6,5/ 3,5/ 2,5

### DNA-Standard

1kB DNA Ladder:

(Fa. Life Technologies, Karlsruhe) mit folgenden Fragmentgrößen (in bp):

12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

pUC-Mix Marker 8:

(Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit den Fragmentgrößen (in bp):

1114, 900, 692, 501/489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37/34/26/19.

## 2.11 Enzyme

CIP	NEB, Schwalbach.
Restriktionsenzyme	NEB, Schwalbach.
T4-DNA-Ligase	NEB, Schwalbach.
Trypsin	Life Technologies, Karlsruhe.

## 2.12 Geräte

Binokularmikroskop	Leitz, Wetzlar
Brutschrank SteriCult 200	Forma Scientific, U.S.A.
Gelkamera CS1, Drucker, Monitor Gelkammern	Cybertech, Mitsubishi, Hantarex nach Hoefer, Lindau, Größe 8,1 x 10,0 x 0,6 cm und 5,1 x 7,5 x 0,6 cm. Nachbau durch die Werkstatt des Instituts für Medi- zinsische Virologie, Gießen
Laminar Flow-Arbeitsbank HB 2448	Heraeus Intruments, Hanau
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson, über Abimed, Langenfeld
Spannungsgerät	Hoefer, Lindau
Spektrophotometer DU-70	Beckmann, Palo Alto, USA
Thermocycler	
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber	Costar, Fernwald
Zentrifuge CR422	Jouan, Saint-Herblein Cedex, Frankreich

## 2.13 Verbrauchsmaterial

Bakterienschalen	Greiner, Nürtingen
Kulturschalen 24 und 35 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft	Molecular Bio-Products, San Diego, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
PCR-Küvetten für LightCycler	

### **3. Methoden**

#### **3.1 Methoden der Zellkultur**

##### **3.1.1 Kultivierung von Hepatozytenlinien**

Zur Kultivierung der Zelllinien wurden die Zellen, die bei  $-158^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  zügig aufgetaut. Sobald der Inhalt des aliquotierten Kryo-Röhrchens aufgetaut war, wurde es auf eine 10 cm Zellkultur große Platte gegeben. Auf der Platte wurde vorher warmes D-MEM mit 10 prozentigem FKS angesetzt. Anschließend kamen die Zellen zur Anheftung an die Platte in den Brutschrank ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5,9%  $\text{CO}_2$ , 100% Luftfeuchtigkeit). Das Medium wurde bis zur Durchführung der Experimente mindestens zweimal wöchentlich gewechselt. War die Platte dicht genug bewachsen, konnten die Zellen zur cccDNA- und Gesamt-RNA-Isolierung herangezogen werden. Dafür wurde die Platte einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einer 1:5 Verdünnung von Trypsin/EDTA in PBS im Brutschrank inkubiert bis sich im Mikroskop eine leichte Ablösung der Zellen zeigte. Danach wurde D-MEM mit 10% FKS auf die Platte gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren suspendiert und je nach Bedarf verschieden weiter bearbeitet oder erneut ausgesät.

##### **3.1.2 Konservierung von Hepatozytenlinien**

Zum Konservieren der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden diese, wie oben beschrieben, von der Platte abgelöst, im Medium resuspendiert und bei 1500 U/min zehn min. abzentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 1ml Gefriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension konnte nun in die Kryo-Röhrchen eingefüllt werden. Das Einfrieren erfolgt schrittweise. Zuerst wurden die Zellen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff bei  $-158^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### **3.1.3 Präparation und Kultivierung von primären Tupaia Hepatozyten**

Das Tupaia wurde nach Tierschutzrecht zunächst 10 min. mit  $\text{CO}_2$  begast, anschließend wurde ihm das Genick gebrochen. Als nächstes wurde das Tier auf eine Präparierschale mit Nadeln fixiert und mit 70% Ethanol eingesprüht. Dadurch sollte das Fell des Tieres

von groben Schmutzpartikeln befreit werden. Es wurde ausschließlich mit sterilem Präparationsbesteck gearbeitet. Nun wurde das Fell vom Abdomen abgezogen. Mit Pinzette und Schere wurde das Abdomen in der Linea alba und das Thorax Median eröffnet und der Brustkorb entfernt. Durch stumpfe Abdrängung des Darms zur Seite wurde die Leber dargestellt. Die Vena Portae wurde nun im Lig. Hepatogastricum freipräpariert. Die Vena Portae wurde dann mit einer Braunüle® (22g, Vasocan) punktiert und der Kunststoffkatheter bis zur ersten Bifurkation vorgeschoben. Bei korrekter Lage wird Blut zurückfließen. Die Braunüle® wurde nun durch eine Ligatur fixiert. Um den Sitz der Braunüle® zu überprüfen, wurde die Leber mit 10 ml PBS mit 50 mM EGTA gespült. Das PBS sollte keine Calciumionen enthalten, denn dies verhindert die Thrombosierung der Lebergefäße und führt zur Zerstörung der Zell-Zellkontakte. Nun wurde das Herz des Tiers punktiert, um das Blut abfließen lassen zu können, denn sonst würde der Druck im portalen Kreislauf zu stark ansteigen. Danach wurde die Leber aus dem Körper entnommen und auf einem Trichter gelegt. Die Leber wurde für 20 min. mit PBS mit 50 mM EGTA bei Raumtemperatur perfundiert. Die Farbe der Leber sollte sich dabei von dunkelrotbraun zu hellbraun wechseln und damit die gut perfundierten Bereiche anzeigen. Gegebenenfalls konnte die Lage der Braunüle® geändert werden, um eine größtmögliche Perfusion zu erreichen. Das aus der Leber ablaufende PBS wurde verworfen. Weiterhin wurde bei die Leber bei Raumtemperatur 10 min. mit PBS ohne EGTA nachgespült. Die Durchflussrate sollte nicht mehr als 8 ml/min. betragen. Als nächstes wurde die Leber mit der Collagenase-Lösung behandelt. Dafür wurde 150 mg Collagenase abgewogen und in 200 ml DMEM ohne Phenolrot gelöst und im Wasserbad bei 45°C aufbewahrt. Der Abfluss aus dem Trichter wurde in die Collagenase-Lösung eingelegt, um die Leber im rezirkulierenden System zu perfundiert. Dieser Vorgang sollte 20 min. lang durchgeführt werden. Die aufgeweichte Leber wurde nun in eine Zellkulturschale gelegt, die Gallenblase vorsichtig entfernt und die Leber mit zwei Skalpell in kleine Stückchen zerschnitten. Die kleinen Leberstückchen wurden in die Collagenase-Lösung gegeben und in einem Erlenmeyerkolben überführt, oxygeniert und bei 37°C und 80 U/min auf einem Schüttler für ca. 20 min. inkubiert. Die Suspension wurde durch eine Siebdruckgaze (Porendurchmesser 210 µm) filtriert und das Filtrat auf 50 ml-Röhrchen verteilt (ca. 40 ml/Röhrchen) und auf Eis gestellt. Anschließend mussten die Hepatozyten aufgereinigt werden. Die 50 ml-Röhrchen wurden bei 4°C und 30g für 5 min. zentrifugiert. Der

Überstand, der nun die nicht parenchymatischen Zellen enthielt, wurde abgesaugt und das Pellet mit den Hepatozyten mit 5 ml eiskaltem DMEM durch auf- und abpipetieren resuspendiert und auf 40 ml mit eiskaltem DMEM aufgefüllt. Dieser Zentrifugation-Resuspension-Zyklus wurde dreimal durchgeführt. Nun musste der Anteil der vitalen Hepatozyten bestimmt werden, um die Qualität der Präparation zu bestimmen. Dazu wurden ca. 40 µl Zellsuspension auf einem Objektträger gegeben und mit der gleichen Menge Trypanblau vermischt (Trypanblauprobe) und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Zellkerne toter Zellen färben sich blau. Die letztlich erhaltene Zellsuspension wurde auf kollagenisierte (2,5 cm Durchmesser) Platten verteilt und mit einem Anheftungsmedium versetzt. Dieses Medium wurde für circa 1-2 Stunden bei 35,5 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Anheftungsmedium abgezogen und mit Tupaia Kultivierungsmedium bis zur weiteren Verarbeitung bei 35,5 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **3.1.4 Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV**

Für die Infektionsversuche wurden aufgereinigte Virionen aus den Serum HBV-Infizierter verwendet. Die primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen wurden wie oben beschrieben kultiviert. Die Infektion der primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit Hepatitis-B-Virionen erfolgt am dritten Tag nach dem Ausplattieren der Zellen in Zellkulturplatten von 2,5 cm Durchmesser. Die Platten enthielten  $1 \times 10^5$  Zellen/Ansatz. Von der Virusfraktion wurde eine Verdünnung hergestellt. Die Hepatozyten wurden mit den Konzentrationen  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  und mit  $1 \times 10^3$  Virionen/Platte infiziert. Schema der Infektion:

$1 \times 10^7$  Viren: 1 µl Virusstammlösung + 2ml Medium

$1 \times 10^6$  Viren: 100 µl der  $10^7$  Viren Verdünnung + 1,9ml Medium

$1 \times 10^5$  Viren: 100 µl der  $10^6$  Viren Verdünnung + 1,9ml Medium

$1 \times 10^4$  Viren: 100 µl der  $10^5$  Viren Verdünnung + 1,9ml Medium

$1 \times 10^3$  Viren: 100 µl der  $10^4$  Viren Verdünnung + 1,9ml Medium

(von Zeile 1 zu Zeile 2 wurden 100 µl einer 1:1000-Verdünnung der Virusstammlösung ad 2ml eingesetzt)

Als Negativkontrolle wurden zwei ausplattierte Zellkulturplatten genommen. Die Infektion wurde für jede Viruskonzentration im Doppelansatz durchgeführt. Am dritten

Tag nach Anlegen der Zellkultur wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und die entsprechende Virusverdünnung wurde mit Infektionsmedium auf die Zellen gegeben. In die Negativkontrollen wurde reines Infektionsmedium gegeben. Die Infektion der Hepatozytenkulturen mit HBV erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurde das Infektionsmedium abgenommen und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Dieses Inokulum wurde bei -20°C eingefroren. Die Hepatozyten wurden mit 1000 µl DMEM zweimal gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Tupaia Kultivierungsmedium pro Platte zu gegeben und für weitere drei Tage bei 35,5°C im Brutschrank inkubiert. Der Infektionsversuch verlief bis zum Tag 12 post Infektionem. Das Tupaia Kultivierungsmedium wurde alle 3 Tage gewechselt und die Überstände eingefroren. Am zwölften Tag wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt, in PBS aufgenommen und zur HBV-cccDNA- sowie HBV-Gesamt-mRNA-Bestimmung verarbeitet. Aus den Überständen wurde mittels ELISA die Menge an produziertem HBsAg und HBeAg bestimmt.

### 3.1.5 Hemmung der Infektion mittels Antikörper

Es standen 12 kollagenisierte 2,5 cm Zellkulturplatten zur Verfügung. Es wurden pro Platte ca.  $10^5$  primäre Tupaia Hepatozyten, die in Anheftungsmedium resuspendiert waren, gegeben. Nach zwei Stunden wurde das Medium gewechselt und die Hepatozyten mit Tupaia Kultivierungsmedium für drei Tage bei 35,5°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden zwei ausplattierte Zellkulturplatten verwendet. Am Tag drei nach dem Ausplattieren wurden die Viren mit den Antikörpern im Infektionsmedium vorinkubiert. Als Antikörper wurden folgende verwendet: Anti-S C20/2, Anti-PreS2 2-12F2, Anti-PreS2 S26, Anti-PreS1 und MA 18/7. Als Viruspräparation stand P24 zur Verfügung, mit  $1 \times 10^{10}$  Virusgenomequivalenten/ml.

Schema der Infektion:

- $1 \times 10^6$ : 0,1µl P24 + 15 µl Anti-PreS2 S26 + 1,5 ml Medium
- $1 \times 10^6$ : 0,1µl P24 + 15 µl Anti-PreS2 2-12F2 + 1,5 ml Medium
- $1 \times 10^6$ : 0,1µl P24 + 15 µl Anti-PreS1 MA 18/7 + 1,5 ml Medium
- $1 \times 10^6$ : 0,1µl P24 + 15 µl Anti-S C20/2 + 1,5 ml Medium
- $1 \times 10^6$ : 0,1µl P24 + 15 µl Anti- Maus + 1,5 ml Medium

Am nächsten Tag wurde das Infektionsmedium abgenommen und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Dieses Inokulum wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Hepatozyten wurden mit 1000  $\mu\text{l}$  DMEM zweimal gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Tupaia Kultivierungsmedium pro Platte darauf gegeben und für weitere drei Tage bei  $35,5^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Der Infektionsversuch verlief bis zum Tag 12 post Infektionem. Das Tupaia Kultivierungsmedium wurde alle 3 Tage gewechselt und die Überstände eingefroren. Am zwölften Tag wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt, in PBS aufgenommen und zur cccDNA- sowie Gesamt-mRNA-Bestimmung verarbeitet. Aus den Überständen wurde mittels ELISA die Menge an produziertem HBsAg und HBeAg bestimmt.

### **3.1.6 Kinetik der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten über die ersten 8 Tage**

Es standen 18 kollagenisierte 2,5 cm Zellkulturplatten zur Verfügung. Es wurden pro Platte ca.  $1 \times 10^5$  primäre Tupaia Hepatozyten, die in Anhaftungsmedium resuspendiert wurden, gegeben. Nach zwei Stunden wurde das Medium gewechselt und die Hepatozyten mit Tupaia Kultivierungsmedium für drei Tage bei  $35,5^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Als Positivkontrolle dienten 2 kollagenisierte Zellkulturplatten der Hepatozytenlinien HepG2.2.15. Am dritten Tag nach dem Ausplattieren fand die Infektion statt. Als Viruspräparation wurde aus einer Präparation Fraktion 4 mit  $5 \times 10^8$  Virusgenomäquivalenten/ $\mu\text{l}$  verwendet. 16 der Zellkulturplatten wurden mit 1  $\mu\text{l}$  aus der Fraktion 4 + 1ml Medium infiziert und 2 wurden als Negativkontrolle nicht infiziert. Eine Stunde nach der Infektion wurden die ersten zwei Platten geerntet, das alte Medium abgenommen, eingefroren und die Zellen von der Platte abgekratzt. Die Infektion der restlichen 14 Platten erfolgte über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Am nächsten Tag wurde der Überstand (Inokulum) abgenommen und eingefroren. Die Platten wurden mit 1000  $\mu\text{l}$  DMEM zweimal gewaschen.

Anschließend wurde 1ml Tupaia Kultivierungsmedium pro Platte darauf gegeben und bei  $35,5^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Die nächsten zwei Platten wurden 18 Stunden nach der Infektion geerntet. Nun wurde täglich, an den Tagen 2, 3, 4, 5, 6, und 8 nach der Infektion die Hepatozyten von zwei weiteren Platten entnommen und die Überstände eingefroren. Aus den abgenommenen Zellen wurde die cccDNA und

Gesamt-mRNA isoliert und ihre Menge im LightCycler bestimmt. Aus den Überständen wurde mittels ELISA die Menge an produziertem HBsAg und HBeAg bestimmt.

### **3.1.7 Einfrieren von primären Tupaia Hepatozyten**

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt im Rahmen der Hepatozytenisolation wurden isolierte Tupaia Hepatozyten, die nicht in einem Infektionsversuch verwendet wurden, eingefroren. Dazu wurde nach der Zentrifugation der Überstand möglichst vollständig entfernt und das Pellet in eiskaltem Gefriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde für ca. 5 min. auf Eis belassen, danach nochmals vorsichtig resuspendiert, und in Einfrieröhrchen aliquotiert (1ml/Röhrchen). Die Röhrchen wurden sofort auf -70°C gekühlt und am nächsten Tag in den -158°C Stickstoffbehälter umgeräumt.

### **3.1.8 Auftauen von primären Tupaia Hepatozyten**

Das Einfrieröhrchen wurde aus dem -158°C Stickstoffbehälter geborgen und langsam aufgetaut. Sobald das Eis geschmolzen war, wurde der Inhalt in ein eisgekühltes 50 ml Röhrchen umgefüllt. Danach musste die DMSO Konzentration in der Zellsuspension schrittweise erniedrigt werden. Dies geschah durch langsame Zugabe von 0,5, 1,5 und 2 ml eiskaltem WILLIAMS-E-Medium, vorsichtigem durchmischen und 5 min Inkubation zwischen den Verdünnungsschritten. Nun wurde die Zellsuspension 5 min. bei 40 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 37°C warmen Anheftungsmedium resuspendiert.

### **3.1.9 Homogenisieren von Leberzellen aus Zellkultur**

Die Zelllinie HepG2 wurde als Negativkontrolle und die Zelllinie HepG2.2.15 als Positivkontrolle verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C im mit 5,9% CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank gehalten. Es wurden Zellkulturplatten mit 24-Vertiefungen, mit einem konfluenten Zellrasen verwendet. Zunächst wurde das Medium abgezogen und anschließend die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurde der konfluente Zellrasen mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt und in PBS aufgenommen. Die Zellen wurden bei 2.000 U/min 2 min. und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Zelllysispuffer aufgenommen, gevortext und nach der Homogenisierung wurde erneut

bei 2.000 U/min 2 min. und 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Gesamt-RNA und aus dem Pellet die cccDNA bestimmt. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Die Kerne wurden ebenso gelagert.

### **3.1.10 Homogenisieren von humanen Leberstücken**

Die Biopsate, die bei -158°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, wurden mit einem Skalpell und einer Pinzette in kleine Stückchen geschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel gegeben. Alle Schritte erfolgten auf Trockeneis. Die tiefgefrorenen Leberstückchen wurden mit einer Pistille gemörsert, in 200 µl SDS/EDTA (0,6% (w/v)/10 mM EDTA) aufgenommen und anschließend gevortext bis sich eine homogene Masse gebildet hatte. Nun wurden weitere 200 µl SDS/EDTA (0,6% (w/v)/10 mM EDTA) zu der Zellsuspension hinzugegeben. Durch den Hirt Extrakt wurde anschließend die cccDNA isoliert.

## **3.2 Immunologische Methoden**

### **3.2.2 Nachweis von HBsAg (ELISA)**

Die verwendeten „Sandwich“-ELISA sind höchst empfindlich und dienen der quantitativen Bestimmung von gelösten Proteinen. Das Prinzip basiert darauf, dass das in der Probe befindliche Antigen an den auf der Platte gekoppelten Antikörper bindet und nicht fixiertes Material durch Waschen entfernt wird. Es wird anschließend peroxidasekonjugierter Antikörper gegen HBsAg dazugegeben, der nun an freie Ag-Determinante binden. Die nicht gebundenen enzymkonjugierten Antikörper werden ausgewaschen. Durch Zugabe des Substrats Wasserstoffperoxid wird die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die enzymatische Reaktion wird mit Hilfe des Chromogens o-Phenylendiamin sichtbar gemacht. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (MaxiSorb, Nunc, Wiesbaden) mit Antikörpern (C20-2 1mg/ml 1:1000) gegen das HBsAg beschichtet. Dazu wurden die Antikörper in NaPP 0,0175 M, pH 7,6 in der angegebenen Konzentration aufgenommen und je 100 µl/Vertiefung eingefüllt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Nachabsättigung erfolgte durch Zugabe

von 1% BSA in PBS. Es wurden 200  $\mu$ l je Vertiefung eingefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde zweimal mit 0,25% Tween in PBS und dreimal mit PBS gewaschen (ELISA-Wascher-Columbus, Tecon). Danach wurden 50  $\mu$ l oder 100  $\mu$ l Probe bzw. Kontrolle pro Vertiefung eingefüllt, für 2 h bei 37°C inkubiert und erneut ein Waschgang durchgeführt. Als Konjugat wurde der Antikörper Anti-HBs-POD (Abschnitt 2.3.2) verwendet, er wurde im Verhältnis 1:200 in 1% Casein in PBS (Pierce) aufgenommen und je 100  $\mu$ l/Napf eingefüllt. Die Inkubation erfolgt 1 h bei Raumtemperatur und anschließend wurde erneut gewaschen. Zur Detektion des POD markierten Konjugats wurde eine Tablette OPD (o-Phenylendiamin, Abbott) in 5 ml Puffer (Abbott) aufgelöst und 100  $\mu$ l/Napf eingefüllt. Nach 15-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100  $\mu$ l/Napf H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M gestoppt. Die Extinktion des umgesetzten POD-Substrats wurde bei 492 nm im Mikrotiter Photometer (LP 400, Diagnostics, Pasteur) gemessen (Referenzwellenlänge 620 nm). Die Konzentration von HBsAg wird in Paul-Ehrlich-Einheiten gemessen. Eine Einheit des Paul-Ehrlich-Standards (PEI-Einheit) entspricht dabei etwa 1 ng HBsAg in serologisch aktiver Form (Gerlich et al. 1994). Zur Quantifizierung des HBsAg wurde eine Standardreihe mit folgenden Mengen an gereinigtem HBsAg aus Serum erstellt: 0,2-0,1-0,05-0,025-0,01-0,005-0,0025 ng und 0,001 ng/50  $\mu$ l.

