

**Untersuchungen zur Inhibition
der Hepatitis B Virus Infektion von primären
Tupaia-Hepatozytenkulturen**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**Vorgelegt von Prinz, Christian
aus Haren (Ems)**

Gießen 2006

**Aus dem Institut für Medizinische Virologie
der Justus-Liebig-Universität
zu Gießen**

Direktor/Leiter:

Prof. Dr. phil. nat. Dr. h.c. Wolfram H. Gerlich

Gutachter:

Professor Dr. Dr. h.c. W.H. Gerlich

Gutachter:

Professor Dr. E. Roeb

Tag der Disputation:

26.02.2007

*Wir alle fallen. Diese Hand da fällt.
Und sieh dir andre an: es ist in allen.*

*Und doch ist Einer, welcher dieses Fallen
unendlich sanft in seinen Händen hält.*

Rainer Maria Rilke

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Geschichte, Epidemiologie und Übertragung von HBV.....	1
1.2	Virusmorphologie.....	2
1.3	Genotypen des HBV.....	5
1.4	Pathogenese und Klinik beim Infektionsprozeß.....	6
1.5	Variabilität und Resistenz.....	7
1.6	Immunantwort bei Infektion.....	8
1.7	Prophylaxe.....	10
1.8	<i>In vitro</i> Infektionssystem für HBV.....	11
1.9	Ziele der Arbeit.....	12

2. Material

2.1	Zellkultur der primären Tupaia-Hepatozyten.....	13
2.1.1	HGM (Hepatocyte Growth Medium).....	13
2.1.2	Medium zum Einfrieren von primären Tupaia-Hepatozyten.....	14
2.2	Isolation der primären Tupaia-Hepatozyten.....	14
2.3	Gereinigte Hepatitis-B-Viren zur Infektion der primären Tupaia-Hepatozyten.....	14
2.4	Inhibition der HBV-Infektion.....	15
2.4.1	Inhibition der HBV-Infektion mit neutralisierenden Antikörpern.....	15
2.4.2	Inhibition der Infektion mit gefällten polyklonalen Antikörpern aus Seren....	15
2.4.3	Inhibition der Infektion mit Antikörpern gegen spezifische Regionen des HBV-Oberflächenproteins.....	17
2.4.4	Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten.....	17
2.5	ELISA zur HBsAg-Bestimmung.....	18
2.6	Proteinauftrennung mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	18
2.7	Detektion von Proteinen mittels Western Blot und anschließender immunologischer Färbung.....	19
2.7.1	Western Blot.....	19

2.7.2	Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine mittels Chemolumineszenz.....	20
2.7.2.1	Färbung des Blots mit Western Breeze.....	20
2.8	Materialien zur Silberfärbung	20
2.9	Materialien zur Coomassie Färbung.....	20
2.10	Natriumsulfatfällung von Antikörpern aus Seren.....	21
2.11	Aufreinigung mit DEAE-Sephacel-Ionenaustauscher.....	21
2.12	Antikörperaufreinigung mittels Dynabeads Protein G.....	22

3. Methoden

3.1	Zellkultur und Isolation primärer Tupaia-Hepatozyten.....	23
3.2	Infektion primärer Tupaia-Hepatozyten mit gereinigten Hepatitis-B-Viren.....	25
3.2.1	Grundsätzliches zur Infektion mit und ohne Inhibition durch Antikörper.....	25
3.2.2	Inhibition der HBV-Infektion mit monoklonalen Antikörpern.....	26
3.2.3	Inhibition der Infektion mit aufgereinigten polyklonalen Antikörpern aus Seren.....	27
3.3	Herstellung von Fab-Fragmenten.....	28
3.4	Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten.....	29
3.5	ELISA zur Ermittlung der Proteinkonzentration von HBsAg und HBeAg.....	30
3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Proteinauftrennung.....	32
3.7	Proteindetektion mittels Western Blot und immunologischer Färbung...33	
3.7.1	Funktionsprinzip des Western Blot.....	34
3.7.2	Immunologische Anfärbung der transferierten Proteine mit Western Breeze..	35
3.8	Silberfärbung.....	35
3.9	Coomassie Färbung von Gelen.....	36
3.10	IgG-Isolierung durch Natriumsulfatfällung.....	36
3.11	Aufreinigung mit DEAE-Sephacel-Ionenaustauscher.....	36
3.12	Antikörperaufreinigung mittels Dynabeads Protein G.....	37

4.	Ergebnisse	
4.1	Aufreinigungsverfahren von Immunglobulinen aus Seren.....	38
4.1.1	Vergleich unterschiedlicher Aufreinigungsverfahren.....	38
4.1.2	Natriumsulfatfällung vorliegender Seren.....	40
4.2	Nachweis monoklonaler Antikörper mittels Western Blot.....	41
4.3	Nachweis von Anti-PräS1-Antikörpern aus humanen Seren mittels Western Blot.....	44
4.4	Isolationsergebnisse primärer Tupaia-Hepatozyten.....	44
4.5	Inhibition der HBV-Infektion von primären Tupaia-Hepatozyten- Kulturen mit monoklonalen Antikörpern gegen die HBV- Ober- flächenproteine.....	45
4.6	Infektionsverläufe ohne Inhibition und bei Inhibition mit MA18/07.....	47
4.7	Inhibition der Infektion mit Q19/10.....	48
4.8	Inhibition der Infektion mit C20/2.....	49
4.9	Titrationssreihe bei Infektionsinhibition mit MA18/07.....	49
4.10	Inhibition der Infektion durch Kombination von anti-präS1 und anti- SHBs Antikörpern.....	51
4.11	Inhibition der Infektion mit anti-S, anti-präS1 und anti-präS2.....	53
4.12	Inhibition der Infektion mit weiteren monoklonalen Antikörpern.....	56
4.13	Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten monoklonaler Antikörper.....	58
4.14	Inhibition mit spezifischen Antikörpern gegen präS1.....	63
4.15	Inhibition der Infektion mit polyklonalen humanen Antikörpern gegen HBV.....	66
5.	Diskussion.....	72
6.	Zusammenfassung.....	77
7.	Abkürzungen.....	79
8.	Literaturverzeichnis.....	83
9.	Danksagung.....	96
10 .	Erklärung.....	97
11 .	Tabellarischer Lebenslauf.....	98

1. Einleitung

1.1 Geschichte, Epidemiologie und Übertragung des Hepatitis B Virus

Obwohl schon im Altertum bekannt, so findet man doch erst im Jahre 1885 die Beschreibung der Infektiösität einer „Gelbsucherkrankung“ durch Lürmann. Den Schilderungen zufolge handelte es sich bei dieser Krankheit wahrscheinlich um eine Infektion am Hepatitis B Virus (HBV), die nach der Impfung von Werftarbeitern mit einer Pockenvakzine auftrat. Weitere 78 Jahre mussten vergehen, bis 1963 B.S. Blumberg zufällig ein Antigen im Blut eines australischen Ureinwohners fand (Blumberg et al., 1967), das sich bald darauf als Marker einer Hepatitis B herausstellte.

Dieses 20 nm große Australia-Antigen enthielt allerdings keine Nukleinsäuren. Erst 1970 entdeckte Dane elektronenmikroskopisch 45 nm große Partikel, die auf ihrer Oberfläche das Australia-Antigen aufwiesen. In diesen Partikeln fand J. Almeida ein „Core-Partikel“, welches auch als Antigen wirkt und später als HBcAg bezeichnet wurde (Almeida et al., 1971). W.S. Robinson entdeckte 1973 in diesen Partikeln eine endogene DNA-Polymerase und 1974 die entsprechende DNA (Robinson et al., 1974). Daraufhin wurde das Australia-Antigen als Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBsAg) und die Dane-Partikel als Hepatitis-B-Virus (HBV) bezeichnet.