### 3.2.3 Nachweis von HBeAg

Zur Bestimmung des HBeAg wurde ein Mikropartikel Enzymimmunassay (MEIA) der Firma Abbott (AxSym) verwendet. Die Messung wurde im diagnostischen Labor des Institutes für Medizinische Virologie der Universität Gießen durchgeführt. Der verwendete ELISA entspricht einem Standardsystem der Firma Abbott und trägt die Bezeichnung HBe 2.0 für das HBeAg. Bei dem Testverfahren bindet das HBeAg an mit anti-HBe beschichtete Mikropartikel. Zusätzlich erfolgt eine Bindung an Biotin markiertes anti-HBe. Dadurch ergibt sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Der quantitative Nachweis erfolgt über ein alkalisches Phosphatase-Konjugat, das über einen anti-Biotin-Antikörper eingebracht wird. Als Substrat spaltet dieses 4-Methylumbellifery-Phosphat zu einem Fluoreszenzprodukt (4-Methylumbelliferon). Die ermittelten Daten werden berechnet, indem ein Grenzwert (CO), anhand des Mittelwerts

des Index-Kalibrators bestimmt wird. Die Ergebnis wird als Quotient S/CO berechnet, wobei S das Signal der Probe ist.

### **3.3 Aufreinigung von Hepatitis B Virionen aus dem Plasma eines chronisch infizierten Patienten**

Viren, Filamente und Sphären bandieren im Saccharosegradienten bei unterschiedlichen Dichten und lassen sich daher durch Austropfen des Gradienten in einzelnen Fraktionen voneinander trennen. In einem ersten Reinigungsschritt wurden die Viren, Filamenten und Sphären voneinander getrennt. Das Plasma muss zunächst vorgeklärt werden, um grobe Partikel zu entfernen. Dazu wurde in 50 ml Röhrchen jeweils 35-45 ml Plasma gegeben und die Röhrchen 20 min bei 3.000 g und 4°C abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810) und der Überstand abgenommen. Jeweils 30 ml Überstand können auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradient von 50-10% (w/w) in TNE geschichtet werden. Der Saccharosegradient besteht aus folgenden Konzentrationen: 1,5 ml 50%, 2 ml 35%, 25%, 20%, 15%, 10% Saccharose. Die Zentrifugation erfolgte für 18 h bei 25.000 U/min und 10°C im SW 28.38 Rotor (Beckmann) in der Ultrazentrifuge (Beckmann optima™ L-70K). Nach dem Lauf wurde eine Kanüle in den Gradienten eingeführt und der Gradient von unten nach oben mit Hilfe einer Schlauchpumpe ausgepumpt und manuell in 1-1,5 ml Fraktionen aufgeteilt. Der Saccharosegehalt der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch ermittelt (Refraktometer; Carl Zeiss). In geeigneter Verdünnung (optische Dichte (OD)) wurde die Extinktion der Fraktionen im Photometer (DU 70 Spectrophotometer; Beckmann) bei einer Wellenlänge von 280 nm und einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm bestimmt. Anschließend wurden aus jeder Fraktion die HBV-Genomequivalente in der real-time-PCR durch Amplifikation der X-Region bestimmt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

### **3.4 Isolierung replikativer Intermediate des HBV**

#### **3.4.2 cccDNA Isolierung mittels Hirth-Extraktion**

Zur cccDNA-Bestimmung mussten die eingefrorenen Kernpellets zunächst auf Eis aufgetaut werden. Danach erfolgte die DNA-Fällung nach Hirth (Hirth, 1969). Durch die „Hirth-Extraktion“ wurde die chromosomale DNA durch die hohe Salzkonzentration des Hirth-Extraktes ausgefällt und die episomale DNA konnte isoliert werden. Dazu wurden 400 µl SDS/EDTA 0,6% (w/v) in 10 mM EDTA zu dem Zellpellet gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl 5 M NaCl dazu gegeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Die chromosomale DNA fiel aus und konnte durch 4 min zentrifugieren bei 14.000 U/min und 4°C pelletiert werden. Aus dem Überstand wurde die cccDNA mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit aufgereinigt. Dazu wurde der Ansatz mit 200 µl Bindepuffer und 50 µl Poly A in silikonisierte 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und gevortexet. Daraufhin wurden pro Ansatz 50 µl Proteinase K hinzugefügt und erneut gut gevortexet. Nun wurden die Ansätze für 10 min in den auf 90°C vorgeheizten Heizblock gestellt und anschließend die Lyse-Reaktion mit 100 µl Isopropanol gestoppt. Nun wurden die Ansätze auf Säulen mit einem High Pure Filter, der sich auf dem Auffangröhrchen befand, pipettiert und eine min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden dadurch an das in den High Pure Filter-Röhrchen vorgepackte Glasvlies gebunden. Diese Nukleinsäuren wurden anschließend mit einem speziellen Inhibitor Removal Puffer gewaschen, um so PCR inhibierende Bestandteile (Salze, Proteine oder zelluläre Bestandteile) zu entfernen. Die gereinigten Nukleinsäuren wurden dann mit Elutionspuffer eluiert.

#### **3.4.3 Gesamt-mRNA Isolierung**

Zur Bestimmung der Gesamt-mRNA mussten die eingefrorenen Überstände aufgetaut werden. Dazu wurde das Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Dyna) verwendet. Das Prinzip der Isolierung beruht darauf, dass die Poly-A-Schwänze der mRNA an die Oligo-dT's der Dynabeads binden und diese mittels Magneten vom Rest der Suspension abgetrennt werden können. Das Tris-HCl des Kits wurde auf Eis vorgekühlt. Die übrigen Lösungen wurden auf Raumtemperatur gebracht. Zuerst

wurden die Oligo-dT`s vorbereitet. Dazu wurden die Oligo-dT`s nach vortexen in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Pro Ansatz wurden 20 µl Oligo-dT`s benötigt. Das Reaktionsgefäß wurde 30 sec auf dem Magnetständer gestellt, so dass sich die Oligo-dT`s am Reaktionsgefäß-Rand setzten und der Überstand abgezogen werden konnte. Das Pellet wurde mit der entsprechenden Menge, 20 µl Lysis/Bindepuffer pro Ansatz, resuspendiert. Der Waschschrift der Oligo-dT`s wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Oligo-dT`s in 20 µl Aliquots aufgeteilt. Der Heizblock wurde auf 90 °C vorgeheizt. Zu jedem Aliquot wurden je 100 µl des aufgetauten Überstands pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur in einem Schüttler gleichmäßig gevortexet. Daraufhin wurden die Proben für 30 sec auf den Magnetständer gestellt und der Überstand abgezogen. Die Oligo-dT`s, die nun die mRNA gebunden hatten, wurden zunächst mit 100 µl Waschpuffer A resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Der Waschschrift wurde noch einmal mit Waschpuffer B durchgeführt. Danach wurden die Oligo-dT`s in Waschpuffer B resuspendiert und für 5 sec in der Tischzentrifuge pelletiert. Danach wurden die Ansätze erneut auf dem Magnetständer gestellt und der Überstand abgezogen. Nun wurden 20 µl eiskaltes Tris/HCl zu jedem Ansatz gegeben und für 2 min in den auf 90°C vorgeheizten Heizblock gestellt. In diesem Schritt wurden die Oligo-dT`s von der mRNA getrennt und der Überstand, der die mRNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die mRNA wurde auf Eis gestellt, 5 µl MgCl<sub>2</sub> und 1 µl DNase/RNase frei hinzugefügt und die Ansätze für 30 min bei Raumtemperatur stengelassen. Dadurch wurden alle eventuell noch vorhandenen DNA Moleküle entfernt. Die mRNA konnte nun direkt für RT-PCR verwendet werden.

### **3.5 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)**

#### **3.5.1 real-time PCR**

Mit der real-time Polymeraseketten-Reaktion ist die Quantifizierung des amplifizierten Nukleinsäureabschnitts möglich. Während jeder PCR gibt es eine Phase, in der der Gehalt der DNA logarithmisch ansteigt, bevor er ein Plateau erreicht. Die real-time Polymeraseketten-Reaktion misst kontinuierlich nach jedem Zyklus und kann die exponentielle Phase identifizieren. Dazu werden in jedem Zyklus die komplementären

Floureszenzprimern mittels eines Lichtstrahls konzentrationsabhängig angeregt und die emittierte Fluoreszenz gemessen. Diese Fluoreszenz ist proportional der Amplifikationsmenge. Der Fluoreszenzfarbstoff ist an Oligonukleotide gebunden, die Hybridisierungssonden (Hybprobes) genannt werden. Diese sind zwei sequenzspezifische Oligonukleotide, die sich in einem definierten Abstand von 1-5 Nukleotiden an die neu amplifizierte DNA anlagern. Hybprobe eins hat am 3'-Ende ein Fluoresceinmolekül gebunden, das als Donator dient. Hybprobe zwei hat am 5'-Ende ein LC-Rot 640 Molekül, das als Akzeptor dient und ist am 3'-Ende methyliert, so kann es nicht als Primer dienen. Wird das Fluorescein des Donators in der Amplifikationsphase mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt, kann seine Energie dann auf dem Akzeptor übertragen werden, wenn der Abstand zwischen den beiden Molekülen nach Bindung an das Amplifikat sehr gering ist. Diese Energieübertragung wird als FRET, Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, bezeichnet. Der Akzeptor emittiert ein rotes Licht, welches über eine Photozelle des LightCyclers gemessen wird. Für die Quantifizierung wurde in jedem Zyklus der PCR nach der Annealingphase die Fluoreszenz gemessen. Die Grundfluoreszenz, die von Anfang an vorhanden ist, ist nach den ersten Zyklen der PCR noch nicht messbar. Ab einem bestimmten Punkt sind genug PCR-Produkte im Ansatz vorhanden, um ein messbares Signal zu erzeugen. Die Fluoreszenz nimmt exponentiell zu und geht gegen Ende des Laufes in eine Plateauphase über. Dies ist dadurch zu erklären, dass alle Hybprobes an das neue Amplifikat gebunden haben und die freien Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs) in ihrer Konzentration sinken. Nach dem Lauf werden die Fluoreszenzen (y-Achse) in Bezug zu den vergangenen Zyklen aufgetragen. Die maximale Fluoreszenzzunahme pro Zyklus wird ermittelt. Dazu wird vom Rechner des LightCyclers eine Regressionsgerade durch die Punkte auf der Fluoreszenzfunktion gelegt und ihr Schnittpunkt (Crossing Point) mit der Zeitachse (Baseline) errechnet. Der Schnittpunkt ist um so früher, desto mehr DNA in der ursprünglichen Probe vorhanden war. Die Anzahl der Punkte (Fit Points), die die Regressionsgerade bestimmen, wird vom Benutzer festgelegt und darf nur im exponentiellen Bereich der Fluoreszenzzunahme liegen. Eine Quantifizierung der unbekanntenen Proben wird dadurch erreicht, dass eine Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration bei jeder PCR ebenfalls amplifiziert wird. Die bekannten Konzentrationen werden in halblogarithmischer Darstellung gegen die Schnittpunkte der Zeitachse aufgetragen und eine

Regressionsgerade eingetragen. Die unbekannt Konzentrationen werden anhand ihres Schnittpunktes mit der Baseline bestimmt. Die vom LightCycler-Rechner ermittelte Menge wird als Kopien angegeben. Die Ergebnisse müssen in Genomäquivalente pro ml umgerechnet werden.

### 3.5.2 real-time PCR der cccDNA von HBV

Als Standard diente: Das Plasmid pBS HBV 991 T7 Dimer

Der Ansatz: 10µl DNA Probe

10µl Mastermix	
3,4 µl	dH <sub>2</sub> O
1,6(3mM)	MgCl <sub>2</sub>
1µl(10pmol)	sense Primer
1µl(10pmol)	sense Primer
0,5µl(4pmol)	antisense Primer
0,5µl(4pmol)	antisense Primer
2µl	Fast Start Taq

Das Programm setzt sich aus den folgenden Abschnitten zusammen

In dem Acquisition Mode wird zwischen None (N), Single (S) und Conti (C) unterschieden.

	Aktivierung	Amplifikation			Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	45			1			1
Type	Regular	Quantification			Melting Curve			Regular
Target Temp (°C)	95	95	57	72	95	50	95	40
Incubation Time	10 min	10''	20''	32''	10''	20''	0''	30''
Temp. Transition Rate (°C)	20	20	20	5	20	20	0,1	20
Second Target Temp. (°C)			50					
Step Size			1					
Step Delay			1					
Acquisition Mode	N	N	S	N	N	N	C	

War der Lauf beendet, wurde das Amplifikat in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.5.3 real-time PCR der X-Region von HBV

Als Standard diente: Verdünnungsreihe aus isolierter viraler DNA, mit  $1 \times 10^7$  GE/ml

Der Ansatz: 10µl DNA Probe

10µl Mastermix

2,6 µl	dH <sub>2</sub> O
2,4(3mM)	MgCl <sub>2</sub>
1µl(10pmol)	sense Primer
1µl(10pmol)	sense Primer
0,5µl(4pmol)	antisense Primer
0,5µl(4pmol)	antisense Primer
2µl	Fast Start Taq

Das Programm setzt sich aus den folgenden Abschnitten zusammen

	Aktivierung	Amplifikation			Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	45			1			1
Type	Regular	Quantification			Melting Curve			Regular
Target Temp (°C)	95	95	57	72	95	50	95	40
Incubation Time	10 min	10''	20''	32''	10''	20''	0''	30''
Temp. Transition Rate (°C)	20	20	20	5	20	20	0,1	20
Second Target Temp. (°C)			50					
Step Size			1					
Step Delay			1					
Acquisition Mode	N	N	S	N	N	N	C	

### 3.5.4 real-time Reverse Transkription PCR der X-Region von HBV

Als Standard diente: ein *in vitro* transkribiertes RNA-Stück

Der Ansatz: 5µl mRNA Probe

15µl Mastermix	
4,0 µl	dH <sub>2</sub> O
3,0(3mM)	MgCl <sub>2</sub>
1µl(10pmol)	sense Primer
1µl(10pmol)	sense Primer
0,5µl(4pmol)	antisense Primer
0,5µl(4pmol)	antisense Primer
0,5µl	RT-PCR-Enzyme Mix
4µl	RT-PCR-Reaktion Mix

Das Programm setzt sich aus den folgenden Abschnitten zusammen

	Aktivierung	Amplifikation			Schmelzkurve			Kühlen
Cycles	1	45			1			1
Type	Regular	Quantification			Melting Curve			Regular
Target Temp (°C)	95	95	57	72	95	50	95	40
Incubation Time	10 min	10''	20''	32''	10''	20''	0''	30''
Temp. Transition Rate (°C)	20	20	20	5	20	20	0,1	20
Second Target Temp. (°C)			50					
Step Size			1					
Step Delay			1					
Acquisition Mode	N	N	S	N	N	N	C	

Der Ansatz wurde in kleine Kapillaren gegeben und bei 2.500 U/min ca. 30 sec zentrifugiert. Die Kapillaren wurden in das LightCycler-Rondell platziert und das Programm abgerufen. Nach dem Lauf wurde der Inhalt der Kapillaren in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.6 Agarosegel-Elektrophorese der PCR Produkte

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten und ihre Größenbestimmung erfolgte mit der üblichen Methode der Agarose-Gel-Elektrophorese (Vendrely R et al. 1968). Bei dieser nativen Form der Elektrophorese liegen die Phosphatgruppen der DNA als vollständig dissoziierte Polyanionen vor, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit weitgehend nur von Molekulargewicht und DNA-Konformation (linear, nicked-circular, superhelical) abhängig ist. Die Agarose wurde in gewünschter Konzentration (0,8 – 2 %, w/v) in 1 x TAE-Puffer eingewogen und in einer Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht; Verdampfungsverluste wurden mit ddH<sub>2</sub>O ausgeglichen. Nach Abkühlen auf 50 °C wurde die Agarose in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen, durch Einstecken eines Teflon-Kammes nahe der Kathode wurden, nicht bis zum Gefäßboden reichende, Vertiefungen ausgespart. Nachdem die Agarose erstarrt war, konnte die Kammer mit 1x TAE befüllt und der Kamm herausgezogen werden. 10 µl Probe wurden mit 2 µl 6 x Agarose-Laufpuffer gemischt und in den Taschen aufgetragen. Als DNA-Marker wurde pUC Mix 8 (MBI Ferment) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V. Das Gel wurde nach Beendigung der Trennung für ca. 30 min in Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid gibt aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften unter Interkalierung mit den Nukleotidbasen sichtbares Licht zwischen 500 und 590 nm ab, das unter UV-Licht mithilfe einer Gelkamera dokumentiert werden konnte.

### 3.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten im low-melting Agarosegel

Durch die Verwendung eines Extraktionskits wird die im Agarosegel aufgetrennte DNA um ca. 60% reduziert. Dieser Verlust ist unvermeidlich und durch die physikalische Affinität des Elutionsmediums zur DNA bedingt. Wenn von einer DNA-Probe nur geringe Mengen zur Verfügung stehen, stellt die Verwendung von *low-melting* Agarose eine gute Alternative dar, um den DNA-Verlust zu minimieren. Dabei wird eine spezielle Agarose verwendet, die bereits bei 65°C flüssig wird. Die Agarose wird als 0,8%ige Mischung in 1x TAE erhitzt und zusammen mit Ethidiumbromid in den

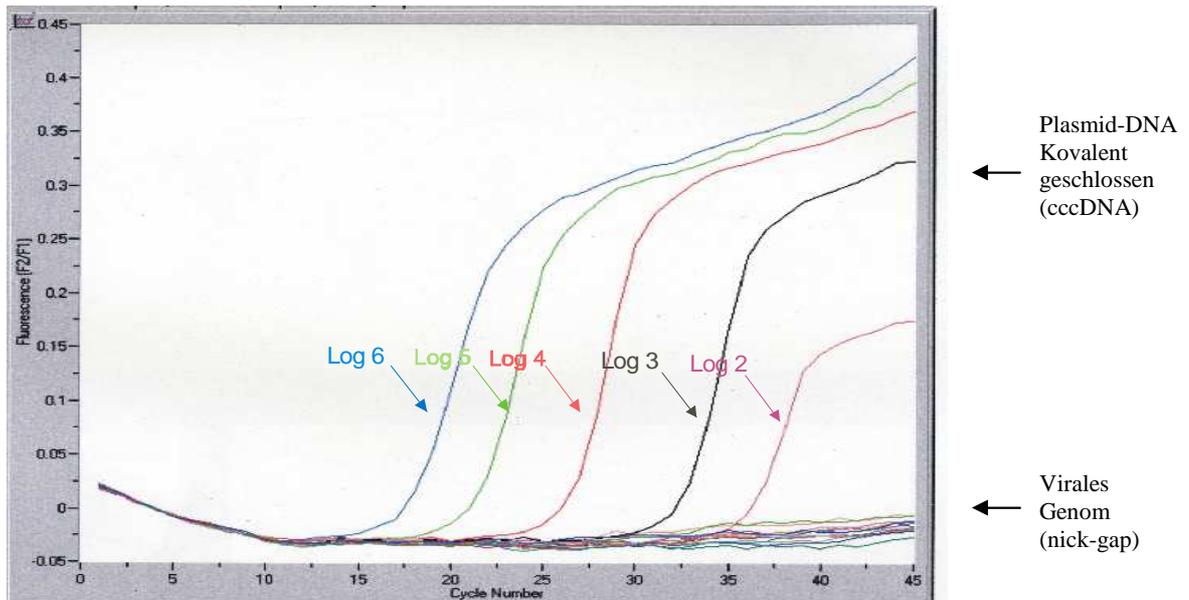
Gelschlitten gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung entspricht den üblichen Agarosegelen. Nach dem Lauf wird die gesuchte DNA-Bande möglichst genau ausgeschnitten und das Gewicht des Gelstückes bestimmt. Die Agarose wird mit soviel H<sub>2</sub>O versetzt, dass die Endkonzentration 0,2% entspricht und unter gelegentlichem Schütteln bei 65°C im Heizblock geschmolzen. Durch die Verdünnung auf 0,2% kann die Agarose nicht mehr aushärten. Die flüssige Agarose kann direkt für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Die Sequenz der PCR-Amplifikate wurde bei Bedarf durch die Firma MWG bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Optimierung der Detektion der cccDNA

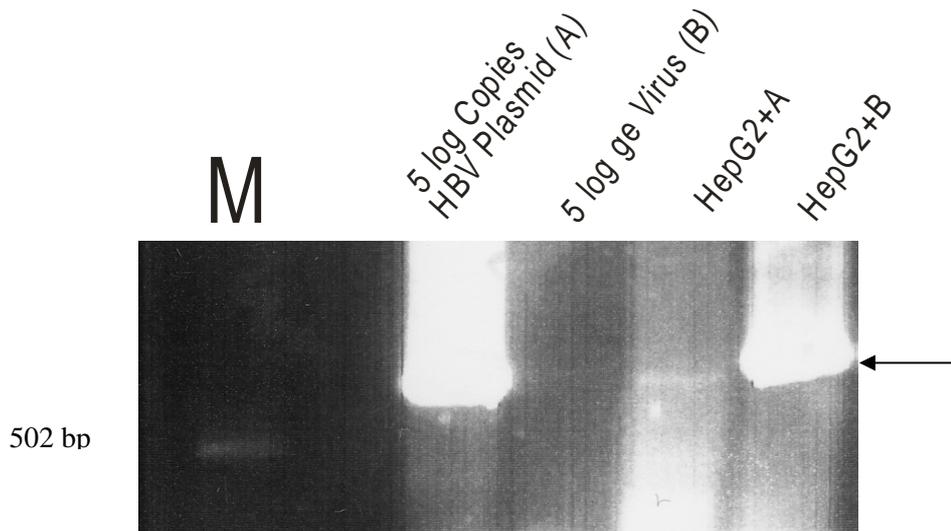
Nachdem das Hepatitis-B-Virus in die Zelle eingedrungen ist, wird das HBV-Genom in den Zellkern der infizierten Hepatozyten transportiert. Im Kern wird das Genom von der nicht-kovalenten, relaxiert zirkulären Form (rcDNA) zu einer kovalenten, geschlossen zirkulären Form (cccDNA) umgewandelt. Das bedeutet, dass das Auftreten von cccDNA der früheste Marker der etablierten HBV-Infektion ist. Der Nachweis der cccDNA in infizierte Hepatozyten war durch die bis dato vorhandenen Methoden, wie z.B. Southern Blot, die eine Nachweisgrenze von  $> 10^5$  Kopien besitzt, nur schwer möglich. In den folgenden Versuchen soll gezeigt werden, dass eine spezifische Quantifizierung der cccDNA in infizierten Tupaia Hepatozyten mittels real-time PCR Technik in Anwesenheit der rcDNA etabliert werden konnte.