Im Jahre 1979 gelang die Klonierung und Sequenzierung des HBV-Genoms, wodurch der Weg für eine sichere und kostengünstige Vakzinierung gegen eine Infektion mit HBV frei war. 1998 beschloß die „World Health Organization“ (WHO) durch weltweite und flächendeckende Impfungen HBV auszurotten.

Die veraltete Bezeichnung der Hepatitis B als „Serumhepatitis“ wurde v.a. wegen des hauptsächlich angenommenen perkutanen Übertragungswegs verwandt. Dagegen ist heute bekannt, dass die vorwiegende Übertragung von HBV nicht perkutan, sondern allenfalls verdeckt perkutan stattfindet, weil das HBsAg in beinahe allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden kann. Die orale Ingestion ist hierbei eher ineffektiv, wohingegen Intimkontakte (insbesondere Geschlechtsverkehr) und die perinatale Transmission ausgeprägte Infektionsmöglichkeiten darstellen.

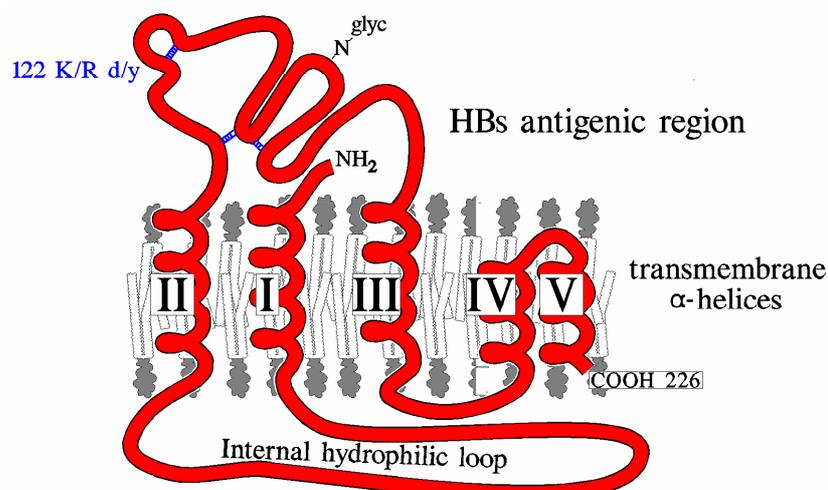
Das menschliche Reservoir für HBV ist mit weltweit ca. 350 Mio. chronisch Infizierten immens, wobei die Durchseuchung in den Vereinigten Staaten, in Mittel- und Nordeuropa mit 0,1 bis 0,5 % als niedrig zu bezeichnen ist. Hingegen ist die Prävalenz insbesondere im fernen Osten und in einigen tropischen Ländern mit 5 bis 20 % sehr hoch. Die unterschiedlichen Prävalenzraten spiegeln das unterschiedliche epidemiologische Muster der HBV-Infektion wider. Hierbei ist im fernen Osten die Infektionsrate insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern so hoch, weil dort die perinatale Infektion im Vordergrund steht. In Nordeuropa und den Vereinigten Staaten machen ungeschützte sexuelle Kontakte, intravenöser Drogenkonsum und Nadelstichverletzungen die Hepatitis B zu einer Erkrankung des Jugendlichen oder jungen Erwachsenen.

1.2 Virusmorphologie

HBV gehört zur Familie der Hepadnaviridae und zum Genus Orthohepadnavirus (Robinson, 1993). Wie der Name schon sagt sind alle Mitglieder dieser Virusfamilie hepatotrop und überdies äußerst speziesspezifisch. Dabei wurden Orthohepadnaviren in unterschiedlichen Primatenarten, bei zwei Hörnchenspezies und Avihepadnaviren bei einigen Vogelspezies gefunden. Das Hepatitis B-Virus ist wie alle Hepadnaviren ein umhülltes Virus mit einem ikosaedrischen Kapsid und partiell doppelsträngiger DNA (Summers et al., 1975). Das Kapsid wird aus 240 verschiedenen Core-Proteinuntereinheiten gebildet (Böttcher et al., 1997; Conway et al., 1997), die als Dimere spontan zu T4 symmetrischen Ikosaedern assemblieren können. Innerhalb des Core-Partikels befindet sich die virale Nukleinsäure (Robinson et al., 1974), die als 3,2 Kilobasen große zirkuläre DNA vorliegt. Die Virushülle besteht aus drei in einer Lipidmembran eingelagerten Oberflächenproteinen (HBV surface proteins, HBs) (Almeida et al., 1971), die im Serum infizierter Patienten als nichtinfektiöse sphärische oder filamentöse Partikel gefunden werden (Robinson, 1977). Alle drei besitzen einen gemeinsamen Proteinanteil, das SHBs, welcher auch als S-(small)-HBs bezeichnet wird; das mittlere Protein enthält zusätzlich die PräS2-Domäne (M-(middle)-HBs), das große neben der PräS2-Domäne noch die PräS1-Domäne (L-(large)-HBs). Die präS1-Domäne des LHBs und die präS2-Domäne des MHBs weisen als hydrophile flexible Strukturen nach außen, wobei zu beachten ist, dass präS1 eine duale Topologie besitzt. LHBs wird zunächst mit einer zytosolischen PräS1- und PräS2- Domäne synthetisiert. Später wird es vermutlich im Trans-Golgi-Apparat

modifiziert, wo ein Teil der präS-Domänen umklappt. Einmal sind die PräS-Domänen auf der zytosolischen Seite lokalisiert, wobei der andere Teil auf der Virushülle exponiert wird. Aufgrund dieser Topologie sind die PräS-Regionen für Antikörper (Heermann et al., 1984), für Rezeptoren (Neurath et al., 1992) und auch für Proteasen (Heermann et al., 1987) zugänglich. Dabei besitzt SHBs, bzw. die S-Domäne, wenigstens zwei, aller Voraussicht nach aber vier hydrophobe transmembranäre Helices sowie eine innere Schleife (AS 28-79) und eine äußere Schleife (AS 99-161), wobei letztere die HBsAg-Determinanten trägt. Insgesamt enthalten SHBs bzw. die S-Domäne 14 Cysteine, die untereinander über Disulfidbrücken stark vernetzt sind (Mangold et al., 1993; Mangold et al., 1995) und somit für den konformationellen Aufbau der HBs-Determinanten sorgen (Gilbert et al., 2005). Am endoplasmatischen Retikulum sprossen SHBs bzw. die S-Domäne zu Partikeln aus bzw. umhüllen die Core-Partikel, wodurch das komplette HBV-Partikel gebildet wird. Die subviralen sphärischen Partikel enthalten einen geringen Anteil an LHBs, im Gegensatz zu den Viren und Filamenten. SHBs ist in allen Partikeln die Hauptkomponente, MHBs eine Nebekomponente mit bislang noch ungeklärter Funktion. MHBs ist in der Prä-S2-Domäne N- und O-glykosyliert und bindet modifiziertes Serumalbumin (Schmitt et al., 1999 und 2004). Eine lösliche Form des Core-Proteins wird von der infizierten Zelle sezerniert. Dieses HBeAg ist für die Virusvermehrung nicht essentiell, sondern es wirkt als Immunmodulation und wird meist nur bei hoher Virämie gefunden.

A



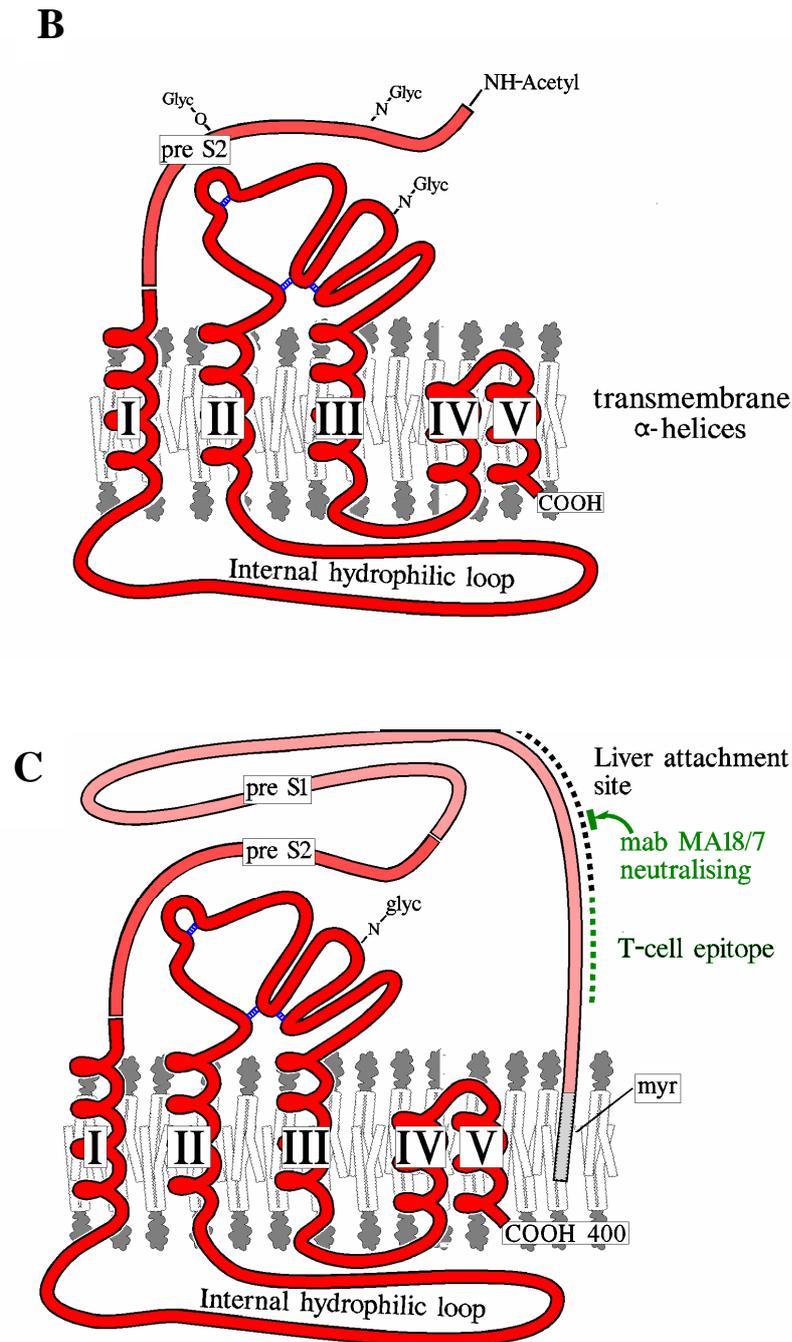


Abb.1 Schematischer Aufbau der Oberflächenstrukturproteine des HBV. Dargestellt sind nacheinander der Aufbau von SHBs (A), MHBs (B) und LHBs (C). Liver attachment site: Hepatocytenbinderegion, mab MA 18/7: monoklonaler Antikörper gegen die präS1-Region gerichtet (AS 20-23, Genotyp D), myr: Myristinsäure-Rest am Aminoende, N-glyc: asparagingekoppeltes Oligosaccharid, NH-Acetyl: Acetyl-Rest am Aminoende, O-Glyc: Threoninegekoppeltes Oligosaccharid. Die Abbildungen stammen aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU-Gießen.

1.3 Genotypen des HBV

Durch Analyse der DNA Sequenz des kompletten Genoms oder Teilbereichen des HBV-Genoms erfolgt die Genotypisierung der Hepatitis B Viren. Derzeit kann man die sieben Genotypen A bis G in der Gruppe der humanen Hepatitis B Viren unterscheiden (Stuyver et al., 2000). Es muß ein Unterschied von mindestens 8 % zum Vergleich des kompletten HBV-Genoms vorliegen, um einen neuen Genotyp zu begründen (Magnius und Norder, 1995; Norder et al., 1992; Okamoto et al., 1988). Daneben steht auch der Vergleich der Teilsequenz des HBV-Genoms (Hepatitis B Surface-Gensequenz) bereit, bei dem man Unterschiede von mehr als 4,1 % beobachten muss, um die Zugehörigkeit zu einem neuen Genotyp zu begründen. Ferner existiert die Einteilung in verschiedene Subtypen des Hepatitis B Virus aufgrund ihrer Reaktivität mit unterschiedlichen Antiseren. Verwendet wurden subtypspezifische Antikörper gegen das Hepatitis B Surface-Protein (HBsAg). Damit wurden neun verschiedene Subtypen unterschieden (Courouce-Pauty et al., 1983). Es wurden die *a*-Determinante (bei allen Subtypen), 2 Subdeterminanten (*d* oder *y*, und *w* oder *r*) sowie weitere Subdeterminanten *q*⁻ und *q*⁺ beschrieben. Es resultieren die Subdeterminanten ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq⁺ und adrq⁻.

Die Genotypen sind geographisch unterschiedlich verteilt. Genotyp A ist pandemisch, aber vorwiegend in Nordwesteuropa, Nordamerika und Zentralamerika lokalisiert. Genotyp B findet sich vorwiegend in Indonesien, China und Vietnam; Genotyp C in Ostasien, China, Japan, Korea, Polynesien und Vietnam; Genotyp D ist pandemisch; Genotyp E findet sich in West- und Zentralafrika; Genotyp F in Südamerika und Polynesien; Genotyp G wahrscheinlich vorwiegend in Frankreich und den Vereinigten Staaten (Andre, 2000; Tanaka, 2000; Stuyver et al., 2000; Lindh et al., 1999). Interessant ist, dass z.B. ein niedrigerer Therapieerfolg mit alpha-Interferon bei chronisch infizierten HBV-Trägern mit dem Genotyp C im Vergleich mit Patienten, die den Genotypen B hatten, beobachtet werden konnte (Kao et al., 2000). Ein wichtiger Aspekt, der die Immunisierung von Patienten betrifft, beschreibt den unterschiedlichen Impferfolg bzw. das Auftreten von Impfausfällen in bestimmten „Genotypregionen“. Es wurde z.B. in einem Verbreitungsgebiet mit dem höchsten Auftreten des HBV-Genotyps D von einer Impfung mit dem Genotyp A berichtet, bei der im Anschluss ein Impfausfall aufgetreten war (Carman et al., 1990).