Als Positivkontrollen für die PCR wurde das Plasmid pBS HBV 991 T7 Dimer verwendet. Dieses Plasmid enthält zwei linear hintereinander einklonierten Kopien des HBV-Genoms („head-to-tail-Dimer“). Dadurch wurde die nick-gap Struktur des viralen Genoms geschlossen und entspricht somit der cccDNA. Als weitere Positivkontrolle diente die stabil mit HBV transformierte Zelllinie HepG2.2.15, die cccDNA nachweislich produziert. Als rc-Kontrolle wurde aus Serum gereinigte HBV-DNA eingesetzt, die die nick-gap-Struktur enthält. Es wurden sequenzspezifische Hybridisierungssonden zur Quantifizierung der cccDNA ausgesucht. Diese verschiedenen Proben wurden mit den oben erwähnten Primern in einer real-time PCR eingesetzt. In der Abbildung 4.1.1 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die verschiedenen Verdünnungen des Plasmids amplifiziert wurden, während die verschiedenen Verdünnungen des viralen Genoms, DNA mit Nick-gap-Struktur, nicht amplifiziert wurden. Diese Divergenz zwischen cccDNA (Plasmid) und virales Genom (nick-gap-Struktur) als verwendetes Template gab den ersten Hinweis darauf, dass die Polymerase Kettenreaktion mit den hier verwendeten Primern für die cccDNA spezifisch ist.



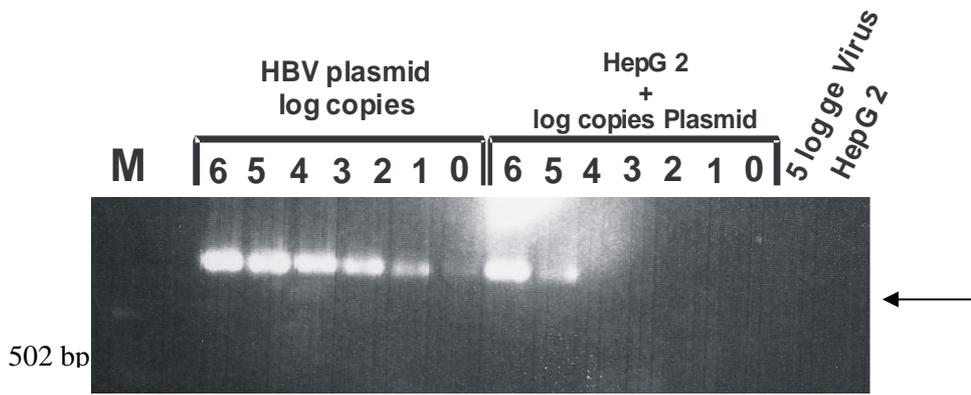
**Abb. 4.1.1:** Abbildung der im LightCycler (Roche) bestimmten Template-Konzentration in Relation zur Zyklus-Anzahl. Die S-förmig ansteigenden Kurven zeigen die verschiedenen Verdünnungen des Plasmid-DNA (Log 6 bis Log 2) dar, die flach verlaufenden Linien stellen die nicht amplifiziert Verdünnungen des viralen Genom dar (Log 6 bis Log 0).

Da ein System etabliert werden sollte, das den Nachweis von HBV cccDNA im Kern der infizierten Zellen ermöglichen kann, sollte der eventuell störende Einfluß von chromosomaler DNA auf die cccDNA PCR untersucht werden. Hinweise auf diese Vermutung gab das elektrophoretische DNA-Agarosegel, das von einem real-time PCR-Lauf angefertigt wurde. Das entsprechende DNA-Agarosegel zu dem Lauf ist in der Abb. 4.1.2 zu sehen. Man kann deutlich erkennen, dass das Dimer-Plasmid im Gegensatz zur Virus-DNA amplifiziert wurde (Spur A und B). Wurde das Dimer-Plasmid zu isolierten Zellkernen von HepG2 Zellen (ca.  $1 \times 10^5$ ) gegeben und gemeinsam mit der chromosomalen DNA aufgereinigt, ist die Bandenintensität im Gel viel schwächer als beim Fehlen von chromosomaler DNA. Wurde das Virus zu Zellkernen von HepG2 Zellen gegeben und gemeinsam die DNA aufgereinigt, so ist im Gel eine spezifische Bande zu erkennen, d.h. durch die Anwesenheit der chromosomalen DNA wird nun die virale rcDNA amplifiziert (HepG2+B in Abb. 4.1.2). Die Anwesenheit von Fremd-DNA beeinflusst demnach nicht nur die Effizienz der Reaktion, sondern auch deren Spezifität. Es wurde deutlich, dass das Vorliegen von chromosomaler DNA die Isolierung und somit die Quantifizierung der episomalen cccDNA möglicherweise erschwert.



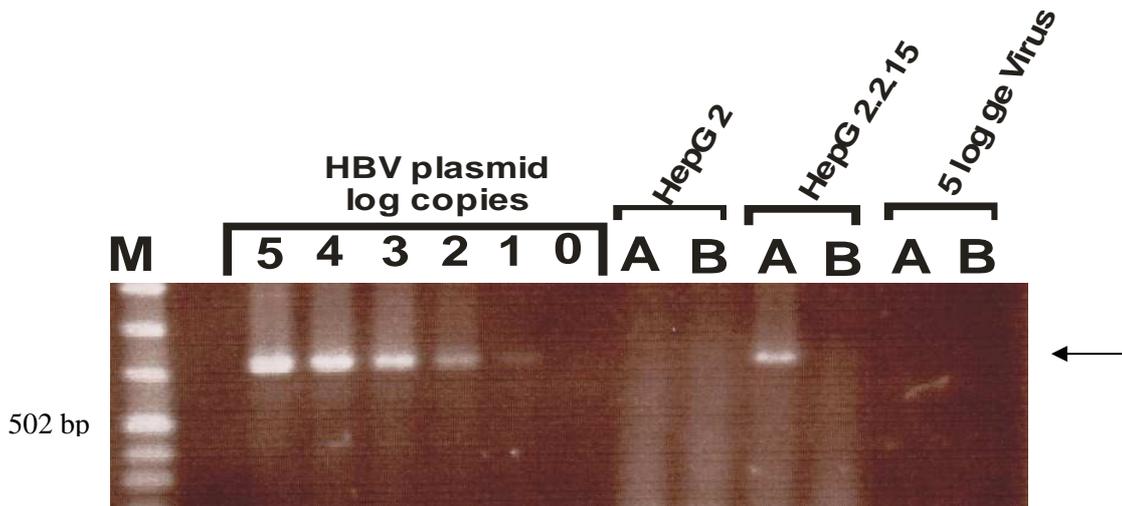
**Abb. 4.1.2: Elektrophoretische Größenanalyse der LightCycler-Amplifikate im 2%igen Agarosegel.** In den anschließenden Banden finden sich Amplifikate der obigen Templates. Die Bandenhöhe, die die Position des Amplifikats (734 bp) der cccDNA kennzeichnet, ist mit einem Pfeil angegeben. Die Zellkerne der HepG2 Zellen wurde einmal zu dem Plasmid und einmal zum Virus gegeben und aufgereinigt. Aufgetragen wurde in der linken Spur Marker pUC-Mix, dessen 502 Bp-Bande seitlich gekennzeichnet ist.

Nun sollte untersucht werden, bei welcher Plasmidkonzentration eine Quantifizierung bei vorliegender chromosomaler DNA nicht mehr möglich ist. Dazu wurde in abnehmender Konzentration von  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^0$  Plasmide zu isolierten HepG2 Zellkernen gegeben und die Nukleinsäure aufgereinigt (siehe Methode 3.4.1). Diese extrahierte Gesamt-DNA wurde dann als Template in der real-time PCR unter unveränderten Bedingungen eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend in einem elektrophoretischen Agarosegel analysiert. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4.1.3 zu sehen. Mit Vorliegen der chromosomalen DNA ist eine Plasmidkonzentration ab  $1 \times 10^4$  und geringer nicht quantifizierbar. In der Standardreaktion ohne chromosomaler DNA wurde bis zur theoretisch möglichen Sensitivität von einem Plasmid pro Ansatz quantifiziert.

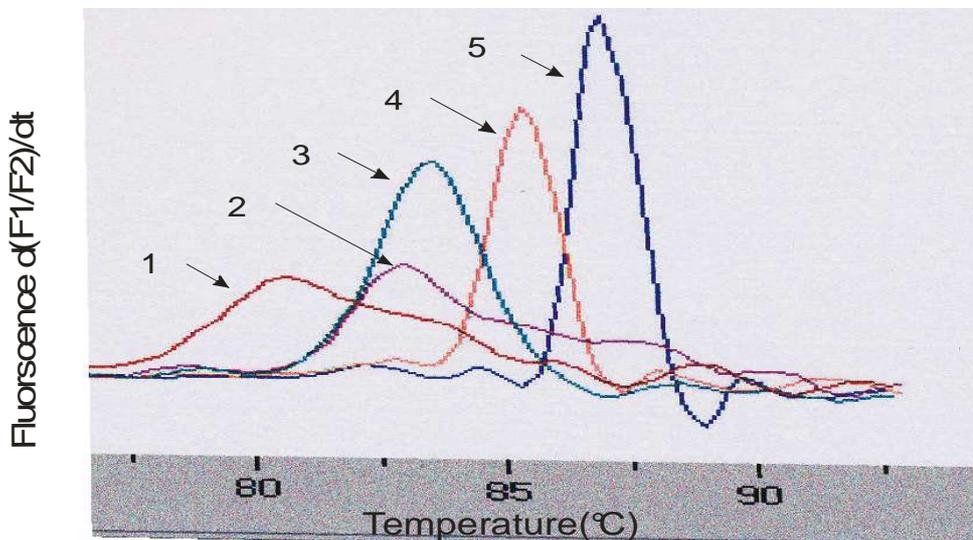


**Abb. 4.1.3: Elektrophoretische Analyse der LightCycler-Amplifikate im 2%igen Agarosegel.** In den anschließenden Banden finden sich Amplifikate der obigen Templates. Dabei wurde differenziert, ob die quantitative Sensitivität zum Nachweis von HBV Plasmid-DNA durch die Anwesenheit chromosomaler DNA (HepG2) beeinflusst wird. Die Bandenhöhe, die die Position der HBV-Amplifikate kennzeichnet, ist mit einem Pfeil angegeben. Aufgetragen wurden in der linken Spur Marker pUC-Mix, dessen 502 bp-Bande seitlich gekennzeichnet ist.

Das vorliegende Ergebnis machte es erforderlich, weitere Feinabstimmungen innerhalb der real-time PCR zu finden, die eine Trennung der chromosomalen DNA von der viralen cccDNA ermöglicht. Dazu wurde die HBV produzierenden HepG2.2.15-Zellen herangezogen. Diese Zell-Linie enthält stabil integrierte HBV-DNA, sowie cccDNA. Durch die „Hirth-Extraktion“ (siehe Methoden 3.4.1) wurde die chromosomale DNA aus diesen HepG2.2.15 durch die hohe Salzkonzentration des Hirth-Extrakts ausgefällt und die episodale DNA (cccDNA) konnte im Überstand isoliert werden. Die extrahierte episodale DNA wurde wieder unter unveränderten Bedingungen in der real-time PCR als Template eingesetzt und die Amplifikate anschließend in einer Elektrophorese analysiert. Als Ergebnis ist im Agarosegel in der Abbildung 4.1.4 zu sehen, dass nur die isolierte episodale DNA (cccDNA) aus HepG2.2.15 Zellen nach Hirth-Extraktion amplifiziert wurde, nicht jedoch die gesamt-DNA, die auch genomisch integrierte HBV-DNA Trimere enthält.



**Abb. 4.1.4: Elektrophoretische Analyse der LightCycler-Amplifikate im 2%igen Agarosegel.** In den gezeigten Banden finden sich Amplifikate der obigen Templates. Dabei wurden verschieden extrahierte DNA Templates verwendet. Die Plasmide wurden mittels Maxipräparation gewonnen, wohingegen die HepG2-Zellen, HepG2.2.15-Zellen und die HBV-Viren mit HepG2-Zellen einmal durch Hirth-Extrakt (A) und einmal mit Extraktionkit von Firma Roche (B) extrahiert wurden. Dabei wurde nur der Überstand, der episomale DNA enthalten sollte, in der PCR eingesetzt. Die Bandenhöhe, die die Position der HBV-Amplifikate kennzeichnet, ist mit einem Pfeil angegeben. Aufgetragen wurden in der linken Spur Marker pUC-Mix, dessen 502 bp-Bande seitlich gekennzeichnet ist.



**Abb. 4.1.4 A:** Zeigt die zu Abbildung 4.1.4 zugehörigen Schmelzkurven, die beim Ablösen der Hybprobes vom Template gemessen werden können. 1: HepG2 Zellkerne mit Hirth-Extrakt gewonnen; 2: HepG2.2.15 mit Extraktionkit von Firma Roche extrahiert; 3: Virales Genom; 4: HepG2.2.15 mit Hirth-Extraktion (Genotyp D) gewonnen; 5: Plasmid-DNA Kovalent geschlossen (cccDNA, Genotyp A). 1-3 zeigen eine unspezifische, schwache Bindung der Hybprobes.

Durch den obigen Versuch konnte gezeigt werden, dass durch die Hirth-Extraktion eine niedrige cccDNA Konzentration von vielleicht kleiner als  $1 \times 10^1$  quantifiziert werden kann. Diese differenzierte Amplifikation war mit anderen Extraktionsmethoden nicht möglich. Die Mengen an Plasmid und Virusgenom wurde vorher in einer PCR (X-Bereich) quantifiziert. Diese PCR amplifiziert Sequenzen in der X-Region unabhängig von der Genomstruktur der HBV DNA (cccDNA oder nick.gap). Das Ergebnis dieses real-time PCR-Laufes ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die HepG 2-Zellen negativ reagieren. Das als Negativkontrolle eingesetzte gereinigte Virus wurde als rcDNA amplifiziert. Die rcDNA in den HepG2.2.15 Zellen wurde ebenfalls in der X-PCR amplifiziert.

**Tab. 4.1.1: Ergebnisse der real-time PCR, mittels derer die X-Region des HBV amplifiziert wird. Die eingesetzten Templates (Proben) unterscheiden sich in ihrer Extraktionsmethode. Alle Plasmide wurden als Maxipräparation isoliert, wohingegen das Virus durch Hirth-Extraktion gewonnen wurde.**

Proben	Standard	Gemessene Konzentration	Crossingng-Point	cccDNA
Virales Genom	2.5E+05	2.5E+05	23.14	-
Virales Genom	2.5E+04	2.5E+04	26.82	-
Virales Genom	2.5E+03	2.5E+03	30.48	-
Virales Genom	2.5E+02	2.5E+02	34.14	-
Virales Genom	2.5E+01	2.5E+01	37.76	-
Virales Genom	2.5E+00			-
HBV Plasmid 1E+05		1.3E+05	25.12	+
HBV Plasmid 1E+04		1.7E+04	27.28	+
HBV Plasmid 1E+03		0.4E+04	28.83	+
HBV Plasmid 1E+02		1.4E+02	35.86	+
HBV Plasmid 1E+01		1.3E+00	38.59	+
HBV Plasmid 1E+00		-		+
HepG2 (Hirt)		-		-
HepG2 (Roche)		-		-
HepG2.2.15 (Hirt)		4.3E+05	22.28	+
HepG2.2.15 (Roche)		1.0E+07	17.23	-
Wasser (neg. Kontr.)		-		-

Um sicher zu gehen, dass die spezifische Amplifikation der cccDNA gewährleistet ist, wurden verschiedene PCR-Parameter variiert und die PCR-Produkte ausgewertet. Sehr wahrscheinlich ist nicht nur die Trennung der chromosomalen von der episomalen DNA

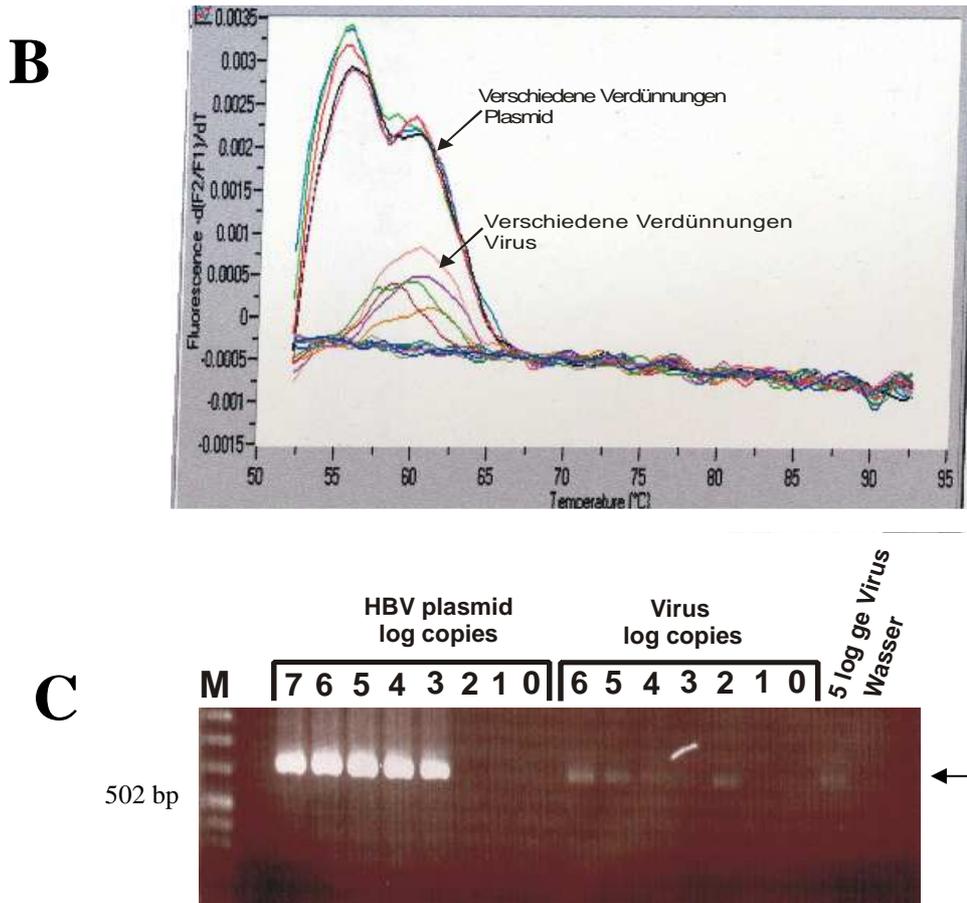
für die Quantifizierung der cccDNA relevant, sondern auch die Annealing-Temperatur der Primer und Hybridisierungs sonden. Die richtige Temperatur ist dafür verantwortlich, dass in der real-time PCR nicht die rcDNA des Virus, sondern nur die cccDNA amplifiziert wird, indem die spezifische Bindungsaffinität der Primer auf die spezifische cccDNA-Struktur optimiert wird. Dazu wurde die Virus-DNA aufgereinigt und eine Verdünnungsreihe angelegt, die bei unterschiedlichen Annealing-temperaturen amplifiziert wurde. Die Ergebnisse der LightCycler Läufe werden im folgendem einzeln nacheinander gezeigt.

### 1. Annealing Temperatur 64°C:

Die rcDNA des Virus wurde im LightCycler nicht quantifiziert, jedoch sind spezifische Schmelzkurven der Virusverdünnungsreihe zu sehen. Zudem konnten im Agarosegel schwache spezifische Bande gezeigt werden.

**A**

Proben	Standard	Gemessene Konzentration	Crossing-Point
HBV Plasmid	6.67E+07	5.77E+07	19.34
HBV Plasmid	6.67E+06	6.81E+06	23.16
HBV Plasmid	6.67E+05	1.09E+06	26.47
HBV Plasmid	6.67E+04	4.12E+04	32.34
HBV Plasmid	6.67E+03	7.45E+03	35.41
HBV Plasmid	6.67E+02		
HBV Plasmid	6.67E+01		
HBV Plasmid	6.67E+00		
Virus 2.5E+05			
Virus 2.5E+04			
Virus 2.5E+03			
Virus 2.5E+02			
Virus 2.5E+01			
Virus 2.5E+00			
Wasser			



**Abb.4.1.5: Zusammenstellung der LightCycler Daten zum Nachweis der cccDNA bei einer Annealing Temperatur von 64°C.** Unter Punkt A sind die LightCycler Daten tabellarisch zusammen gefasst. Abbildung B zeigt die Schmelzkurven, die beim Ablösen der Primer vom Template gemessen werden können. Unter Abbildungspunkt C sind die Banden im Agarosegel zu sehen, die sowohl nach ihrer Bandenhöhe als auch nach der Intensität der Bandendicke analysiert werden können.

**2. Annealing Temperatur 60°C:**

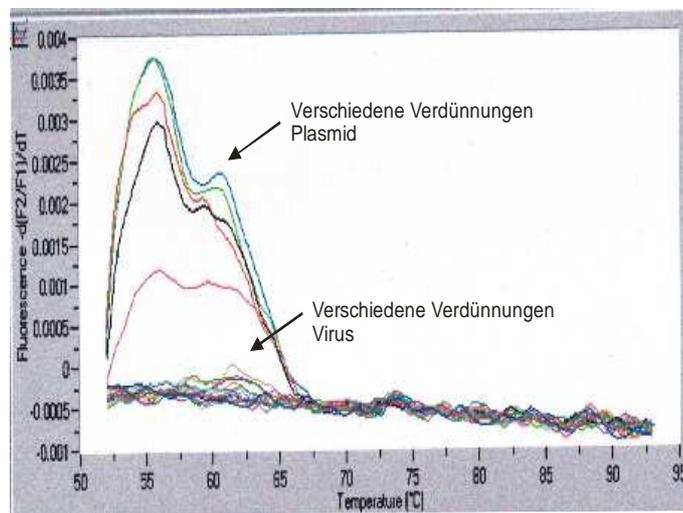
Die rcDNA konnte nicht amplifiziert werden, zudem zeigen sich jetzt keine spezifischen Schmelzkurven im LightCycler. Die spezifischen Banden im Agarosegel sind schmaler.

**A**

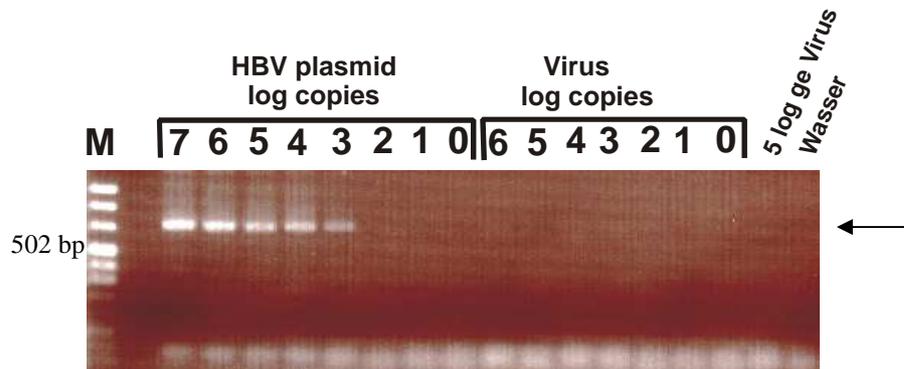
Proben	Standard	Gemessene Konzentration	Crossinng-Point
HBV Plasmid	6.67E+07	6.43E+07	17.06
HBV Plasmid	6.67E+06	8.00E+06	21.17
HBV Plasmid	6.67E+05	6.07E+05	26.24

HBV Plasmid	6.67E+04	5.42E+04	31.00
HBV Plasmid	6.67E+03	7.81E+03	34.81
HBV Plasmid	6.67E+02		
HBV Plasmid	6.67E+01		
HBV Plasmid	6.67E+00		
Virus 2.5E+05			
Virus 2.5E+04			
Virus 2.5E+03			
Virus 2.5E+02			
Virus 2.5E+01			
Virus 2.5E+00			
Wasser			

**B**



**C**



**Abb. 4.1.6:** Zusammenstellung der LightCycler Daten zum Nachweis der cccDNA bei einer Annealing Temperatur von 60°C. Unter Punkt A sind die LightCycler Daten tabellarisch zusammen gefasst. Abbildung B zeigt die Schmelzkurven, die beim Ablösen der Primer vom Template gemessen werden können. Und unter Abbildungspunkt C sind Templatebanden im Agarosegel zu sehen, die sowohl nach ihrer Bandenhöhe als auch nach der Intensität der Bandendicke analysiert werden können.

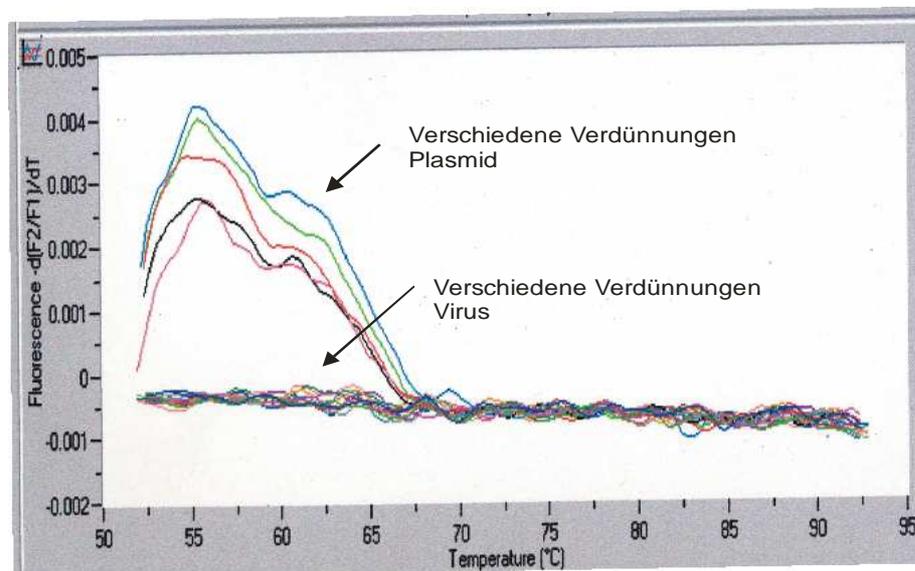
### 3. Annealing Temperatur 57°C:

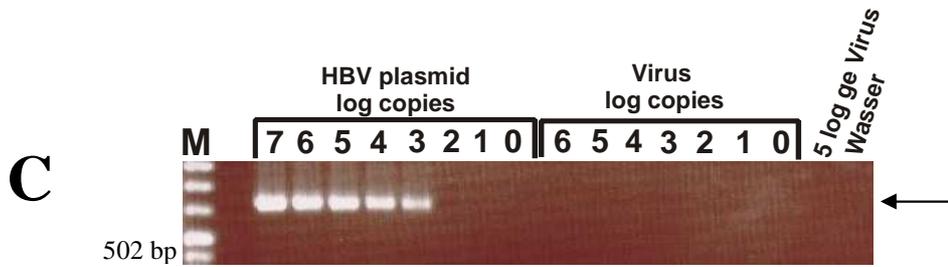
Die rcDNA wurde nicht amplifiziert, weiterhin zeigen sich keine spezifische Schmelzkurven im LightCycler und jetzt sind auch keine spezifischen Banden im Agarosegel zu sehen.

**A**

Proben	Standard	Gemessene Konzentration	Crossing-Point
HBV Plasmid	6.67E+07	6.00E+07	16.33
HBV Plasmid	6.67E+06	5.32E+06	20.66
HBV Plasmid	6.67E+05	1.51E+06	22.92
HBV Plasmid	6.67E+04	3.92E+04	29.44
HBV Plasmid	6.67E+03	6.99E+03	32.52
HBV Plasmid	6.67E+02		
HBV Plasmid	6.67E+01		
HBV Plasmid	6.67E+00		
Virus 2.5E+05			
Virus 2.5E+04			
Virus 2.5E+03			
Virus 2.5E+02			
Virus 2.5E+01			
Virus 2.5E+00			
Wasser			

**B**





**Abb. 4.1.7: Zusammenstellung der LightCycler Daten zum Nachweis der cccDNA bei einer Annealing Temperatur von 57°C.** Unter Punkt A sind die LightCycler Daten tabellarisch zusammen gefasst. Abbildung B zeigt die Schmelzkurven, die beim Ablösen der Primer vom Template gemessen werden können. Und unter Abbildungspunkt C sind die Templatebanden im Agarosegel zu sehen, die sowohl nach ihrer Bandenhöhe als auch nach der Intensität der Bandendicke analysiert werden können.

**Zusammenfassend aus den verschiedenen real-time PCR-Läufen kann man den Einfluss der Annealing-Temperatur wie folgt bewerten:**

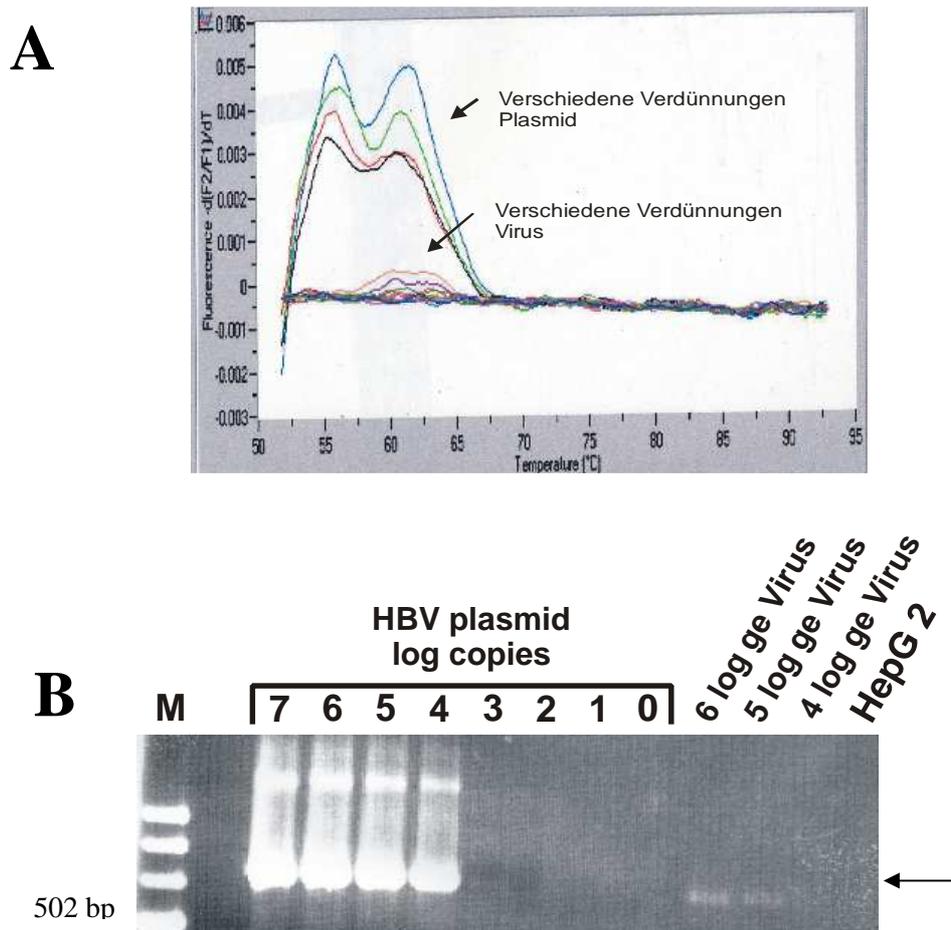
**Tab. 4.1.2: Gegenüberstellung des Einflusses der Annealingtemperatur auf die spezifische Amplifikation der Virus DNA und cccDNA (Dimer Plasmid).**

Annealing temp. [°C]	Virus-DNA (nick-gap)		Dimer-Plasmid (cccDNA)	
	Gelbild	LightCyclerkurve	Gelbild	LightCyclerkurve
64	++	- (Schmelzkurve positiv)	+++ bis 10 <sup>3</sup>	+++ bis 10 <sup>3</sup>
60	+	- (Schmelzkurve positiv)	+++ bis 10 <sup>3</sup>	+++ bis 10 <sup>3</sup>
57	-	-	+++ bis 10 <sup>3</sup>	+++ bis 10 <sup>3</sup>

Als weiterer PCR-Parameter wurde die Zeitspanne zum Erhitzen bzw. Abkühlen verändert und die amplifizierten PCR-Produkte kontrolliert, um zu untersuchen, ob die Amplifikation der cccDNA spezifisch bleibt. Besonders die schnelle Temperatureinstellung der PCR-Schritte pro Zyklus ist entscheidend dafür, dass die cccDNA amplifiziert wird, wohingegen die rcDNA nicht amplifiziert wird.

Die real-time PCR stellt die Temperatur von Denaturierungsphase (95°C) auf Annealingphase (57°C) mit einer Geschwindigkeit von 20°C/sec. um. Das Erreichen der

Elongationsphasetemperatur (72°C) ist mit einer Geschwindigkeit von 5°C/sec möglich. In dem Versuch wurde die Geschwindigkeit der Temperaturänderung auf 2°C/sec für alle Schritte eingestellt. Das Amplifikat wurde anschließend wieder im Agarosegel analysiert.



**Abb. 4.1.8: Einfluß der Geschwindigkeit der Temperaturveränderungen auf die Spezifität der real-time PCR.** Abbildung A zeigt die Schmelzkurven, die beim Ablösen der Primer vom Template gemessen werden können. Abbildung B zeigt die elektrophoretische Analyse der LightCycler-Amplifikate im 2%igen Agarosegel. Aufgetragen wurden in der linken Spur Marker pUC-Mix, dessen 502 bp-Bande seitlich gekennzeichnet ist. In den anschließenden Banden finden sich Amplifikate der obigen Templates. In diesem LightCycler Lauf wurde die Geschwindigkeit der Temperaturveränderungen innerhalb eines Zyklus stark erniedrigt von 20°/sec auf 2°C/sec, wie es in Tabelle 4.1.3 zusammengefasst ist. Die Bandenhöhe, die die Position der HBV-Amplifikate kennzeichnet, ist mit einem Pfeil angegeben.

**Tab.4.1.3: Temperatureinstellung der PCR-Schritte pro Zyklus**

Phasen	Slope [°C/sec.]	Virus-DNA		Plasmid	
		Spez. Banden	LightCyc lerkurve	Spez. Banden	LightCyc lerkurve
Denaturierung (95°C)	2 (20*)				
Annealing (57°C)	2(20*)	+	-	+	+
Elongation (72°C)	2 (5*)				

In Klammern befinden sich die optimierten Werte

**Zusammenfassend aus den vorhergehenden Experimenten kann man festhalten, dass zur spezifischen Amplifikation der cccDNA die folgende Vorgehensweise das bestmögliche Ergebnis liefert.**

Optimiertes Protokoll:
„Hirth-Extraktion“ zur Trennung der chromosomale DNA von der cccDNA (siehe Methoden 3.4.1)
PCR-Protokoll mit eine Annealingtemperatur von 57°C (siehe Methoden 3.5.2)
PCR-Protokoll mit Slope 20°C/Sec. (siehe Methoden 3.5.2)

## 4.2 Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV

### 4.2.1 Bildung der cccDNA

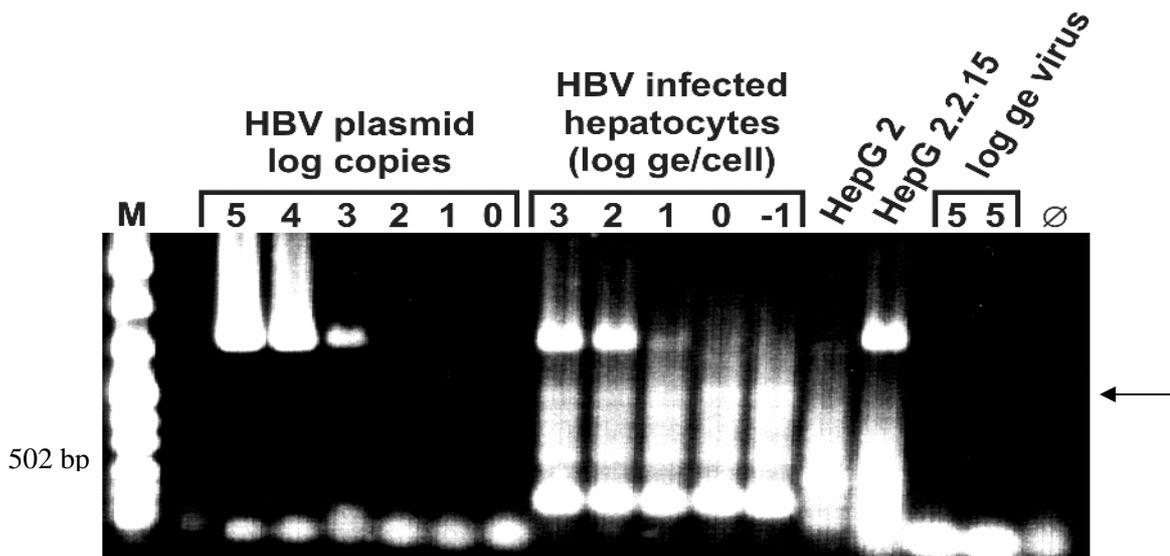
Zur Detektion von cccDNA in Hepatozyten dienten bisher die HepG2.2.15 Zellen (Sells et. al., 1987), die in ihrem Genom Tetramere des HBV Genoms stabil integriert haben. Nun sollte die cccDNA aus Zellen isoliert werden, die keine HBV-DNA integriert haben. Dazu dienten mit HBV infizierte primären Tupaia Hepatozyten. Die Ergebnisse der cccDNA PCR von infizierten primären Tupaia Hepatozyten mit unterschiedlichen

Konzentrationen an HBV sind in der Tabelle 4.2.1 dargestellt. Dabei wurde nach der Methode in Kapitel 3.1.4 vorgegangen, die real-time PCR wurde nach dem optimierten Protokoll durchgeführt. Bei den Platten 1, 2 und 3 konnte, im Gegensatz zu Nummer 4 und 5, ein Amplifikat mittels LightCycler ermittelt werden. Die nukleäre cccDNA konnte bis zu einer Infektionsdosis von  $1 \times 10^1$  GE/Hepatozyt nachgewiesen werden. Die Auswertung in der Agarose-Gelelektrophorese ist mit dem Ergebnis der LightCycler-Messung übereinstimmend. Im Gel in der Abbildung 4.2.1 ist eine spezifische Bande bei den Platten 1, 2 und 3 zu sehen. Die Bande bei  $10$  GE/Hepatozyt ist sehr schwach, dies ist mit der geringeren Quantifizierung im LightCycler vereinbar.