1.4 Pathogenese und Klinik beim Infektionsprozess

Das im Blut antransportierte Virus interagiert über einen noch weitgehend ungeklärten Mechanismus mit unbekanntem Oberflächenstrukturen der Hepatozyten. Dabei bindet das Virus auf seiner Seite mit einer bestimmten Aminosäuresequenz der präS1-Region mit dem Hepatozyten.

Anschließend repliziert das Virus im Hepatozyten wie folgt: Vermutlich wird die HBs-Hülle vor dem Transport des Core-Partikels zur Kernzellmembran abgestreift (Kann und Gerlich, 1998). Dort wird das Core in den Kernporen eröffnet und das Genom in das Nukleoplasma entlassen (Rabe et al., 2003). Die allein durch Basenpaarung in zirkulärer Form gehaltene DNA wird kovalent verschlossen. Es entsteht die ccc-DNA. Zunächst wird von einem Strang dieser DNA ein RNA-Intermediat hergestellt, mit Hilfe dessen unter Verwendung der HBV-kodierten reversen Transkriptase im Innern der Core-Partikel ein Minusstrang der DNA gebildet wird. Eine Kopie wird als Plusstrang von der Polymerase gebildet. Danach wird das virale Kapsid am endoplasmatischen Retikulum von den viralen Hüllproteinen mit einer zellulären Membran umgeben und vermutlich über den Golgi-Apparat sezerniert (Kann und Gerlich, 1998). Für die Sekretion der Viren sind das SHBs und das LHBs essentiell. Durch die duale Topologie des LHBs ist die PräS-Domäne zunächst im Zytosol lokalisiert und vermittelt die Interaktion mit den gereiften DNA-haltigen Core-Partikeln. Später wird etwa die Hälfte der PräS-Domänen auf die Oberfläche der Partikel transloziert, so dass sie dann auch für einen neuen Infektionsvorgang zur Verfügung stehen (Kann und Gerlich, 1998).

Immunpathogenese:

HBV wirkt nicht zytotoxisch, die hepatotoxische Wirkung der Infektion mit HBV wird maßgeblich durch die induzierte Immunreaktion hervorgerufen. Teile des Virus werden von MHC Klasse I Molekülen auf der Hepatozytenoberfläche präsentiert, woraufhin CD8-positive Lymphozyten spezifische zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren. Bei diesem Prozeß werden Mediatoren, wie Interferon γ oder Tumornekrosefaktor- α freigesetzt, die zur Apoptose der Hepatozyten führen. Dabei ist der weitere Verlauf der Erkrankung maßgeblich vom Alter des Patienten abhängig. Bei Neugeborenen und Kleinkindern geht die meist asymptomatische Infektion meist in eine chronische Form über. Bei Erwachsenen unterscheidet man prinzipiell drei Verlaufsformen: (1) die akute Hepatitis, die in fast 90 % der Fälle ausheilt; (2) die chronische Hepatitis, die in eine Leberzirrhose übergeht; (3) den

asymptomatischen Carrierstatus. Bei der akuten Hepatitis mit einer ungefähren Inkubationszeit von 2 bis 7 Monaten kommt es zu einem starken Anstieg der Transaminasen und in 2/3 der Fälle auch zur Entwicklung eines Ikterus. Uncharakteristische Beschwerden wie Übelkeit, Brechreiz, Gelenkschmerzen und Völlegefühl können bestehen.

Das HBsAg stellt den wichtigsten diagnostischen Parameter dar, da er sowohl kurz vor, während und noch kurz nach der Transaminasenerhöhung im Serum positiv ist. HBeAg verläuft parallel zum HBsAg.

Noch während des Transaminasenanstiegs erscheint im Serum das Anti-HBc, zunächst als IgM, dann als IgG, während Anti-HBs und Anti-HBe erst später nachweisbar sind. Das Persistieren von Anti-HBs im Serum zeigt Immunität gegen eine erneute Infektion mit HBV an. Bei ungefähr 5 bis 10 % der Erwachsenen, die an einer akuten HBV Infektion erkranken, entwickelt sich eine chronische Hepatitis. Die Chronizität ist als das mehr als 6-monatige Persistieren des HBsAg im Serum definiert. Bei der chronischen Hepatitis sind die Transaminasen meist nicht so stark erhöht (auf das 2 bis 5 – fache der Norm) und ein Ikterus ist selten. Die Entwicklung einer Leberzirrhose bestimmt den weiteren klinischen Verlauf. Bei chronisch Infizierten ist das Risiko, dass sich ein Leberzellkarzinom (HCC) entwickelt um den Faktor 100 bis 200 erhöht (Beasley, 1982; Yan et al., 1996). Bei ungefähr 1-5 % der chronischen Patienten beobachtet man eine spontane Serokonversion, wobei das HBsAg eliminiert wird und dafür Anti-HBs im Serum erscheint. Der HBV-Carrierstatus ist dadurch definiert, dass die Patienten im Serum HBsAg aufweisen, jedoch besitzen sie keine klinischen, klinisch-chemischen oder histologischen Merkmale einer Hepatitis. Weniger als 2 % entwickeln eine Leberzirrhose.

1.5 Variabilität und Resistenz

Es existieren HBV-Mutanten, die durch den Austausch der Aminosäure Glycin gegen Arginin an Position 145 der gemeinsamen immundominanten Determinante a des HBsAg charakterisiert sind. Dadurch wird die Bindungsfähigkeit der neutralisierenden Anti-HBs-Antikörper aufgehoben. Obwohl diese Mutation recht selten auftritt, stellt sich die Frage, ob bei zunehmendem Selektionsdruck der Schutz vor Infektion bei alleiniger Impfung gegen SHBs noch ausreichend ist (Cooreman et al., 2001; Protzer et al., 2000). Insbesondere stellt sich diese Frage bei Auftauchen von Escapemutanten

nach stattgefundener antiviraler Therapie und gleichzeitiger Persistenz des HBV.

1.6 Immunantwort bei Infektion

Es werden je nach immunologischer Ausgangssituation des Organismus unterschiedliche Reaktionen gegen die viralen Proteine beobachtet. Neben Antikörpern gegen das HBcAg werden auch Antikörper gegen das HBsAg gebildet. Dieses Anti-HBs vermag die Infektiosität von HBV in vitro zu neutralisieren und in vivo vor einer Infektion zu schützen. Folglich gilt der Anti-HBs Titer als Marker der Immunität. Nach Impfung gilt ein Serumspiegel von 10 IU/l Anti-HBs als ausreichender Schutz vor Infektion. Neben Anti-HBs als Reaktion auf SHBs werden auch Anti-Prä-S1 und Anti-Prä-S2 als Reaktion auf LHBs bzw. MHBs gebildet. Dabei sind die Immunglobuline die Produkte differenzierter B-Zellen und vermitteln den humoralen Anteil der Immunreaktion. Die primäre Funktion der Antikörper ist die Bindung von Antigen und die Inaktivierung von Toxinen, Mikroben, Parasiten oder anderer körperfremder Substanzen. Die Molekülstruktur der Immunglobuline kann relativ leicht beschrieben werden. Alle Immunglobuline bestehen aus mindestens zwei schweren und zwei leichten Ketten. Der Immunglobulin-Isotyp (G,A,M,D,E) wird durch die jeweilige schwere Ig-Kette festgelegt. Die Typen IgG und IgA können weiter in die Subklassen G1,G2,G3,G4 und A1 bzw. A2 unterteilt werden, basierend auf spezifischen Antigen determinanten schwerer Ig-Ketten. Die vier Ketten des IgG sind kovalent durch Disulfidbrücken verbunden. Dabei bilden die V- und C-Regionen, die auch als Domänen bezeichnet werden, die jeweilige Kette. Die leichten Ketten haben je nach Isotyp eine variable (V_L) und eine konstante Einheit (C_L). Die schweren Ketten haben eine variable Einheit (V_H) und drei oder vier konstante Einheiten (C_H). Die konstanten Regionen der Ig-Moleküle bestehen aus homologen Sequenzen und haben die gleiche Primärstruktur wie alle anderen Ig-Ketten der selben Isotypen und Subklassen. Die konstanten Regionen sind an den biologischen Effektorfunktionen der Antikörper beteiligt. Die variablen Regionen (V_L und V_H) bilden die antikörperbindende Region (Fab) des Moleküls. Dabei findet man in den V_L - und V_H - Regionen hypervariable Bezirke, die die Antigenbindungsstelle bilden, die für jedes Ig-Molekül einzigartig ist. Ein Idiotyp stellt die spezifische Region des Fab-Anteils dar, woran das Antigen bindet. Antikörper gegen diese Stelle heißen antiidiotypische Antikörper, deren Bindung in vivo ein „off“-signal an die B-Zelle darstellt, um die Antikörperproduktion zu beenden. Das IgG ist mit 75-85 % das häufigste