Mit  $1$  GE/Hepatozyt oder  $0,1$  GE/Hepatozyt ließ sich keine cccDNA nachweisen. Mit dem Inokulum von  $1000$ /Hepatozyt konnte nicht mehr cccDNA erzeugt werden als mit  $100$ /Hepatozyt, was für eine Sättigung des Systems spricht.

**Tab. 4.2.1: Titrationsreihe primärer Tupaia Hepatozyten, die mit unterschiedlichen Virusmengen inkubiert wurden. Die etablierte Infektion wurde durch den Nachweis der cccDNA quantitativ und qualitativ protokolliert.**

	HBV GE/ml im Inokulum	HBV GE/ Hepatozyt	Menge cccDNA im LightCycler	cccDNA/Zelle 100% Infektion	cccDNA/Zelle 10% Infektion
Platte 1	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	7	70
Platte 2	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^5$	7	70
Platte 3	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^1$	$1,6 \times 10^4$	0,8	8
Platte 4	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^0$	/	/	/
Platte 5	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^{0,1}$	/	/	/
Platte 6	0	0	0	0	0
HepG2.2.15			$3,2 \times 10^5$	320	



**Abb. 4.2.1:** Elektrophoretische Auftrennung der LightCycler Amplifikate im Agarosegel (2%). Die linke Spur zeigt den Marker pUC-Mix, dessen 502 bp-Bande an der linken Seite gekennzeichnet ist. Die übrigen Banden enthalten die Amplifikate der darüber genannten Templates. Der Pfeil rechts kennzeichnet die spezifische Bandenhöhe für das HBV-Amplifikat (cccDNA). Gezeigt wird eine Titrationsreihe von primären Hepatozyten, die mit unterschiedlichen Virusmengen infiziert wurden. Die Proben aus HepG2- und HepG2.2.15-Zellen stellen positiv bzw. negativ Kontrollen dar (nach Glebe et al. 2003 modifiziert).

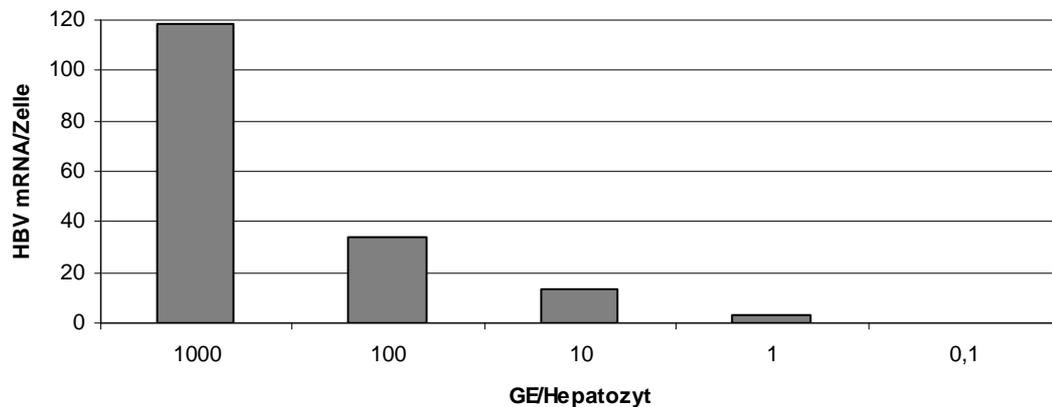
#### 4.2.2 Bildung der HBV mRNA

Ein weiterer Marker bei der etablierten Virusinfektion stellt neben der cccDNA die HBV messenger-RNA (mRNA) dar. Diese sollte mittels RT-PCR detektiert werden, um die vorherigen Ergebnisse, die durch die Quantifizierung der cccDNA gewonnen wurden, einordnen zu können und die Infektionsreihen mit verschiedenen Virusmengen besser analysieren zu können. Die anschließenden RT-PCR-Versuche wurden entsprechend dem Kapitel 3.5.3 angefertigt. Die Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis der Gesamt-RNA sind in Tabelle 4.2.2 zu sehen. Die Quantifizierung intrazellulärer mRNA ist ab einer Infektion mit 1 GE/Hepatozyt möglich. Je höher die Konzentration des Virusinokulates ist, desto höher ist die im LightCycler quantifizierte HBV mRNA-Menge. Bei einer Infektion von  $1 \times 10^8$  HBV GE/Hepatozyt sind ca. 118 mRNA pro Zelle transkribiert worden, wenn man annimmt, dass ca. 10% der Zellen infiziert sind. Es ist zu erkennen, dass bei sinkender Konzentration des Virusinokulates um den Faktor 10, das HBV-Transkriptom um den Faktor 3 abnimmt. In der Negativkontrolle wurde

keine mRNA nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde die mRNA aus der Zelllinie HepG2.2.15 isoliert und im LightCycler quantifiziert.

**Tab. 4.2.2: Quantitativer und qualitativer Nachweis viraler mRNA in primären Tupaia Hepatozyten. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen inkubiert und anschließend in der real-time PCR analysiert.**

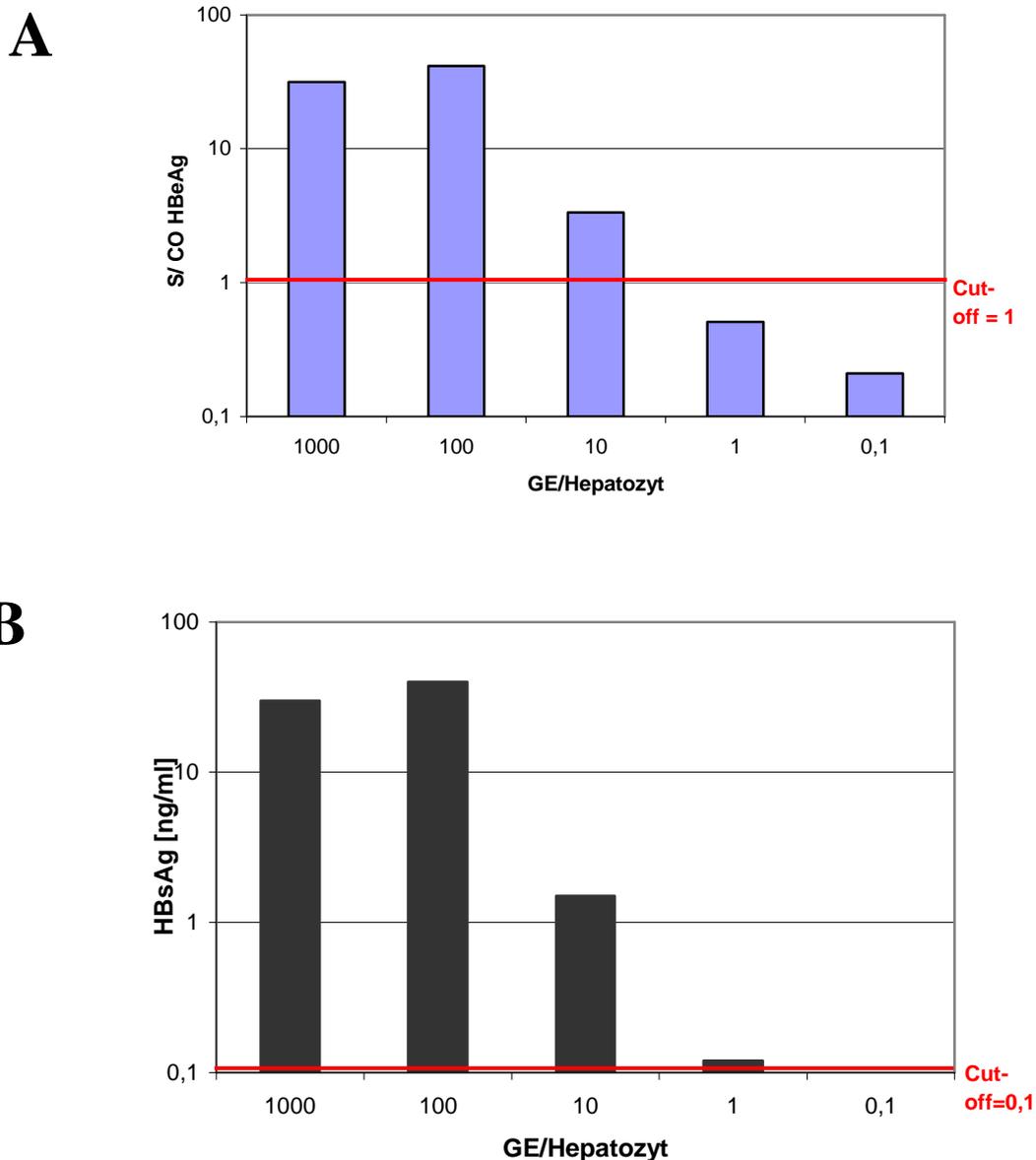
	HBV GE/ml im Inokulum	HBV GE/ Hepatozyt	Menge mRNA im Lightcycler	mRNA/Zelle bei 100% Infektion	mRNA/Zelle bei 10% Infektion
Platte 1	$1 \times 10^8$	1000	$1,14 \times 10^6$	118,8	1188
Platte 2	$1 \times 10^7$	100	$3,30 \times 10^5$	34,3	343
Platte 3	$1 \times 10^6$	10	$1,32 \times 10^5$	13,7	137
Platte 4	$1 \times 10^5$	1	$3,10 \times 10^4$	3,2	32
Platte 5	$1 \times 10^4$	0,1	/	/	/
Platte 6	0	0	0	0	0
HepG2.2.15			$7,1 \times 10^5$	327	



**Abb. 4.2.2: Quantitativer Nachweis von viraler mRNA in Abhängigkeit zur Viruslast während der Infektion von primärer Tupaia Hepatozyten nach 12 Tagen.**

Während der Infektionsversuche wurde nicht nur der intrazelluläre Status der Infektion anhand von mRNA und cccDNA Bestimmung dokumentiert, sondern auch der Zellkulturüberstand gesammelt, in dem sich die sekretierten viralen Antigene HBeAg und HBsAg bestimmen lassen, die den Abschluss einer erfolgten Etablierung der Infektion und die Infektionsrate anzeigen. Beide Virusantigene werden mittels ELISA

quantifiziert. In der folgenden Abbildung 4.2.3 A ist die Höhe der HBeAg-Sekretion dargestellt. Die HBeAg-Sekretion der infizierten Hepatozyten ist von der Konzentration des Virusinokulates abhängig. Eine spezifische Infektion der Hepatozyten mit HBV ist ab MOI 10 (10 GE/Zelle) in HBeAg Signal nachzuweisen. Das HBeAg-Signal lag bei einer Infektion mit 1 GE/Zelle und 0,1 GE/Zelle unter dem cut-off.



**Abb. 4.2.3: Titration der minimalen Virusmenge, die zur Infizierbarkeit primärer Tupaia Hepatozyten notwendig ist.** Teilabbildung A: Die Infektion wurde anhand des Virusparameter HBeAg im ELISA bestimmt. B: Infektionsbestimmung durch den Virusparameter HBsAg (ELISA). S/co= Signal to cut-off. GE= Genomäquivalent.

Bei den Hepatozyten, die mit 1000 GE/Zelle infiziert wurden, lag die HBsAg-Konzentration deutlich über dem cut-off. Eine Infektion mit MOI 1 zeigte eine geringe Neusynthese an HBsAg, wohingegen kein HBsAg-Signal bei einer Infektion mit 0.1 GE/Zelle nachzuweisen war (Abbildung 4.2.3 B).

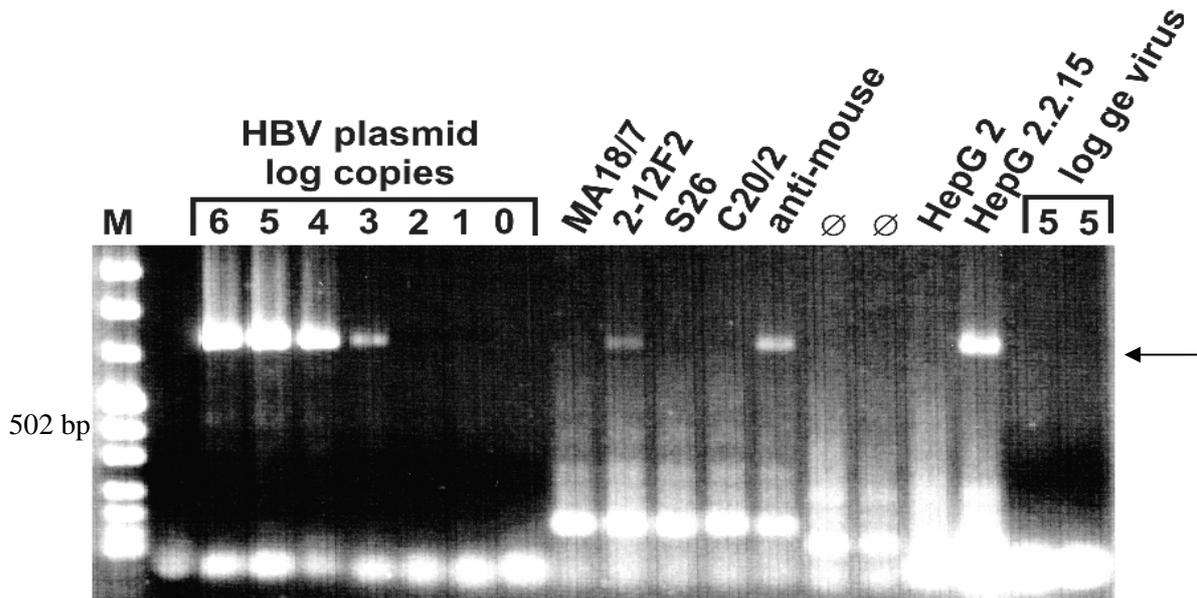
### **4.3 Neutralisation der HBV Infektion von primären Tupaia Hepatozyt-Kulturen**

In diesem Versuch sollte die spezifische Inhibition der HBV Infektion von Tupaia Hepatozyten untersucht werden. Dazu wurde das gereinigte Virus zusammen mit spezifischen Antikörpern, deren Bindungsposition zum Teil bekannt ist, auf die primären Hepatozyten gegeben. Die Infektionsversuche entsprechen den vorherigen. Sollten die Antikörper an einer Virusstelle binden, die für die Bindung und Aufnahme in die Wirtszelle essentiell ist, kann dieser Vorgang nicht mehr stattfinden und entsprechend keine Infektion etabliert werden. Sollte die Virusinfektion demnach inhibierbar sein, würden die Infektionsparameter reduziert. Bleiben die Versuchsdaten jedoch in ähnlichen Bereichen wie die vorher gezeigten, findet keine Neutralisation statt. Die monoklonalen Antikörper wurden so gewählt, dass verschiedene Bereiche des Virus erkannt werden. Als Anti-S Antikörper wurde C20/2 verwendet. Anti-PreS2 Antikörper waren 2-12F2 und S26. MA 18/7 wurde als Anti-PreS1 eingesetzt. Vor der Infektion der Hepatozyten mit  $1 \times 10^3$  Viren/Zelle, wurden die Viren mit den Antikörpern für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Am zwölften Tag nach der Infektion wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt und in PBS aufgenommen und zur cccDNA- und Gesamt-mRNA-Bestimmung verarbeitet (siehe Methoden 3.1.5). Aus den Überständen wurde mittels ELISA die Menge an produziertem HBsAg und HBeAg bestimmt. Die Ergebnisse der Quantifizierung der cccDNA mittels LightCycler lassen sich mit den Ergebnissen der sekretierten Virusproteine vereinbaren. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.3.1 dargestellt. In den infizierten Hepatozyten, die mit Anti-PreS2 (2-12F2 und S26) inhibiert wurden, ist cccDNA noch nachweisbar, d.h. die Infektion wurde nicht vollständig inhibiert. Die Infektion wurde jedoch durch Anti-S (C20/2) und Anti-PreS1 (MA18/7) vollständig inhibiert und daher ist auch kein Amplifikat der cccDNA PCR vorhanden. Die LightCycler Quantifizierung stimmt mit der Auswertung in der Agarose-Gelelektrophorese überein (Abbildung 4.3.1). Es sind spezifische

Banden (ca. 734 Basenpaare) bei den Versuchsansätzen ersichtlich, bei denen die Infektion nicht inhibiert wurde.

**Tab. 4.3.1:** Neutralisation der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten Kulturen mit Antikörper gegen die HBV-Hüllproteine. Die stattgefundene Infektion wurde anhand der cccDNA quantitativ und qualitativ protokolliert.

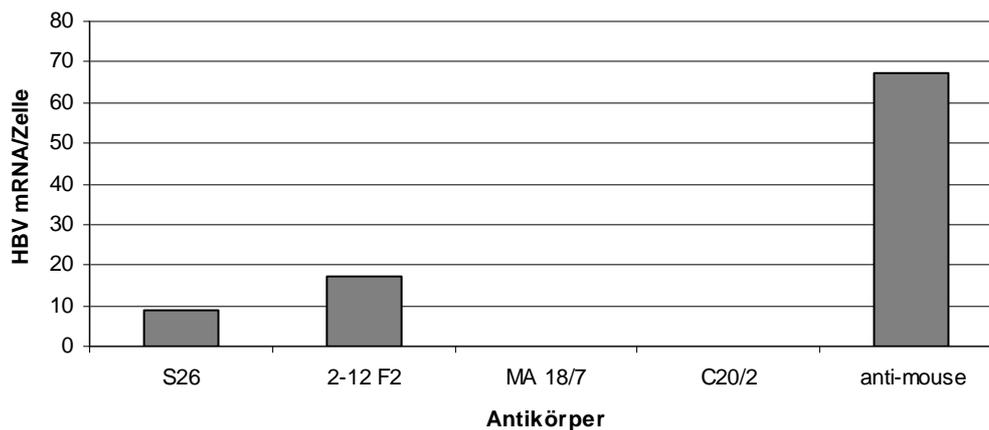
	HBV GE/ml im Inokulum	Antikörper (AK)	Menge cccDNA im Lightcycler	cccDNA/Zelle 100% Infektion	cccDNA/Zelle 10% Infektion
Platte 1	$1 \times 10^8$	C 20/2	/	/	/
Platte 2	$1 \times 10^8$	MA18/7	/	/	/
Platte 3	$1 \times 10^8$	S 26	$4,5 \times 10^3$	0,2	2
Platte 4	$1 \times 10^8$	2-12F2	$4,5 \times 10^4$	2	20
Platte 5	$1 \times 10^8$	anti-mouse	$1,1 \times 10^5$	5,5	55
Platte 6	0	/	0	/	/
HepG2.2.15		/	$3,2 \times 10^5$	320	/



**Abb. 4.3.1:** Gezeigt wird eine Infektion von primären Tupaiazellen, bei der verschiedene HBV-Anteile durch spezifische Antikörper vor dem Zellkontakt blockiert wurden. Elektrophoretische Auftrennung der LightCycler Amplifikate im Agarosegel (2%). Die linke Spur zeigt den Marker pUC-Mix, dessen 502 bp-Bande an der linken Seite gekennzeichnet ist. Die übrigen Banden enthalten die Amplifikate der darüber genannten Templates. Der Pfeil kennzeichnet die spezifische Bandenhöhe für das HBV-Amplifikat der cccDNA (nach Glebe et al. modifiziert).