Serumimmunglobulin. Die Konzentration von IgG1 ist die höchste, absteigend bis zum IgG4. Die Aufgabe der Subklassen besteht in der unterschiedlichen Aktivierung von Makrophagen und Komplement, so dass der Mangel einer einzelnen Subklasse schwere bakterielle Infektionen nach sich ziehen kann. IgG Antikörper entstehen nach wiederholtem Antigenkontakt als sekundäre Antikörperantwort. Die IgM Antikörper zirkulieren als 950-kDa-Pentamer mit 160-kDa-bivalenten Monomeren, die mittels der J-Kette verbunden sind, einem 15-kDa-Nicht-Immunglobulinmolekül, das auch die Polymerisation von IgA beeinflusst. IgM ist der Antikörper der Primärantwort, der als erstes nach einer Infektion gebildet wird. IgA kommt vor allem zur Immunabwehr der Schleimhäute, IgD als Hauptrezeptor für Antigen auf der B-Zell-Oberfläche und IgE bei Mastzellreaktionen, z.B. im Rahmen von allergischen Reaktionen vor.

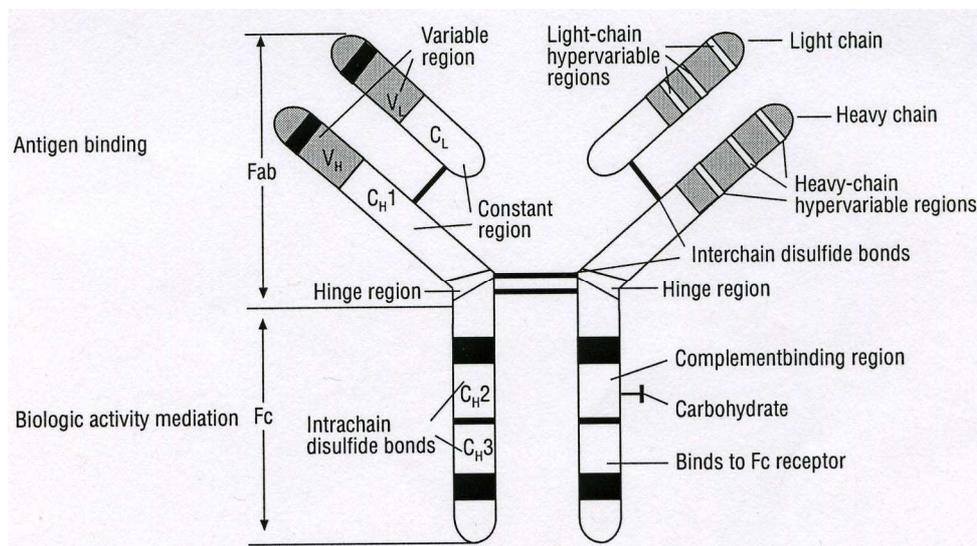


Abb.2: Struktur/Aufbau eines Antikörpers. Man erkennt die Antigenbindungsstelle (Antigen binding, Fab) und den konstanten, die biologischen Eigenschaften bestimmenden Fc-Teil (biologic activity mediation). Ausserdem erkennt man den Aufbau aus schweren (heavy chain) und leichten (light chain) Ketten. Ferner sind die variablen und hypervariablen Regionen des Antikörpers eingezeichnet. Der Ketten des Antikörpers werden über Disulfidbrückenbindungen (Interchain disulfide bonds) zusammengehalten. Die Abbildung wurde einem Schaubild des Universitätsspitals Basel entnommen.

1.7 Prophylaxe

Zur passiven Immunisierung (v.a. für die Postexpositionsprophylaxe) wird spezifisches Hepatitis-B-Immunglobulin (HBIG) verwendet, welches in hohen Konzentrationen Anti-HBs enthält. Zur aktiven Impfung wird das Hüllprotein des Hepatitis-B-Virus (HBsAg) verwandt, wobei die Impfstoffe der ersten Generation aus dem Plasma chronischer Virusträger gewonnen wurden. Die durch Reinigungsverfahren isolierten 22-nm-Partikel, die aus HBsAg bestehen, wurden nach Inaktivierung an Aluminiumhydroxid adsorbiert (Hilleman et al., 1983). Der Impfstoff der zweiten Generation bestand gleichfalls aus HBsAg, wobei dieser aber aus gentechnisch veränderten Hefezellen gewonnen wird. Das für das HBsAg kodierende Gen und die entsprechenden Steuerelemente, die die Expression des Gens kontrollieren, werden in ein Hefepiasmid eingefügt. Zellen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) werden mit diesem Plasmid stabil transfiziert, so dass diese Zellen nun das HBsAg in großer Menge produzieren. Dabei weisen die entstehenden sphärischen Partikel im Gegensatz zu den Plasmaproteinen allerdings keine Kohlenhydratseitenketten auf (McAleer et al., 1984). Als Reaktion auf diese Impfung mit HBsAg bildet der Körper also lediglich Anti-HBs, wobei die Schutzwirkung vor Infektion aber durchaus als gut bezeichnet werden kann (Legler et al., 1983). Allerdings gibt es in der Normalbevölkerung einige Prozent an Non-Respondern, die kein oder sehr wenig an Anti-HBs bilden (< 10 IE/l). Bei älteren Personen oder immunologisch geschwächten Personen gibt es bis zu 50 % Nonresponder (Wolters et al., 2003). Sichere Immunität besteht für circa 10 Jahre erst dann, wenn 4 bis 6 Wochen nach der letzten Impfung ein Anti-HBs-Titer von mehr als 100 IE/l vorliegt. Auch wurden Mutationen bei gruppen-spezifischen SHBs-Epitopen beschrieben, wie z.B. die Mutation des Glycins in Position 145 des SHBs-Protein nach Arginin (G145R). Diese Escape-Mutanten sind sowohl vermehrungs-, als auch übertragungsfähig, wenngleich ein genügend hoher Anti-HBs-Titer auch vor Infektion mit diesen Mutanten schützen sollte. Dennoch ergibt sich damit die Frage nach noch wirksameren Impfstoffen, die authentischer und immunogener sind und damit sowohl die effektive Impfung von Non-Respondern ermöglichen, als auch wirksam vor den Escape-Mutanten schützen. Ein Weg stellt hierbei die Verwendung eines Antigens dar, das sowohl die SHBs, wie auch die MHBs und LHBs Domänen enthält. Damit würde der Geimpfte neben Anti-HBs auch Antikörper gegen präS1 und präS2 bilden, was noch effektiver vor Infektion mit HBV schützen sollte.