**Tab. 4.3.2: Quantitativer und qualitativer Nachweis viraler mRNA in primäre Tupaia Hepatozyten. Die infizierten Zellen wurden mit unterschiedlichem Antikörper vorinkubiert.**

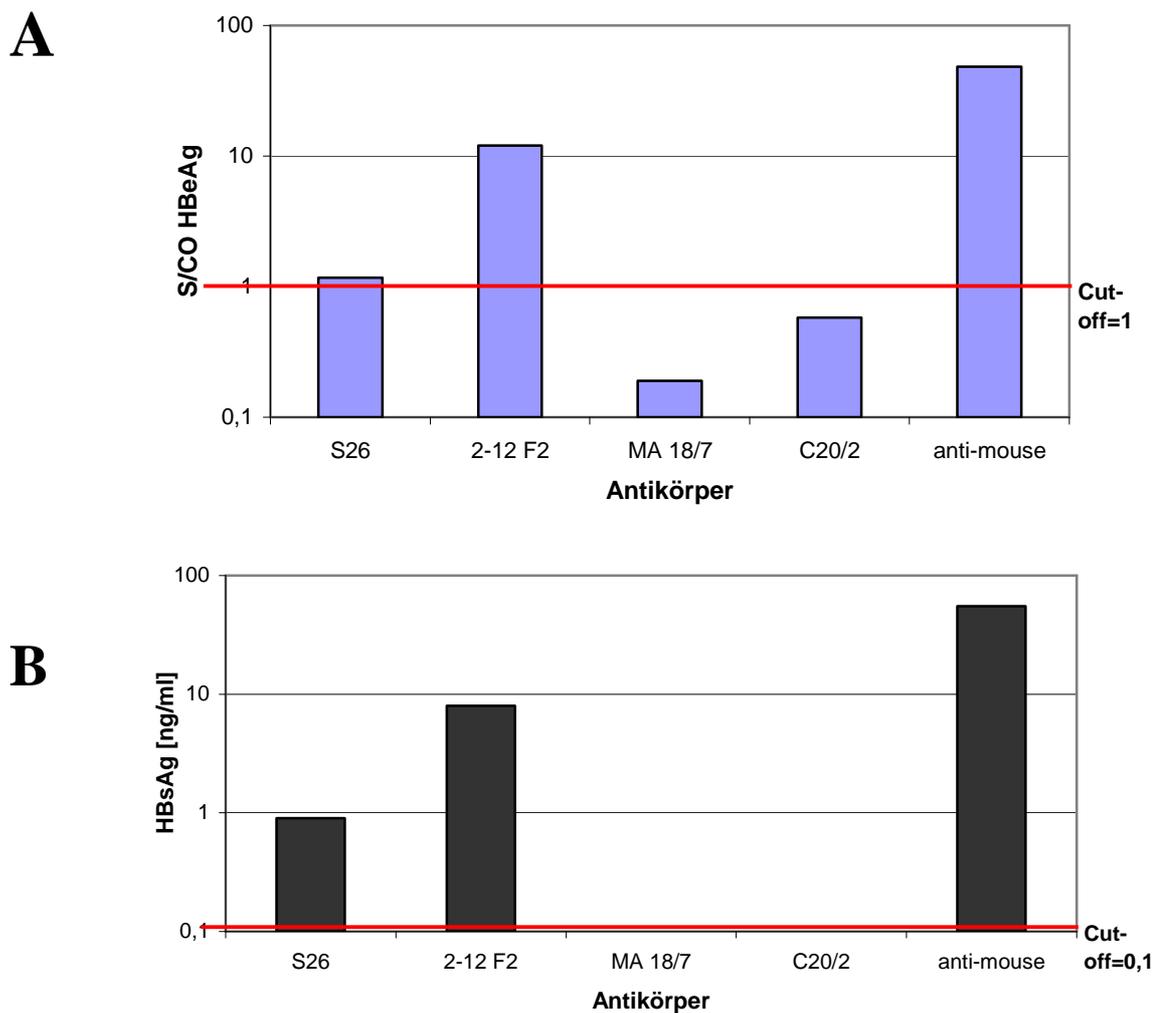
	HBV GE/ml im Inokulum	Antikörper (AK)	Menge der Gesamt-RNA		
			im Lightcycler	pro Zelle	10% Infektion
Platte 1	$1 \times 10^8$	C 20/2	/	/	
Platte 2	$1 \times 10^8$	MA18/7	/	/	/
Platte 3	$1 \times 10^8$	S 26	$8,3 \times 10^4$	8,6	86
Platte 4	$1 \times 10^8$	2-12F2	$1,8 \times 10^5$	17,4	174
Platte 5	$1 \times 10^8$	anti-mouse	$6,4 \times 10^5$	67	670
Platte 6	0	/	0	/	/
HepG2.2.15		/	$7,1 \times 10^5$	327	/



**Abb. 4.3.2: Quantitativer Nachweis von viraler mRNA bei infizierten primären Tupaia Hepatozyten. Die Viren wurden mit verschiedenen monoklonalen Antikörper gegen die HBV Hüllproteine präinkubiert.**

In der Abbildung 4.3.3 A ist als Infektionsmarker die HBeAg-Sekretion dargestellt. Es ist eine HBeAg-Sekretion bei den Platten zu sehen, die mit einem Antikörper gegen PreS2-Domäne (2-12F2 und S26) inhibiert wurde. Die Platten, die mit einem Antikörper gegen S-Domäne (C20/2) und PreS1-Domäne (MA 18/7) inhibiert wurden, zeigen keine Neusynthese von HBeAg. In den nicht infizierten Platten wurde ebenfalls kein HBeAg-Signal nachgewiesen. Im unteren Diagramm, Abbildung 4.3.3 B, ist die HBsAg-Konzentration dargestellt. Es wird deutlich, dass die Infektion mit Anti-S C20/2

und mit Anti-PreS1 MA 18/7 inhibierte wurde, da kein HBsAg-Signal zu sehen ist. Die Infektion konnte jedoch durch Anti-PreS2 Antikörper nicht vollständig gehemmt werden da auch neusynthetisiertes HBsAg in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden konnten. Anhand dieser Daten kann der Virusbereich, der für eine etablierte Infektion notwendig ist, genauer eingegrenzt werden. Aufgrund dieser Erkenntnis kann zum Beispiel auch geprüft werden, ob die bisher verwendeten Impfantigenen einen optimalen Schutz vor einer HBV Infektion darstellen oder ob ein Wechsel auf einen anderen Zielantikörper Vorteile bringen könnte.



**Abb. 4.3.3:** **A: Hemmung der HBe-Antigen-Sekretion in primären Tupaia Hepatozyten. B: Hemmung der HBs-Antigen-Sekretion in primären Tupaia Hepatozyten.** Durch die Präinkubation der Viren mit den Antikörpern vor der Infektion wird eine Verminderung der Infektion erreicht, die dann zu einer geringeren HBeAg und HBsAg Sekretion führt.

## **4.4 Kinetik der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV**

Im folgenden Versuch sollte der Zeitpunkt des Auftretens von HBV-Replikationsintermediaten und von sekretorischen, viralen Proteine nachgewiesen werden, sowie ihr Replikations- und Sekretionsverlauf dokumentiert werden.

Es wurden 16 Zellkultur-Platten (5 cm Durchmesser) primäre Tupaia Hepatozyten mit  $1 \times 10^6$  Virionen/Zelle infiziert (siehe Methoden 3.1.5) und es wurden täglich die Hepatozyten im Doppelansatz abgenommen, um daraus die cccDNA (siehe 3.5.2) und Gesamt-mRNA (siehe 3.5.3) zu isolieren. Pro Platte wurden  $5 \times 10^4$  Zellen ausplattiert und täglich Medium gewechselt. Zusätzlich wurden aus den Zellkulturüberständen mittels ELISA HBsAg und HBeAg bestimmt (siehe Methoden 3.2).

### **4.4.1 Zeitpunkt des Auftretens und Verlauf der Replikation von HBV**

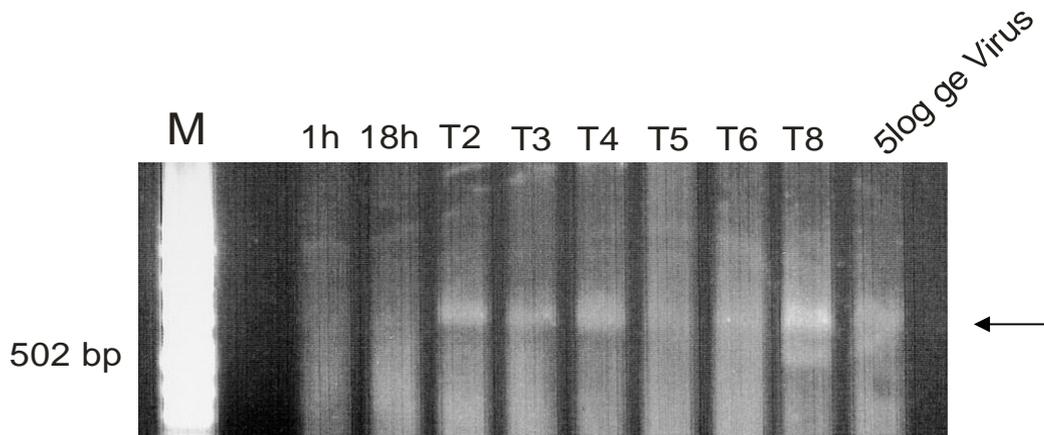
#### **Replikationsintermediaten (cccDNA und Gesamt-RNA)**

Die Menge der cccDNA in den infizierten, primären Tupaia Hepatozytenkulturen wurde mittels optimierter real-time PCR quantifiziert. Wie in Abb. 4.4.1.1 beschrieben, ist eine Stunde nach der Infektion keine cccDNA detektierbar. 18 Stunden nach der Infektion war die cccDNA in den Hepatozytenkulturen nachzuweisen. Ab Tag 2 bis Tag 5 war mit dem LightCycler keine cccDNA Quantifizierung möglich. Am 7. Tag war ein hundertfacher Anstieg an cccDNA-Konzentration nachzuweisen.

**Tab. 4.4.1.1: Quantitativer und qualitativer Nachweis viraler cccDNA in primären Tupaia Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion.**

	Zeit nach der Infektion	Gelbild	Menge cccDNA im Lightcycler	cccDNA/Zelle bei 100% Infektion	cccDNA bei 10% Infektion
Platte 2	1h	-	0	0	0
Platte 4	18h	-	$2,6 \times 10^3$	0,26	26
Platte 6	T2	+	/	/	/
Platte 8	T3	+	/	/	/
Platte 10	T4	+	/	/	/
Platte 12	T5	+	/	/	/
Platte 14	T6	+	$2,4 \times 10^5$	24	240
Platte 16	T8	+	/	/	/
Platte 18	negativ	-	0	0	0

In der Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 4.4.1.1) wurde das Amplifikat der cccDNA PCR aufgetrennt. Das Amplifikat hat eine Länge von 734 Basenpaaren. Bei den Hepatozytenkulturen, die eine Stunde nach der Infektion abgenommen wurde, ist kein Amplifikat im Gel detektiert worden. Ab 18 Stunden nach der Infektion ist eine spezifische Bande bei ca. 734 Basenpaaren zu erkennen. Auch wenn im LightCycler keine cccDNA für die Tage 2 bis 5 und für den achten Tag quantifiziert werden konnte, sind im Agarosegel spezifische Banden visuell nachweisbar.

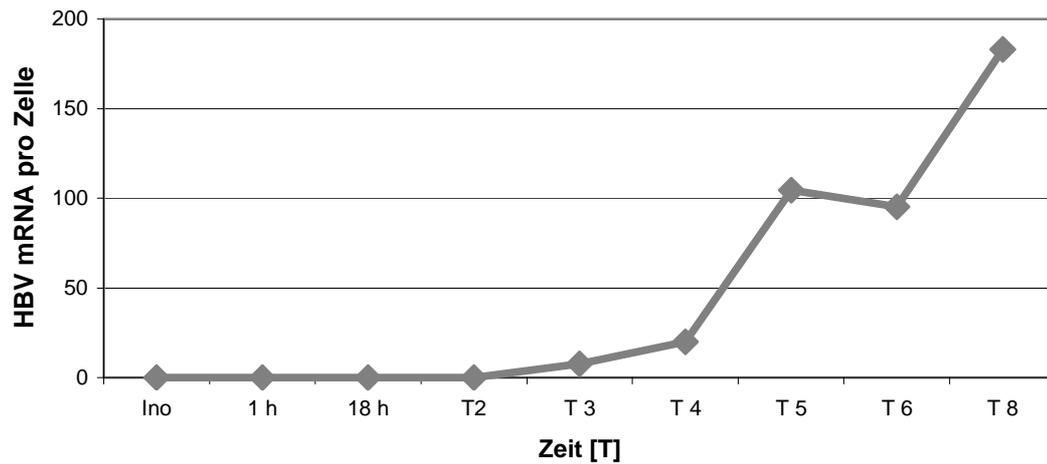


**Abb. 4.4.1.1: Nachweis viraler cccDNA in primären Tupaia Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Elektrophoretische Auftrennung der LightCycler Amplifikate im Agarosegel (2%).** Die linke Spur zeigt den Marker pUC-Mix, dessen 502 bp-Bande an der linken Seite gekennzeichnet ist. Die übrigen Banden enthalten die Amplifikate der darüber genannten Templates. Der Pfeil rechts kennzeichnet die spezifische Bandenhöhe für das HBV-Amplifikat (cccDNA).

Die HBV spezifischen mRNAs wurden mittels RT-PCR quantitativ nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4.1.2 zusammengefasst. Der Verlauf ist graphisch in Abbildung 4.4.1.2 dargestellt. In den Kulturen, die eine Stunde und achtzehn Stunden nach der Infektion abgenommen wurden, kann noch keine mRNA nachgewiesen werden. Ab dem dritten Tag ist eine mRNA-Replikation zu sehen, die im Verlauf der weiteren fünf Tage um das zwanzigfache ansteigt. Am vierten Tag ist eine starke mRNA-Zunahme zu erkennen. In den nicht infizierten Hepatozyten (Negativkontrolle) wurde keine mRNA nachgewiesen

**Tab. 4.4.1.2: Quantitativer und qualitativer Nachweis viraler mRNA in primäre Tupaia Hepatozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion.**

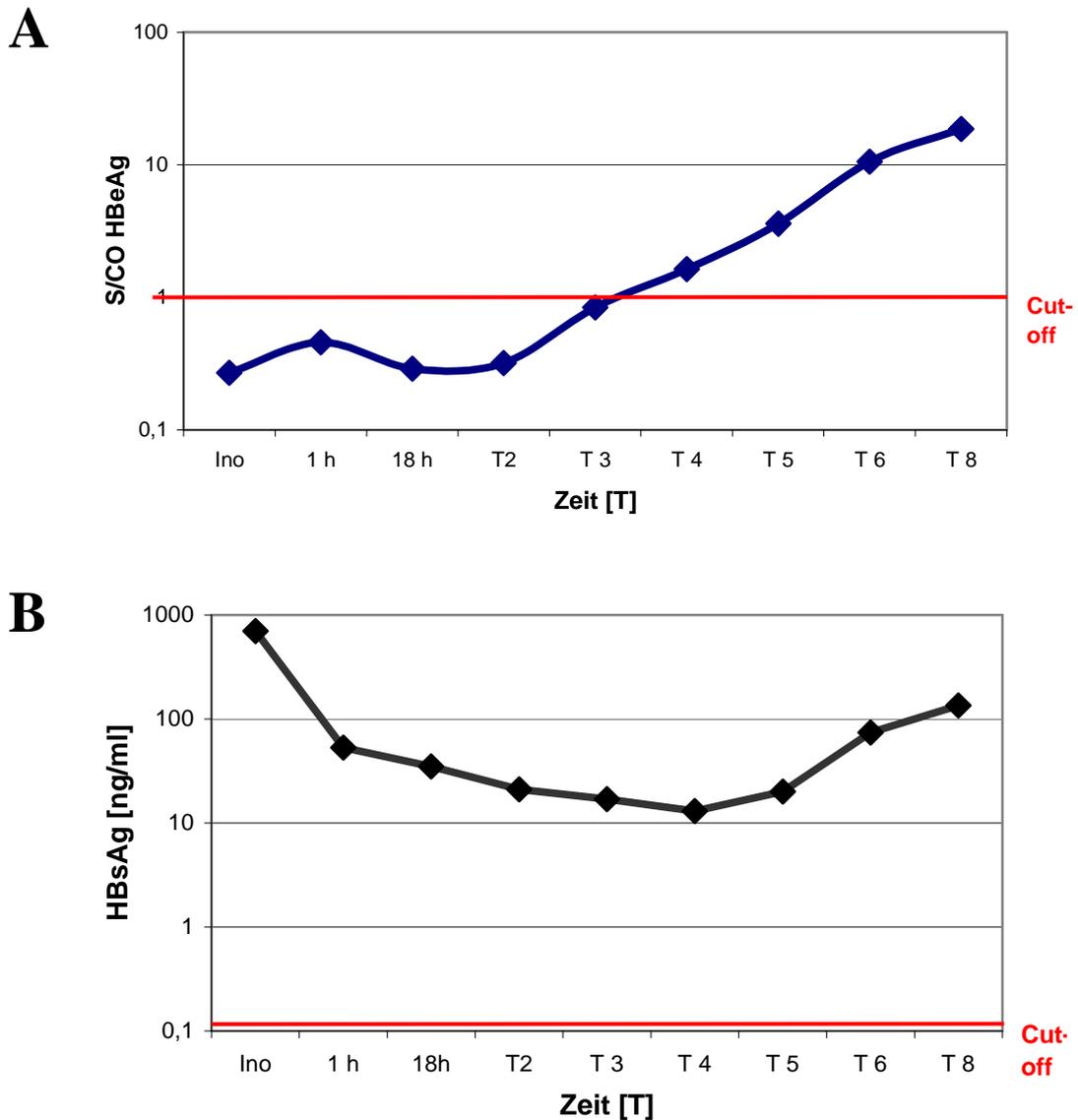
	Zeit nach der Infektion	Menge mRNA im Lightcycler	mRNA/Zelle bei 100% Infektion	mRNA/ Zelle bei 10% Infektion
Platte 2	1h	0	0	0
Platte 4	18h	0	0	0
Platte 6	T2	0	0	0
Platte 8	T3	$3,8 \times 10^3$	7,6	76
Platte 10	T4	$1,01 \times 10^4$	20	200
Platte 12	T5	$5,22 \times 10^4$	104,5	1045
Platte 14	T6	$4,47 \times 10^4$	95,2	952
Platte 16	T8	$9,16 \times 10^4$	183	1830
Platte 18	negativ	0	0	0



**Abb. 4.4.1.2:** Graphische Darstellung des Anstiegs der viralen mRNA nach erfolgter Infektion in Tupaia Hepatozyten.

#### 4.4.2 Zeitpunkt des Auftretens und Sekretionsverlauf viraler Proteine (HBsAg und HBeAg)

Die Konzentration an HBeAg in den Überständen wurde mittels ELISA ermittelt. Der Verlauf der Sekretion wird exemplarisch an Kultur 16 gezeigt. Die Kurve beginnt unterhalb des cut-off, da das HBeAg im Input der gereinigten Virionen nicht vorhanden ist. Auch 18 h nach der Infektion ist noch keine HBeAg-Sekretion ermittelbar. Am zweiten Tag nach der Infektion ist die HBeAg-Konzentration immer noch nicht angestiegen, während Tag 3 eine grenzwertige HBeAg-Konzentration aufweist. Ab dem vierten Tag wurde von den infizierten Tupaia Hepatozyten eindeutig HBeAg sekretiert. Von fünftem auf dem sechsten Tag kam es zu einem starken Anstieg der HBeAg-Konzentration. Da am Tag 8 immer noch kein Plateau erreicht wurde, wäre der Anstieg der HBeAg-Konzentration vermutlich noch weitergegangen, wenn der Infektionsversuch noch weiter gelaufen wäre.



**Abb. 4.4.2.1: A: HBeAg Sekretion infizierter primärer Tupaia Hepatozyten über einen Zeitraum von 8 Tagen.** Die Zellen wurden ursprünglich mit  $5 \times 10^8$  GE/Zelle infiziert und das sezernierte Antigen in Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. **B: HBsAg Sekretion infizierter primärer Tupaia Hepatozyten über einen Zeitraum von 8 Tagen.** Die Zellen wurden ursprünglich mit  $5 \times 10^8$  GE/Zelle infiziert und das sezernierte Antigen in Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Die Überstände wurden auch auf die Sekretion von HBsAg hin getestet. Die Konzentration an HBsAg in den Überständen wurde mittels ELISA ermittelt. Der Verlauf der Sekretion wird exemplarisch an Platte 16 gezeigt. Da HBsAg im Input vorhanden ist, lassen sich zu Beginn hohe Konzentrationen ermitteln. Danach fällt die Konzentration ab und eine neue HBsAg-Sekretion ist ab Tag 6 zu verzeichnen.