Basierend auf Daten von Neurath et al. (1986), die zeigten, dass die PräS1-Sequenz AS 10-36 die HBV-Bindung an Leberzellen inhibieren kann, wurde ein neuer PräS1-haltiger Impfstoff entwickelt. Dieser ist teilweise bereits in Europa lizenziert (Young et al., 2001), dennoch sind Impfstoffe, die die gesamte AS-Sequenz der PräS1-Domäne besitzen, nicht verfügbar (Glebe et al., 2005).

Suzuki et al. (1994) entwickelten eine Vakzine, die in Hefe exprimierte PräS2/S-Partikel enthielt (Kuroda et al., 1991; Fujisawa et al., 1990). Auch wurden neu entwickelte prä-S/S-Impfstoffe in bestimmten Risikogruppen eingesetzt (Shouval, 2003). Möglicherweise besitzen diese Impfstoffe höhere Immunogenität und beschleunigen das Auftreten einer Serokonversion in Non-Respondern (Yamada et al., 1998). Ferner wurden auch im tierischen Zellsystem exprimierte PreS2/S-Vakzinen entwickelt (Soulie et al., 1991). Auch hier findet man höhere Serokonversionsraten als bei herkömmlichen Impfstoffen (Jungers et al., 1994).

1.8 *In vitro* Infektionssystem für HBV

Primäre humane Hepatozyten-Kulturen aus chirurgischem Resektionsmaterial waren für viele Jahre die einzigen für HBV suszeptiblen Zellsysteme (Gripon et al., 1988), um den Infektionsverlauf zu untersuchen. Dabei stellen primäre humane Hepatozyten hohe Ansprüche an spezielle Matrices (z.B. Kollagen) und an Kulturmedien, die in der Regel Wachstumsfaktoren enthalten müssen (Runge et al., 1999). Trotzdem war die Infektionsrate dieser Zellen im Vergleich zur Suszeptibilität von gesunden humanen Leberzellen *in vivo* nur gering. Ausserdem war das Zeitintervall einer möglichen Infektion während der Kultur nur gering (5 bis 7 Tage). Darüber hinaus war die Verfügbarkeit humaner Hepatozyten eingeschränkt und die Qualität der zur Verfügung stehenden Zellen sehr heterogen (Gripon et al., 1988; Galle et al., 1994; Mabit et al., 1996).

Im Gegensatz dazu können primäre Hepatozyten-Kulturen von *Tupaia belangeri* genauso gut mit HBV infiziert werden wie primäre humane Hepatozyten-Kulturen von guter Qualität. Die Infektionsraten konnten bei Verwendung von mit Succrose-Gradientenzentrifugation gereinigtem HBV gegenüber einer Infektion mit dem gesamten Serum gesteigert werden, was auf einen unbekanntem Inhibitionsfaktor für die Infektion mit HBV in humanen Seren hinweist (Köck et al., 2001). HBV induziert keine morphologischen Veränderungen in infizierten Zellen. Der Nachweis einer *in vitro* Infektion mit HBV sollte mit der quantitativen Detektion verschiedener Marker

durchgeführt werden. Am einfachsten ist die Detektion sekretierter viraler Antigene, wie HBeAg oder HBsAg. Diese sind 9-12 Tage p.i. mit kommerziell erhältlichen ELISAs nachweisbar (Glebe et al., 2003; Glebe et al., 2005). HBeAg als Marker hat den Vorteil, dass es im Gegensatz zu HBsAg nicht im gereinigten viralen Inokulum enthalten ist. Die Detektionsschwelle im primären Tupaia Hepatozytensystem mit gereinigtem HBV liegt bei einem HBV Partikel pro Hepatozyt in Kulturschalen mit 10^5 Zellen (Glebe et al., 2003; Glebe et al., 2005; Sauerbrei et al., 2005). Die gute Qualität der isolierten Tupaia Hepatozyten ist sicher reproduzierbar, die Verfügbarkeit ist aufgrund der erfolgreichen Züchtung der Tiere in Gießen gegeben.

1.9 Ziele der Arbeit

Für die Untersuchung der Infektion von Hepatozyten – Kulturen stand in dieser Arbeit das Infektionsmodell mit primärem Tupaia-Hepatozyten zur Verfügung (Glebe et al., 2003). Mit diesem Infektionsmodell für HBV besitzt man ein aussagekräftiges und im Rahmen der experimentellen Möglichkeiten überschaubares System, das die Simulation von Infektionsvorgängen *in vitro* erlaubt. Die Idee der vorliegenden Arbeit besteht darin, nicht nur die Infektion mit HBV an primären Tupaia-Hepatozyten zu untersuchen, sondern darüber hinaus neutralisierende Antiseren gegen HBV Oberflächenstrukturproteine zu charakterisieren, das Potential der Inhibitionsfähigkeit zu untersuchen und die Wirksamkeit bekannter Impfstoffe zu hinterfragen. Dazu werden definierte Virusmengen, die *in vitro* normalerweise sicher eine Infektion verursachen, zuvor mit Antikörpern inkubiert. Anschließend wird anhand der Antigenproduktion der Zellen beurteilt, ob eine Infektion stattgefunden hat. Dabei ist nicht allein die rein qualitative Aussage über die Infektion möglich, sondern auch Angaben, wie stark ein Infektionsverlauf ist und mit welchen Mengen an Antikörpern ein Infektionsereignis verhindert werden kann. Folglich erlaubt dieser Versuchsaufbau die Beantwortung mehrerer Fragestellungen: Zum einen ist die Beurteilung der Inhibitionspotenz ganz unterschiedlicher Antikörper und Antikörperklassen möglich, zum anderen wird die Bedeutung des PräS1-Oberflächenantigens und dagegen gerichteter Antikörper für den Infektionsverlauf näher beleuchtet. Außerdem beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit einem Nachweisverfahren für anti-präS1. Dabei ist das Ziel, qualitative Aussagen über das Vorliegen dieser Antikörperklasse in Seren zu treffen, um z.B. den Impferfolg mit einem LHBs enthaltenden Impferum beurteilen zu können.

2. Material

Für das Ansetzen aller Lösungen und Puffer wurde Wasser aus der Reinstwasseranlage (Ionenaustauscher, Millipore, Eschborn) verwendet.

2.1 Zellkultur der primären Tupaia-Hepatozyten

2.1.1 HGM (Hepatocyte Growth Medium)

Zur Kultivation der äusserst empfindlichen und anspruchsvollen primären Tupaia Hepatozyten wurde im Institut für Medizinische Virologie Giessen ein eigens auf diese Zellen abgestimmtes Zellkulturmedium entwickelt. Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf die Herstellung jeweils einen Liters HGM. Zur Vereinfachung der Handhabung wurden von manchen in geringer Menge vorhandenen Substanzen zunächst Stammlösungen angesetzt, die später verdünnt eingesetzt wurden.