## 4.5 Bestimmung der cccDNA in Biopsieproben aus HBV-Infizierten Patienten

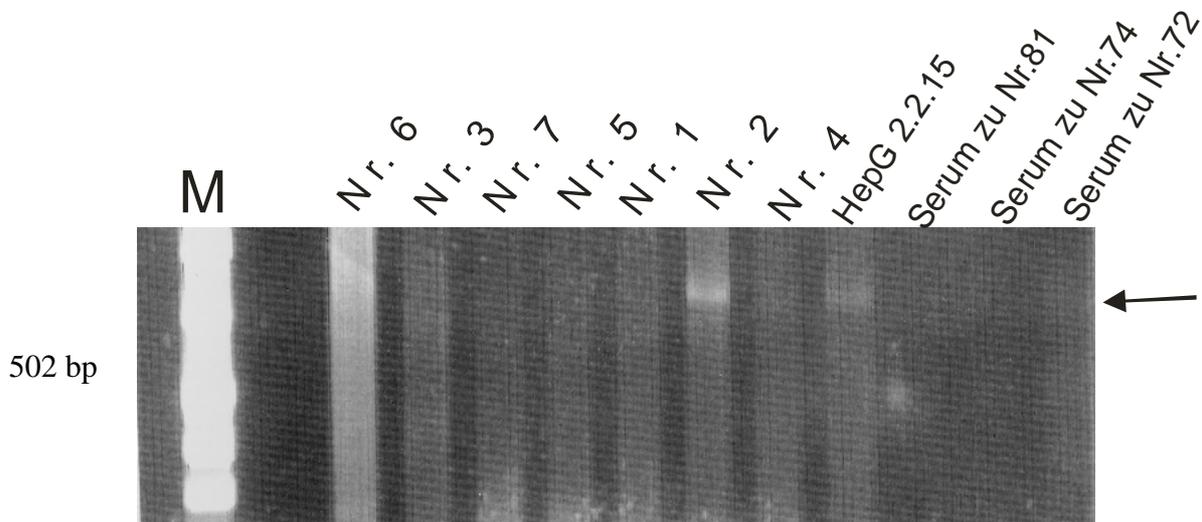
In diesem Versuch sollte die cccDNA aus infizierten humanen Leberbiopsaten bestimmt werden. Die Biopsate wurden bei  $-158^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (Kapitel 3.1.10), homogenisiert und durch den Hirt-Extrakt anschließend die cccDNA isoliert, sowie deren Menge im LightCycler bestimmt. Die Biopsate, die zu Verfügung standen, hatten eine Größe von ca.  $1\text{ mm}^3$ . Um den Anteil an Zellen in diesem Gewebe zu bestimmen, wurde die Gesamt-DNA isoliert und deren Konzentration im Extinktionsphotometer bestimmt. Die Biopsate hatten eine Identifikationsnummer, die übernommen wurde. Zusätzlich zu den Leberbiopsien standen bei den Nummern 81, 74, 72 und M Patientenserum zur Verfügung, aus denen die Genomäquivalente bestimmt wurde. Die cccDNA konnte bei den Biopsienummern 72, 81 und M quantifiziert werden.

**Tab. 4.5.1: Quantitativer Nachweis einer HBV Infektion in humanen Leberbiopsaten. Die Infektionsrate wurde anhand der Parameter cccDNA, viraler mRNA und den sezernierten Virusantigenen HBeAg und HBsAg detektiert. CAH= Chronisch aktive Hepatitis, ASC= Asymptomatischer chronischer Virusträger, HCV= Hepatitis C Virus infizierte.**

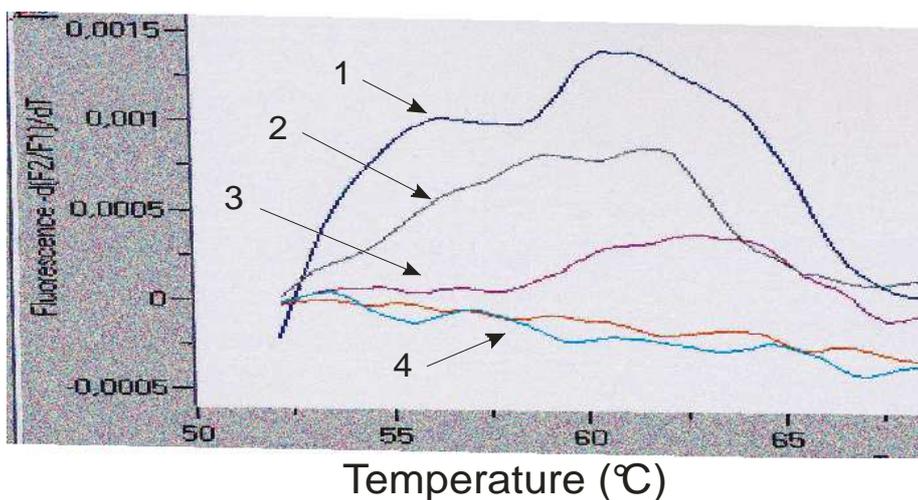
Patient (Nr. der Probe)	Leber-status	HBeAg	HBsAg	HBV DNA in Serum (GE/ml)	HBV cccDNA in Leber-Biopsie ( $1\text{mm}^3$ )	cccDNA Signal (Agarosegel)	HBV mRNA in Leber-Biopsie ( $1\text{mm}^3$ )
1(74)	CAH	-	+	$1.3 \times 10^6$	25000	-	$2.4 \times 10^5$
2(81)	CAH	+	+	$7.7 \times 10^6$	24,500	+	$2.6 \times 10^5$
3(72)	CAH	+	+	$4.0 \times 10^7$	22,900	-	$2.1 \times 10^3$
4(M)	CAH	-	+	$5.0 \times 10^5$	130	-	$9.2 \times 10^4$
5(47)	CAH	+	+	$2.1 \times 10^5$	5	-	-
6(66)	ASC	-	+	$2.4 \times 10^3$	-	-	-
7(73/2)	HCV	-	-	-	-	-	-

In der Agarose-Gelelektrophorese wurde das Amplifikat der cccDNA PCR aufgetrennt. Nur bei Nr. 81 ist ein Amplifikat von einer Länge von ca. 734 Basenpaaren

nachzuweisen. Die Verdünnungsreihe des Plasmidstandards von  $1 \times 10^7$  Kopien/ml bis  $1 \times 10^2$  Kopien/ml zeigt eindeutige, spezifische Banden; auch das Amplifikat der cccDNA PCR aus HepG2.2.15 Zellen ist bei ca. 734 Basenpaaren zu erkennen. Obwohl im LightCycler die cccDNA in den Biopsienummern 74, 72 und M quantifiziert wurde, ist sie im Agarosegel nicht nachzuweisen.



**Abb. 4.5.1:** Elektrophoretische Auftrennung der LightCycler Amplifikate im Agarosegel (2%). Die linke Spur zeigt den Marker pUC-Mix, dessen 502 bp-Bande an der linken Seite gekennzeichnet ist. Die übrigen Banden enthalten die Amplifikate der darüber genannten Biopsieproben. Der Pfeil rechts kennzeichnet die spezifische Bandenhöhe (734 bp) für das HBV-Amplifikat (cccDNA).



**Abb. 4.5.1A:** Zeigt die zu Abbildung 4.5.1 zugehörigen Schmelzkurven, die beim Ablösen der Primer vom Template gemessen werden können. 1: Plasmid-DNA Kovalent geschlossen (cccDNA); 2: Biopsie Nr. 1; 3: Biopsie Nr. 2, 4: Biopsie Nr.7 und Virales Genom.

## 5. Diskussion

### 5.1 Optimierung der Detektion der cccDNA

HBeAg und HBsAg zeigen den Abschluss einer erfolgten Etablierung der Infektion und die Infektionsrate. Beide Virusantigene werden mittels ELISA quantifiziert. In Kapitel 4.4 konnte gezeigt werden, dass die HBV Infektion von primären Tupaia Hepatozyten *in vitro* mittels HBeAg frühestens drei Tage nach Zugabe der Viren und mittels HBsAg frühestens am sechsten Tag nachzuweisen ist. Daher sollte zur Untersuchung der frühen Phasen der HBV Infektion ein Infektionsmarker herangezogen werden, der früher im Lebenszyklus des Hepatitis B Virus auftritt. Nach Eintritt in die Wirtszelle liegt das HBV Genom innerhalb eines Tages im Zellkern vor (Kann und Gerlich, 2004). Im Kern wird das Genom von der nicht-kovalent, relaxiert zirkulären Form (rcDNA) zu einer kovalen, geschlossen zirkulären Form (cccDNA) umgewandelt. Das bedeutet, dass das Auftreten von cccDNA der früheste Marker der etablierten HBV-Infektion ist. Der Nachweis der cccDNA in infizierte Hepatozyten war durch die bis dato vorhandenen Methoden (z.B. Southern blot) nur schwer möglich. Zur Optimierung eines einfachen Protokolls zum Nachweis der cccDNA wurden HBV Plasmid-Dimere benutzt. Dadurch wurde die nick-gap Struktur des viralen Genoms geschlossen und dieses Dimer entsprach somit prinzipiell der cccDNA-Form. In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass zur spezifischen Amplifikation der cccDNA erstens die Trennung der chromosomalen DNA von der cccDNA mittels Hirth-Extraktion und zweitens eine Annealingtemperatur von 57°C mit Slope 20°C/sec in der real-time PCR (Roche-System) notwendig ist. Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass sich in einer infizierten Leberzelle ein Pool von 5-50 cccDNA Moleküle befinden (Tuttleman et al., 1986). Bisher hat man die anderen Formen der HBV DNA mit speziellen DNasen entfernt, um die dann verbliebene cccDNA nachzuweisen, z.B. Shaotang et al. 2000 isolierten die cccDNA aus der episomalen DNA nach einer Salzfällung und Abzentrifugation der chromosomalen DNA durch Hinzugabe von DNase und RNase. Die episomale DNA wurde dann für vier bis sechs Stunden mit der RNase und DNase inkubiert. Singh et al. benutzten ebenfalls zur Isolierung der cccDNA aus Leberbiopsien die DNase. Dieses Verfahren ist umständlich und störanfällig. Es ist nicht sicher

bewiesen, dass die DNase Aktivität nicht teilweise die doppelsträngige cccDNA zerstört und somit die ohnehin kleine Kopienzahl reduziert. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die von uns ausgesuchten Primer für die cccDNA PCR (Stromauf- und abwärts der nick-gap Struktur lokalisiert) eine Unterscheidung von cccDNA von der rcDNA ohne eine vorherige DNase Verdau ermöglichen. Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass eine Annealingtemperatur von 57°C eine spezifische Bindung für die von uns ausgewählten Primer darstellt.

Auch die schnelle Temperatureinstellung durch real-time PCR stellt die Temperatur von Denaturierungsphase (95°C) auf Annealingphase (57°C) mit einer Geschwindigkeit von 20°C/sec und von der Annealingphase (57°C) auf die Elongationsphase (72 °C) mit einer Geschwindigkeit von 5°C/sec ist für die spezifische Amplifikation der cccDNA wichtig. Im Bereich des Amplifikats liegt der „nick“ im Minusstrang der viralen DNA der durch den Plusstrang überbrückt wird. Es ist vorstellbar, dass bei rascher Abkühlung diese Struktur nicht assembliert, während bei der cccDNA die Sequenz immer kontinuierlich ist. Zum Nachweis von HBV cccDNA kann man in der Literatur weitere PCR Protokolle finden, die sich in der Genomregion der Primer und der PCR Bedingungen von unserem unterscheiden. Die Effizienz der unterschiedlichen Protokolle wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

## **5.2 Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV**

Eine erfolgreiche Infektion der primären Tupaia Hepatozyten mit gereinigten HBV Viren aus Serum infizierter Patienten wurde schon in Köck et al. 2001 beschrieben. Dieses System ist spezifisch und vergleichbar mit der Infektion einer humanen Leber mit HBV. Es ist schon berichtet worden, dass primäre humane Hepatozyten mit Serum eines chronisch infizierten HBV Patienten infizierbar sind (Gripon et al., 1993). Die Infektion der Hepatozyten erfolgte aber in Anwesenheit von Polyethylenglykol (PEG), welches möglicherweise unspezifische Bindung und Aufnahme fördert und es so zu einer Aufnahme von HBV in die Hepatozyten kommt, die in Abwesenheit von PEG möglicherweise nicht auftreten würden. Galle und Kollegen (1994) infizierten primäre humane Hepatozyten mit  $1 \times 10^9$  infektiösen Partikeln aus dem Serum eines akut infizierten Patienten. Mittels Southern Blot konnte HBV rcDNA und ss DNA

nachgewiesen werden. Jedoch fand kein Nachweis der cccDNA oder des HBeAg statt. Gripon et al. beschreiben eine neue Zelllinie namens HepaRG, die primären humanen Hepatozyten ähnlich ist und sich mit HBV infizieren lässt. Diese Zellen wurden aus Leberparenchymzellen aus einem primären humanen Leberzellkarzinom einer chronisch mit HCV infizierten Patientin isoliert. Nur in Gegenwart von Glukokortikoiden und Dimethylsulfoxid (DMSO) sind diese Zellen mit HBV infizierbar. Die Infektion der HepaRG-Zelllinie erfolgte ebenfalls in Anwesenheit von Polyethylenglykol (PEG), die vermutlich eine unspezifische Bindung und Aufnahme fördert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Infektion der primären Tupaia Hepatozyten mit HBV zur Zeit bei allen zur Verfügung stehenden Zelllinien am spezifischsten ist. Durch ihre nicht tumoröse Herkunft steht damit zum ersten Mal ein Versuchsmodell zur Verfügung, das den physiologischen Bedingungen im humanen Wirt entspricht. Bei unserem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Menge an cccDNA mit sinkender Konzentration des HBV-Inokulates ebenfalls erwartungsgemäß abnahm, am stärksten nahm die cccDNA Konzentration von 100 GE/Zelle auf 10 GE/Zelle ab. Die Menge der Gesamt-HBV-mRNA nahm ebenfalls proportional zur Abnahme des Virus-Inputs ab. Hier konnte die größte Abnahme von 1.000 GE/Zelle auf 100 GE/Zelle gezeigt werden. Die HBeAg- und HBsAg-Sekretion der infizierten Hepatozyten nahm mit Abnahme des Virusinokulates ebenfalls ab. Ein Infektionsnachweis anhand von HBeAg Bestimmung war ab 1 GE/Zelle möglich, bei HBsAg ab 10 GE/Zelle. Der Grund für die unterschiedliche Bildung von HBV cccDNA, Gesamt HBV-RNA und den Sekretionproteinen bei verschiedenen Virus-Inputs ist noch unklar und konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Wahrscheinlich spielen die unterschiedlichen Sensitivitäten der Assays eine wichtige Rolle.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung der Gesamt-HBV-RNA im LightCycler mittels real-time RT-PCR und der cccDNA im real-time-PCR möglich ist. Das Detektionslimit des LightCyclers lag für beide PCR-Protokollen bei  $10^3$ - $10^6$  Kopien im Ansatz. Es wurde deutlich, dass pro Molekül cccDNA rund 20 Moleküle mHBV-RNA synthetisiert wurden. Obwohl weniger cccDNA vorhanden ist, ist der Nachweis der cccDNA besser geeignet, da die mRNA instabil ist und man mit Verlusten rechnen muß, da die mRNA während des reversen Transkriptionsschritts nicht vollständig in cDNA umgeschrieben wird.

### **5.3 Neutralisation der HBV Infektion von primären Tupaia Hepatozyten Kulturen**

Bei diesem Versuch sollte getestet werden, ob monoklonale Antikörper eine spezifische Inhibition der HBV Infektion von Tupaia Hepatozyten hervorrufen. Dazu wurden gleiche Mengen an Genomäquivalenten HBV (1.000 GE/Hepatozyt) mit spezifischen Antikörpern, deren Bindungsposition zum Teil bekannt ist, auf die primären Hepatozyten gegeben. 12 Tage nach der Infektion wurden die cccDNA und die Gesamt-mRNA mittels LightCycler-PCR und die Sekretionsproteine mittels ELISA bestimmt. Dass die präS1-Domäne eine wichtige Rolle für die Infektion der Leberzellen spielt, ist schon beschrieben worden (Glebe et al. 2005, Le Seyec et al., 1999, Neurath et al., 1989, Pontisso et al., 1989). Das LHBs Protein besteht aus der S-Domäne, PräS2- und PräS1-Domäne und ist in höherer Konzentration als MHBs oder SHBs auf dem HBV Partikel lokalisiert (Heermann et al., 1984). Von Neurath et al. ist gezeigt worden, dass eine HBV Infektion mittels Antikörper gegen die PräS1-Domäne bei Schimpansen gehemmt werden kann. In diesem Versuch konnte gezeigt werden dass der Anti-PräS1 Antikörper, MA18/7 die Infektion der primären Tupaia Hepatozyten mit HBV neutralisiert. In den infizierten Hepatozyten, die mit Anti-PräS2 (2-12F2) inhibiert wurden, ist cccDNA nachweisbar, d.h. die Infektion wurde nicht inhibiert. S26, ein monoklonaler Antikörper gegen PräS2-Domäne inhibiert die Infektion fast vollständig. Die Infektion wurde dagegen durch Anti-S (C20/2) vollständig inhibiert, hier fand keine Amplifikation der cccDNA PCR statt. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass das Hepatitis B Virus die PräS1-Domäne benutzt um an den Hepatozyten zu binden und aufgenommen zu werden. Obwohl die PräS2-Domäne, laut diesen Ergebnissen eine geringere Rolle für die Infektion mit HBV spielt und von Ergebnisse der Arbeitsgruppen Fernholz et al., 1993 und Le Seyec et al., 1998 unterstützt wird, berichten Ryu et al., 1997 von monoklonalen Antikörper gegen präS2, die eine HBV Infektion in humanen Hepatozyten neutralisieren.

Der heute verfügbare genetisch hergestellte Impfstoff besitzt das SHBs-Protein. Weltweit konnte gezeigt werden, dass mit einer Impfdosis 10 bzw. 20 µl SHBs-Protein, eine optimale Antikörperantwort erzielt werden kann. Dennoch gibt es die so genannten Non-Responder, die kein oder sehr wenig Anti-HBs bilden. Es werden auch von Durchbrüchen einer HBV-Infektion nach einer an sich erfolgreichen HB-Impfung

berichtet. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch Anti-PräS1 und Anti-PräS2 vor eine HBV-Infektion schützen. Bisher sind nur wenige Versuche zur Untersuchung der Neutralisation der HBV Infektion durchgeführt worden, da das Zellmaterial einen begrenzenden Faktor darstellte. Es konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass das Tupaia Infektionsmodell sich dazu sehr gut eignet, und die primären Tupaia Hepatozyten leichter zur Verfügung stehen, als humane Hepatozyten oder Schimpansen Leberzellen. Die Bedeutung der einzelnen Epitope für die Impfreaktion könnten so weiter erforscht werden, damit der Impfstoff weiter optimiert werden kann.

#### **5.4 Kinetik der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten-Kulturen mit HBV**

Zunächst konnte erwartungsgemäß beobachtet werden, dass 1 h nach der Zugabe des Virus weder cccDNA, Gesamt-mRNA oder HBeAg nachgewiesen werden konnten. Nach ca. 18 h konnte cccDNA nachgewiesen werden. Das Vorliegen von cccDNA zeigt, dass das HBV in den Replikationszyklus eingetreten ist und gilt als erster Marker der Infektion der Hepatozyten. Die cccDNA dient als nukleäre Matrize für die Transkription der viralen prägenomischen mRNA (pg-mRNA). Von der pg-mRNA wird im Zytoplasma die Polymerase und das Core-Protein translatiert. Anschließend wird die pg-mRNA zusammen mit der Polymerase in das Corepartikel verpackt. Das Corepartikel kann nun zwei Wege einschlagen. Zum einen kann die pg-mRNA im Corepartikel reverse transkribiert und in den Zellkern zurück transportiert werden, dort dient sie als weiteres Template für die Bildung von cccDNA, zum anderen kann das Core-Partikel in das Endoplasmatisches Retikulum sprossen und als Virus sezerniert werden.

Am Anfang der Infektion, wenn noch nicht genug Hüllproteine produziert worden sind, wird die pg-mRNA im Core revers transkribiert und zurück in den Nukleus transportiert wird (Kann und Gerlich, 2005). Dort dient die neusynthetisierte DNA als weiteres Template für die Bildung von cccDNA. Dieser Vorgang läuft ab bis ungefähr 10 bis 20 neue cccDNA Kopien im Kern angereichert sind. Ist genug cccDNA im Zellkern vorhanden, startet die Transkription der HBV mRNAs für die Hüllproteine. Das

messbare Einsetzen der Transkription der Gesamt HBV-mRNA konnte bei diesem Versuch ab dem dritten Tag nach der Infektion nachgewiesen werden. Ab dem vierten Tag nach der Infektion konnte HBeAg nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass erst ab diesem Zeitpunkt die Produktion der sekretierten Antigene beginnt. Am sechsten Tag war eine eindeutige Erhöhung der Mengen der beiden Proteine eingetreten. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Infektion am sechsten Tag komplett etabliert war, da alle Bestandteile des Virus produziert wurden. Tuttleman und Pugh haben schon 1986 primären Enten Hepatozyten mit DHBV infiziert und konnten zwei Tage nach der Infektion cccDNA nachweisen. Die cccDNA wurde jedoch mittels Southern Blot bestimmt, der nicht so sensitiv ist wie eine real-time PCR. Obwohl die cccDNA Menge häufig an der Nachweisgrenze des LightCyclers lag (Tag 2 bis 5) und somit nicht quantifiziert werden konnte, konnte sie in der elektrophoretischen Auftrennung und anschließender Färbung sichtbar gemacht werden.

## **5.5 Bestimmung der cccDNA in Biopsieproben aus HBV-Infizierten Patienten**

Das Persistieren der cccDNA in Leberzellen ist der Grund für einen Rückfall der Infektion mit HBV nach antiviraler Therapie. Die HBV cccDNA ist fast so stabil wie die chromosomale DNA und kann mit den bekannten Therapeutika gegen HBV (Interferone, Nukleosid-Analoga) nicht beseitigt werden. Erst die Eliminierung des cccDNA-Pools im Nukleus der Hepatozyten stellt eine echte Eradikationstherapie dar. Bisher gab es jedoch keine einfache und sensitive Methode die cccDNA in einer Leberbiopsie zu quantifizieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die cccDNA in den Leberbiopsaten mit dem hier entwickelten Aufreinigungsverfahren und dem optimierten PCR-Protokoll quantitativ spezifisch amplifiziert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, bei denen eine hohe Viruslast vorlag, cccDNA im LightCycler quantifizierbar war. Das Amplifikat mit einer Größe von 734 Basenpaaren konnte jedoch nur bei einem Biopsat eindeutig im Gelbild nachgewiesen werden. Allgemein kann man aber sicher sagen, dass die Menge an cccDNA in den Biopsaten zwar oft an der Nachweisgrenze des LightCyclers lag, aber laut

Schmelzkurvenanalytik immer eine spezifische Amplifizierung vorlag. Als Kontrolle dienten die mRNA-Messungen, die parallel von Herrn Daniel Bock (Doktorand der Medizinischen Virologie in Gießen) durchgeführt werden und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die Ergebnisse der HBV mRNA-Messung stimmen mit den Ergebnissen der cccDNA Bestimmung überein. Als Grund für die geringe Menge cccDNA könnte zunächst eine kleine Hepatozytenzahl im Biopsat in Frage kommen. Je nach Punktionsstelle könnten sich im Punktat viele Stromazellen in Relation zu den Parenchymzellen befinden. Auch die Punktion einer Stelle, in der sich wenig infizierte Hepatozyten befinden ist denkbar. Aus vorherigen Untersuchungen ist bekannt, dass ca.70% der Hepatozyten infiziert werden, allerdings zeigt sich dabei eine ungleichmäßige Verteilung innerhalb der Leber. Es konnte gezeigt werden, dass das HBV in transgenen Mäusen zonal exprimiert wird und zwar in den Hepatozyten, die in den sauerstoffarmen perivenösen Leberarealen angesiedelt sind (Guidotti et al., 1995). Für die Kontrolle der cccDNA wäre es sinnvoll, zwei Biopsien an zwei verschiedenen Stellen der Leber durchzuführen. In der Literatur wird ein relatives Komplikationsrisiko von 0,56% für eine Leberpunktion angegeben. Um eine erfolgreiche HBV Infektionstherapie durchführen zu können, sollte trotzdem ein Nachweis der cccDNA in zwei Biopsien erfolgen.

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, nach einem adäquaten Modell für die HBV-Infektion zu suchen. Zum Zeitpunkt des Beginns der Doktorarbeit standen nur wenige schwer verfügbare Zellkultursysteme zur Verfügung, die sich mit Hepatitis B Virus (HBV) experimentell infizieren ließen. Die Versuche in dieser Arbeit konnten zeigen, dass die primären Tupaia-Hepatozytenkulturen ein praktikables System zur Messung der HBV-Infektiosität darstellen. Die Bereitstellung von Tupaia-Leber ist im Gegensatz zum primären humanen Hepatozytenkulturen gut planbar. Durch ihre nicht tumoröse Herkunft entspricht es den physiologischen Bedingungen im humanen Wirt. Dieses System ist somit den primären humanen Hepatozyten überlegen.

Die quantitative real-time LightCycler PCR und RT-PCRs zur Detektion der replikativen Intermediate, cccDNA und der Gesamt-mRNA, in den frühen Phasen einer HBV Infektion wurde erfolgreich an infizierten primären Tupaia-Hepatozytenkulturen optimiert.

In einer Kinetik der Infektion von primären Tupaia Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass die cccDNA, welche den ersten Marker einer etablierten Infektion darstellt, bereits 18 h nach der Infektion nachgewiesen werden kann. Am siebten Tag post infektionem wurde eine eindeutige Menge an viralem Sekretionsprodukte, HBeAg und HBsAg, nachgewiesen. Das heißt, erst sieben Tage nach der Infektion mit HBV hatte sich eine vollentwickelte HBV-Infektion etabliert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Methodik der Quantifizierung von cccDNA mittels real-time PCR für den Nachweis von cccDNA auch an sehr geringen Mengen von Leberbiopsaten geeignet ist.

## Summary

The main point of the work was to investigate HBV infection in an adequate cell culture model. At the beginning of the work there were just only primary human hepatocytes which could be infected with hepatitis B virus *in vitro*. The test in this work could show that the primary tupaia hepatocyte cultures were a feasible system to measure HBV infectivity. In contrast to primary human hepatocyte cultures, hepatocytes obtained from Tupaia livers are better available, and show less heterogeneity and increased susceptibility to HBV infection.

The quantitative real-time LightCycler PCR and RT-PCRs for the detection of HBV replicative intermediates, cccDNA and full-mRNA, in esp, the early phase of the HBV infection could be successfully optimized using primary tupaia hepatocyte cultures.

The kinetics of HBV infection of primary tupaia hepatocytes has shown that the first marker of an established infection, the cccDNA, could only after little as 18 hours post infectionem. At the 7<sup>th</sup> day after the infection HBeAg und HbsAg was detectable in supernatant. That means that seven day after inoculation of the cells with HBV *in vitro* HBV was fully established.

It could be shown that the method of cccDNA quantification using real-time PCR is very useful for the verification of cccDNA in the liver biopsies.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) **Aufiero B. and Schneider J. (1990):** *The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters.* EMBO J 1990; 9: 497 - 504
- (2) **Bartenschlager, R. und Schaller, H. (1988):** *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription.* EMBO J. 7: 4185-4192.
- (3) **Bock, C.T., Schranz, P., Schröder, C.H. und Zentgraf, H. (1994):** *Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cells.* Virus Genes 8: 215-229.
- (4) **Bourchard M.J., Schneider R.J., (2004):** *The enigmatic X gene of hepatitis B virus.* J. virol. . 78(23): 127525-34.
- (5) **Chang S.F., Netter H.J., Bruns M., Schneider R., Fröhlich K. and Will H. (1999):** *A new avian hepadnavirus infecting snow geese (Anser caerulescens) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA.* Virology 1999; 262: 39 - 54
- (6) **Chen H.S., Kaneko R., Girones R.W., Anderson W.E., Hornbuckle B.C., Tennant P.J., Cote J.L., Gerin R.H., Purcell R.H. and Miller R.H. (1993):** *The woodchuck hepatitis virus X gene is important für establishment of virus infection in woodchucks.* J Virol 1993; 67: 1218 – 1226
- (7) **Chisari, F.V. und Ferrari, C. (1995):** *Hepatitis B virus immunopathogenesis.* Annu. Rev. Immunol. 13: 29-60.
- (8) **Dane, D.S., Cameron, C. und Biggs, M. (1970):** *Virus like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis.* Lancet 1: 695-698.
- (9) **Dieter Glebe, Stephan Urban, Ev V. Knoop, Nilgün CAG, Peter Krass, Stefanie Grün, Aiste Bluavaite, Kestutis Sasnauskas, and Wolfram H. Gerlich (2005):** *Mapping of the Hepatitis B Virus Attachment Site by Use of Infection-Inhibiting preS1 Lipopeptides and Tupaia Hepatocytes.* Gastroenterology 2005, 129:234-245
- (10) **Enders, G.H., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1985):** *Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant.* Cell 42: 297-308.
- (11) **Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R., Skalka, A.M. (2000):** *Principles of Virology – Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.* ASM Press 2000, Seite 225)
- (12) **Ganem, D. und Varmus, H.E. (1987):** *The molecular biology of hepatitis B viruses.* Ann. Rev. Biochem. 56: 651-693.
- (13) **Gerlich, W.H. und Robinson, W.S. (1980):** *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA-strand.* Cell 21: 801-809.
- (14) **Gerlich, W.H., Kann, M., (2005):** Hepatitis B In: Topley & Wilson Mikrobiologie & Microbial Infections. BJ Maly & V. ter Menlen eds. Hodster Arnold London 2005. Band 2, S 1226-1268.
- (15) **Glebe D. (2000):** *Oberflächenstrukturen des Hepatitis B Virus und ihre Bedeutung für den Infektionsvorgang.* Inaugural-Dissertation 2000, Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Biologie.

- (16) **Glebe D., Aliakbari M., Krass P., Knoop E.V., Valerius K.P. and Gerlich W.H. (2003):** *Pre-S1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus.* J Virol 2003 Sep; 77 (17): 9511- 9521
- (17) **Grethe S., Heckel J.O., Rietschel W. and Hufert F.T. (2000):** *Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates.* J Virol 2000; 74: 5377 – 5381
- (18) **Guidotti L.G., Matzke B., Schaller H. and Chisari F.V. (1995):** *High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice.* J Virol 1995; 96: 6158 – 6169.
- (19) **Henkler F., Waseem N., Golding M.H., Alison M.R. and Koshy R. (1995):** *Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus related human hepatocellular carcinoma.* Cancer Res 1995; 55: 6084 – 6091
- (20) **Hohenberg H., Kaliminen T., Schneider C., Cova L., Krone O., Folich K., Will H, Sirma H. (2003):** *New hepatitis B Virus of cranes that has an unexpected broad host range.* J. Virol. 77 1964-1976.
- (21) **Hruska, F.J. Clayton, D.A., Rubenstein, J.L.R. und Robinson, W.S. (1977):** *Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after Dane particle DNA polymerase reaction.* J. Virol. 21: 666- 672.
- (22) **Huang, J. und Liang, T.J. (1993):** *A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products.* Mol. Cell. Biol. 13: 7476-7486.
- (23) **Joseph J. Y. Sung, May-Ling Wong, Scott Bowdn, Choong-Tsek Liew, Alex Y. Hui, Vincent W. S. Wong, Nancy W. Y. Leung, Stephen Locarnini, and Henry L. Y. Chan (2005):** *Intrahepatic Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Can Be a Predictor of Sustained Response to Therapy.* Gastroenterology 2005,128:1890-1897
- (24) **Kaneko, S. und Miller, R.H. (1988):** *X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver.* J. Virol. 62: 3979-3984.
- (25) **Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H. und Helenius, A. (1999).** *Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex.* J. Cell Biology 145: 45-55.
- (26) **Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. und Robinson, W.S. (1973):** *DNA-Polymerase associated with human hepatitis B antigen.*J. Virol. 17: 885-893.
- (27) **Lanford R.E., Chaewz D., Brasky K.M., Burns R.B. and Rico-Hesse R. (1998):** *Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a new world primate.* Proc Natl Acad Sci, USA 1998; 95: 5757 – 5761
- (28) **Lürmann, A. (1885):** *Eine Icterusepidemie.* Berl. Klin. Wochenschr. 22: 20-23.
- (29) **Madhu Singh, Annie Dicaire, Adil E Wakil, Carolyn Luscombe, Stephen L Sacks (2004):** *Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR.* Journal of Virological Methods 118 (2004) 159-167
- (30) **Maquire H.F., Hoeffler J.P. and Siddiqui A. (1991):** *HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions.* Science 1991; 252: 842 - 844

- (31) **Marion P.L., Oshiro L.S., Regnery D.C., Scullard G.H. and Robinson W.S. (1980):** *A virus in beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans.* Proc Natl Acad Sci, USA 1980; 77: 2941 – 2945
- (32) **Mason W.S., Seal G. and Summers J. (1980):** *Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.* J Virol 1980; 36: 829 - 836
- (33) **Ming-Liang He, Jun Wu, Ying Chen, Marie C. Lin, George K.K. Lau, and Hsiang-fu Kung (2002):** *A new sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR.* Biochemical and Biophysical Research Communications 295 (2002) 1102-1107
- (34) **Newbold, J.E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S. und Locarnini, S. (1995):** *The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes.* J. Virol. 69: 3350-3357.
- (35) **Norder H., Ebert J.W., Fields H., Mushawar I.K. and Magnius L.O. (1996):** *Complete sequencing of a Gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus.* Virology 1996; 218: 214 – 223
- (36) **Philippe Gripon, 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.* Microbiologie, November 2002, p. 15655-15660.
- (37) **Pourcel, C., Louise, A., Gervais, M., Chenciner, N., Dubois, M.F. und Tiollais, P. (1982):** *Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA.* J. Virol. 42: 100-105.
- (38) **Rall, L.B., Standring, D.N. und Laub, O. (1983):** *Transcription of Hepatitis B virus by RNA polymerase II.* Mol. Cell. Biol. 3: 1766-1773.
- (39) **Ritter S.E., Whitten T.M., Quents A.T. and Schloemer R.H. (1991):** *An internal domain of hepatitis B virus X antigen is necessary for transactivating activity.* Virology 1991; 182: 841 – 845
- (40) **Robinson W.S. (1980):** *Genetic variation among hepatitis B and related viruses.* Ann N.Y. Acad Sci 1980; 371 – 378
- (41) **Robinson, W.S. (1977):** *The genome of hepatitis B virus.* Ann. Rev. Microbiol. 31: 357-377.
- (42) **Seeger, C., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986):** *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.* Science 232: 477-484.
- (43) **Shaotang Ren and Michael Nassal (2000):** *Hepatitis B Virus (HBV) Virion and Covalently Closed Circular DNA Formation in Primary Tupaia Hepatocytes and Human Hepatoma Cell Lines upon HBV Genome Transduction with Replication-Defective Adenovirus Vectors.* Journal of Virology, Feb. 2001, p. 1104-1116
- (44) **Shaul, Y., Rutter, W.J. und Laub, O. (1985):** *A human hepatitis B virus enhancer element.* EMBO J. 4: 427-430.
- (45) **Shi H., Cullen J.M. and Newbold J.E. (1993):** *A novel isolate of duck hepatitis B virus.* 1993; GenBank accession no. M95589.

- (46) **Sprengel R., Kaleta E.F. and Will H. (1988):** *Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons.* J Virol 1988; 62: 3832 – 3839
- (47) **Standring, D.N., Rutter, W.J., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1984):** *Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in cultured murine cells initiates within the presurface region.* J. Virol. 50: 563-571.
- (48) **Stefan F. Wieland, Hans Christian Spangenberg, Robert Thimme, Robert H. Purcell, and Francis V. Chisari (2004):** *expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees.* PNAS, 2004, vol. 101, no. 7, 2129-2134
- (49) **Summers J., Smolec J.M. and Snyder R. (1978):** *A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.* Proc Natl Acad Sci, USA 1978; 75: 4533 – 4537
- (50) **Summers, J.A., O'Connell, A. und Millman, I. (1975):** *Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 4597-4601.
- (51) **Testut P., Renart C.A., Terrodillos O., Vitvitski-Trépo L., Tekaiia F., Degott C., Blake J., Boyer B. and Buendia M.A. (1996):** *A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska.* J Virol 1996; 70: 4210 – 4219
- (52) **Treinin, M. und Laub, O. (1987):** *Identification of a promotor element located upstream from the hepatitis B virus X gene.* Mol. Cell. Biol. 7: 545-548.
- (53) **Vaudin M., Wolstenholme A.J., Tsiquaye K.N., Zuckerman A.J. and Harrison T.J. (1988):** *The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee.* J Gen Virol 1988; 69: 1389 – 1389
- (54) **Warren K.S., Heeney J.L., Swan R.A., Heriyanto A. and Verschoor E.J. (1999):** *A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (pongo pygmaeus).* J Virol 1999; 73: 7860 – 7865
- (55) **Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. und Schaller, W. (1987):** *Replication strategy of human hepatitis B virus.* J. Virol. 61: 904-911.
- (56) **Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. und Koike, K. (1987):** *Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture by transient expression of transfected HBV DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2678-2682
- (57) **Yong-Yuan Zhang, Bai-Hua Zhang, Daniel Theele, Samuel Litwin, Eugene Toll, and Jesse Summers (2003):** *Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy number in a hepadnavirus-infected liver.* PNAS, 2003, vol.100, no. 21, 12372-12377
- (58) **Yu-Chi Chou, King-Song Jeng, Mong –Liang Chen, Hsiao-Hui Liu, Tzu-Ling Liu, Ya-Ling Chen, Yu-Chih Liu, Cheng-po Hu, and Chungming Chang (2004):** *Evaluation of Transcriptional Efficiency of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA by Reverse Transcription-PCR Combined with the Restriction Enzyme Digestion Method.* Journal of Virology, Feb. 2005, p. 1813-1823.
- (59) **Yuh, C.H., Chang, Y.L. und Ting, L.P. (1992):** *Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNA's of hepatitis B virus.* J. Virol. 66: 4073-4084.

- (60) **Zang Z., Protzer U., Hu Z., Jacob J., Liang T.J.(2004):** *Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent manner.* J. Virol.. 78 (9): 4566-72.
- (61) **Zang, W.Q., Fieno, A.M., Grant, R.A. und Yen, T.S. (1998):** *Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus postranscriptional regulatory element.* Virology 248: 46-52.
- (62) **Zhou D.X. and Yen T.S.B. (1990):** *Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer.* J Biol Chem 1990; 265: 20731 – 20734
- (63) **Zoulim F., Saputelli J. and Seeger C. (1994):** *Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo.* J Virol 1994; 68: 2026 – 2030

## 8. Danksagungen

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Virologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Dieter Glebe danke ich für die gute Betreuung der Doktorarbeit und für sein Engagement zum Gelingen der Arbeit.

Gedankt sei auch Sigrun Broehl für die fachliche Unterstützung bei der Zellkultur und Ulrike Wendt für die Hilfe am LightCycler.

Herrn Prof. Dr. Dr. W.H. Gerlich danke ich für die Themenstellung und die stete Diskussionsbereitschaft beim Erstellen der Arbeit.

Allen anderen Mitgliedern des Institutes für medizinische Virologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima und für das Entgegenkommen.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern Fereshteh Khajeh und Esmail Aliakbari für ihre Unterstützung ganz herzlich danken.

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

# Curriculum Vitae

---

## Persönliche Angaben

Name, Vorname: Aliakbari, Mehriar  
Geboren, Geburtsort: 15.09.1977, Teheran  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
wohnhaf in: Goethe Str. 16, 35584 Wetzlar

## Schulbildung

Grundschule, Teheran	1984-1989
Gesamtschule, August-Bebel-Schule, Wetzlar	1989-1994
Gymnasium, Goethe Schule, Wetzlar	1994-1997
Allgemeine Hochschulreife	Juni 1977

## Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

**1998-2005**

Physikum	8/2000
1.Staatsexamen	4/2001
2.Staatsexamen	4/2004
3.Staatsexamen	5/2005

## Famulaturen

**2001-2003**

Innere Medizin  
Krankenhaus der Barmherzigen Brüder ,Wien  
Gerichtsmedizin  
Legal medicine Center of Hamedan, Iran  
Allgemeinmedizin  
Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. Daliri in Dortmund  
Allgemeinpsychiatrie  
Klinikum für Psychiatrie und Psychotherapie, Gießen

## Praktisches Jahr

**2004-2005**

Innere Medizin bei Prof. Dr. Goubeaud  
Asklepios Klinik Lich GmbH  
Neurologie bei Prof. Dr. Kaps  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Chirurgie bei Prof. Dr. Hild  
Asklepios Klinik Lich GmbH

## Praktische Tätigkeit

**2005 bis dato**

Assistenzärztin Abteilung Innere Medizin  
bei Prof. Dr. Dr. Grimminger  
Asklepios Klinik Lich GmbH

# Curriculum Vitae

---

## Zusätzliche Kurse

- Seminar für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit SS 2001
- Interdisziplinärer Grundkurs Sonographie WS 2001/2002
- Grundkurs EKG SS 2002

## Nebentätigkeiten

- Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologie, 10/2000-07/2001  
Universitätsklinik Gießen
- Studentische Hilfskraft am Institut für Med. Virologie, 10/2002-04/2003  
Universitätsklinik Gießen
- Doktorandin bei Prof. Dr. Gerlich, Institut für Med. 04/2002-04/2003  
Virologie der Universität Gießen

## Publikation

Glebe, D., **Aliakbari, M.**, Krass, P., Knoop, E.V., Valerius, K.P. und Gerlich, W.H-  
(2003)  
Pre-S1 Antigen-Dependent Infection of Tupaia Hepatocyte Cultures with Human  
Hepatitis B Virus. Journal of Virology. 77:9511-9521.

## Sonstiges

- Studium der Wirtschaftswissenschaften an der ab WS 2003/2004  
Justus-Liebig-Universität
- Vordiplom Februar 2006
- Praktikum in medizinischem Controlling und Qualitätssicherung 09/2003-10/2003  
der Lahn-Dill-Kliniken in Wetzlar