1 l	DMEM	(Invitrogen, Karlsruhe)
	(Dulbecco's Modified Eagle Medium Kat.nr: 21063)	
10 ml	ITS (0,5mg/ml Insulin, 0,5 mg/ml Transferrin, 0,5µg/ml Selen)	(Invitrogen)
2 g	BSA	(Sigma, Taufkirchen)
2 g	Glukose	(Merck, Darmstadt)
2 g	Galaktose	(Merck)
0,1g	Ornithin	(Sigma)
0,03g	Prolin	(Sigma)
0,61g	Nikotinamid	(Sigma)
0,544µg	ZnCl ₂	(Fluka, Seelze)
0,75µg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	(Sigma)
0,2µg	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	(Sigma)
0,025µg	MnSO ₄	(Sigma)
50µM	Glutamax I	(Invitrogen)
0,01µM	Dexamethason	(Invitrogen)
100mg	Gentamycin	(Invitrogen)
250µg	Amphotericin B	(Invitrogen)

2.1.2 Medium zum Einfrieren von primären Tupaia-Hepatozyten

Gefriermedium	70% UW-Lösung (University of Wisconsin)	
100 mM	Laktobionsäure	(Sigma)
25 mM	K ₂ HPO ₄	
5 mM	MgSO ₄	
30 mM	Raffinose	
3 mM	Glutathion	
1 mM	Allopurinol	
5 %	PEG 3,35	
15 mM	Glycin	
0,25 mg/l	Amphotericin B	(Invitrogen)
100 mg/l	Gentamycin	(Invitrogen)

→ mit KOH Plätzchen einen pH von 7,4 einstellen

20% Fetales Kälberserum	(PAA, Pasching, Österreich)
10% Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma)

2.2 Isolation der primären Tupaia-Hepatozyten

Für sämtliche Versuche wurden Hepatozyten des ostasiatischen Spitzhörnchens (*Tupaia belangeri*) isoliert. Diese Tiere wurden von der Tierzucht des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus- Liebig- Universität zu Giessen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Valerius freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Isolation dieser Primärzellen werden folgende Substanzen benötigt.

PBS (ohne MgCl ₂ , CaCl ₂)	(Invitrogen, Karlsruhe, Kat.nr:10010)
EGTA	(Sigma, Taufkirchen)
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium)	(Invitrogen, Kat.nr:21063)
Kollagenase, Typ IV	(Sigma)

2.3 Gereinigte Hepatitis-B-Viren zur Infektion der primären Tupaia-Hepatozyten

Für die Infektionsversuche wurden primäre Tupaia-Hepatozyten verwendet, die nach Isolation für drei Tage kultiviert wurden. Zur Infektion wurde durch Succrose-Gradientenzentrifugation gereinigtes Virus aus humanem HBV-haltigen Blutplasma

Fraktion ID 307 (12/03) (Fraktion 5; 45,5% Succrose) verwandt, mit einer Konzentration von $3,8 \times 10^{11}$ GE/ml, ausserdem die Virusfraktion 3 (51% Succrose) mit $4,6 \times 10^{09}$ GE/ml und die Fraktion 4 (47,5% Succrose) mit einer Konzentration von $4,3 \times 10^{10}$ GE/ml (wurde von Dr. Glebe zur Verfügung gestellt).

2.4 Inhibition der HBV-Infektion

2.4.1 Inhibition der HBV-Infektion mit neutralisierenden Antikörpern

Als monoklonale Antikörper standen MA 18/07, C 20/2 und Q 19/10 zur Verfügung, die murinen Ursprungs waren und aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU Giessen stammten.

MA 18/07 (Heermann et al., 1984)

Dieser Antikörper lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Er erkennt die Aminosäuren 20–23 (DPAF) in der PräS1-Domäne des LHBs von HBV (Genotyp D).

C 20/2 (Sobotta et al., 2000)

Dieser Antikörper lag in einer Konzentration von 1 mg/ml vor. Er erkennt konformationsabhängig die Determinante *a* der S-Domäne von HBV.

Q 19/10 (Heermann et al., 1987)

Dieser Antikörper lag ebenfalls in der Konzentration von 1 mg/ml vor. Er bindet präferentiell an die N-glykosylierte PräS2-Domäne des MHBs von HBV.

Negativkontrolle: anti-CMV

(Dianova)

Antikörper gegen das Cytomegalievirus

2.4.2 Inhibition der Infektion mit gefällten polyklonalen Antikörpern aus Seren

Die folgenden Proben wurden mit den unterschiedlichsten Verfahren zur Gewinnung der Antikörperfraktionen aufgereinigt. Die Proben der verschiedenen Spender wurden freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin Suhl GmbH (ITMS) zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die Spender mit dem handelsüblichen Impfstoff Engerix® geimpft und gegebenenfalls geboostert.

Eine Übersicht bietet die folgende Tabelle:

Tab.1: Hyperimmunsponden-Proben von ITMS

Spender	Zeitpunkt HBV- Erkrankung	Impfung	Boosterung	Spende- Nr.	Abnahme
1120381	1982	-	06.02.02	1066757	07.03.02
1109569	-	23.10.97	26.11.01	1066834	08.03.02
1118894	-	25.01.02		1061908	08.03.02

Zusätzlich wurden noch zwei weitere Seren verwandt, die vom Institut für Medizinische Virologie (JLU Giessen) zur Verfügung gestellt wurden. Ein Negativserum eines HBV-negativen Spenders (ID 287). Ferner wurde ein HBsAg negatives Serum verwandt, eines Geimpften, der nicht mit HBV infiziert war. Dieses Serum enthielt einen anti-HBs Titer von > 1000. Zusätzlich wurde der Spender ca. 10 Tage vor Blutabnahme einer erneuten HBV Impfung mit dem präS-haltigen Impfstoff Hepacare unterzogen (ID 155).

Ferner stellte Professor Heinz Schaller (ZMB, Heidelberg) freundlicherweise mehrere Seren zur Verfügung, deren Antikörper gegen die entsprechenden Peptide gerichtet sind.

Antiserum H 651

Dieser polyklonale Antikörper (aus Kaninchen) ist gegen die S-Domäne des HBV gerichtet (Engerix Impfung, Genotyp A).

Antiserum H 762

Dieser polyklonale Antikörper (aus Kaninchen) ist gegen die präS1-Domäne des HBV gerichtet.

Ferner wurde für weitere Inhibitionsexperimente vom Institut für Medizinische Virologie (JLU Giessen) ein Schafantiserum bereitgestellt. Dieses Serum enthielt polyklonale Antikörper gegen alle drei Oberflächenstrukturproteine des HBV, also anti-S, anti-präS1 und anti-präS2. Die Antikörper sind gegen die HBV Genotypen A, C, D gerichtet. Das Schaf wurde mit gereinigtem HBsAg von HBV-Trägern generiert (Gerlich et al. 2004).

2.4.3 Inhibition der Infektion mit Antikörpern gegen spezifische Regionen des HBV Oberflächenproteins

Dankenswerterweise wurden von Frau Dr. Jennifer Waters (Imperial College, London) zwei monoklonale Antikörper für Inhibitionsexperimente zur Verfügung gestellt. Es lagen zwei Präparationen des Antikörpers RFHBs 1 vor, wie der Antikörper RFHBs 7. Alle Antikörper gehören zur Klasse IgG1 und wurden mit Hilfe einer Protein A Säule aufgereinigt.

RFHBs 1 Bindet ein zyklisches Peptid der Aminosäuren 124-137 im SHBs-Protein.

Präparation (Stock: 0,198 mg/ml)

RFHBs 7 Bindet ein zyklisches Peptid der Aminosäuren 139-147 im SHBs-Protein.

Nachfolgend sollen die zuvor beschriebenen Antikörper und Antiseren in einer Tabelle zusammengefasst werden.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper / Antiseren

Antikörper/Antiserum	Erläuterungen
ID 287 human	Negativserum eines HBV-neg. Spenders
ID 155 human	Anti-HBs>1000 + präS1-HBV Impfung
H 651 Kaninchen	Gegen S-Domäne des HBV
H 762 Kaninchen	Gegen präS1-Domäne des HBV
Schafantiserum	Enthält anti-S, anti-präS1 und anti-präS2
RFHBs1 MoAk, Maus	Bindet an zykl. Peptid der AS 124-137
RFHBs7 MoAk, Maus	Bindet an zykl. Peptid der AS 139-147
MA 18/07 Maus	Gegen AS 20-23 der präS1-Domäne
Q 19/10 Maus	Gegen N-glykosylierte präS2-Domäne
C 20/02 Maus	Gegen die Determinante a der S-Domäne

2.4.4 Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten

Die zwei murinen Antikörper MA 18/07 und C20/2 wurden mit Hilfe eines Ficinverdau zur Inhibition der Infektion durch Fab-Fragmente herangezogen.

ImmunoPure®IgG1 Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (Pierce)

Vivaspin 500 µl und 2 ml (Vivascience)

0,1 M	Zitronensäurelösung (pH=3)	(Sigma)
0,02%	Natriumazidlösung (100 ml)	(Sigma)

2.5 ELISA zur HBsAg-Bestimmung

Beschichtungspuffer (NaPP)	183 mM	NaCl
	8,6 mM	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O
	2,2 mM	KH ₂ PO ₄
	-> einstellen auf pH 7,4	
TNE-Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	140 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Antikörper αHBs (C20/2)	siehe 2.4.1	
α-HBs-Peroxidase-Konjugat	Affinitätsgereinigter polyvalenter Antikörper	
(Stock: 1 mg/ml)	aus Ziegenserum (Dade Behring AG, Marburg).	
OPD Tabletten	Substrat: o-Phenylendiamin (DAKO)	

2.6 Proteinauftrennung mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde mit dem Kammersystem „Xcell SureLock Mini-Cell“ der Firma Invitrogen gearbeitet. Als Molekülmassenmarker wurde „SeeBlue Plus2™ Prestained“ (Invitrogen) verwendet. Alle verwendeten Gele stammten aus der Reihe „Novex high performance, pre-cast gels“ von Invitrogen. Im folgenden sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer aufgeführt.

NuPAGE™ LDS Probenpuffer (4X)	Kat.nr.NP0007	(Invitrogen)
	4,0g	Glycerol
	0,682g	Tris Base
	0,666g	Tris HCl
	0,800g	Lithiumdodenylsulfat
	0,006g	EDTA
	0,75ml	SERVA Blue G250 (1%)

0,25ml Phenolrot (1%)
→ mit dH₂O auf 10ml auffüllen

NuPAGE™ MOPS/SDS - Puffer (20X) Kat.nr.NP0001 (Invitrogen)
104,6g MOPS
60,6g Tris
10g SDS
3g EDTA
→ mit dH₂O auf 500ml auffüllen

NuPAGE™ MES/SDS- Puffer (20X) Kat.nr.NP0002 (Invitrogen)
97,6g MES, pH 7,2
60,6g Tris Base
10,0g SDS
3,0g EDTA
→ mit dH₂O auf 500ml auffüllen

2.7 Detektion von Proteinen mittels Western Blot und anschließender immunologischer Färbung

2.7.1 Western Blot

Es wurde mit dem Novex® Western Transfer Apparat „Xcell II™ BlotModule“ der Firma Invitrogen gearbeitet.

Blotmembran Immobilon-P Transfermembran
(PVDF; Porengröße: 0,45µm)
(Millipore, Eschborn)

Transferpuffer (1X) 14,4g Glycin
3g Tris
150ml Methanol
→ mit dH₂O auf 1000ml auffüllen

2.7.2 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine mittels Chemilumineszenz

2.7.2.1 Färbung des Blots mit Western Breeze[®]

Western Breeze[®] Chemiluminescent Immunodetection System

(zur Detektion von Maus-Primärantikörper) (Invitrogen)

Blockpuffer BSA (Fraktion V) (Roth, Karlsruhe)

RotiBlock[®] (Roth)

Waschpuffer PBS/ Tween20

Primärantikörper MA18/07

Sekundärantikörper 2nd Antibody-Solution (Invitrogen)

anti-Maus Antikörper konjugiert mit einer Alkalischen Phosphatase (AP)

Substrat CDP-Star[®] Chemilumineszenz-Substrat für Alkalische Phosphatase

Autoradiographie Kassette (18 x 24cm) (Amersham, Buckinghamshire, GB)

Hyperfilm MP (Amersham)

(High performance autoradiography film)

Automatischer Filmentwickler Curix 60 AGFA (Mortsel, Belgien)

2.8 Materialien zur Silberfärbung

Silbernitratlösung Lösung A:

1,55 g AgNO₃ in 8 ml Bidest lösen

Lösung B:

38,2 ml H₂O

3,8 ml NaOH, 1M

2,8 ml Ammoniak 25 %

Vor Gebrauch Lösung A langsam in Lösung B träufeln

mit dH₂O auf 200 ml auffüllen

Reducer: 50 mg Zitronensäure

0,7 ml Formalin 37 %

in 1 Liter dH₂O lösen

2.9 Materialien zur Coomassie Färbung

Fixierungslösung (50 % Methanol, 15 % Essigsäure in Wasser)

für 1000 ml:

500 ml Methanol

150 ml Essigsäure mit mit 800 ml entionisiertem Wasser mischen

Coomassie Brilliant Blue R250 Lösung (Färbelösung)

0,2 % Coomassie Blue R250 in 50 % Methanol

15 % Essigsäure

für 1000 ml:

Es werden 0,2 g Coomassie Blue R250 in 500 ml Methanol gelöst und 150 ml konzentrierte Essigsäure (Eisessig), sowie 350 ml entionisiertes Wasser dazugegeben.

Vor Gebrauch durch ein Whatman Filterpapier Nr.1 filtrieren.

Entfärber

15 % Methanol, 5 % Essigsäure in Wasser;

für 1000 ml:

150 ml Methanol, 50 ml Essigsäure und 800 ml entionisiertes Wasser mischen.

2.10 Natriumsulfatfällung von Antikörpern aus Serum

Lösung 1

0,2 M NaPP Puffer (pH 7,2)

Herstellung:

6,8 ml 1 M Dinatriumhydrogenphosphat + 3,1 ml 1 M

Natriumdihydrogenphosphat

auf 50 ml auffüllen mit Bidest, sterilfiltrieren

Lösung 2

Natriumsulfat (36% w/w)

Herstellung:

36 g Natriumsulfat + 64 g Bidest, 15 Min. rühren bei 20-25 Grad Celsius,

Bodensatz absetzen lassen

2.11 Sephacelausfällung von Antikörpern aus Serum

Sephacel-Ionenaustauscher in 24 % Ethanol (Lieferant Firma Amersham)

0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0)

Büchner Trichter

Filterpapier (Schleicher und Schuell Rundfilter 589 Schwarzband)

2.12 Antikörperaufreinigung mittels Dynabeads® Protein G

Dynabeads® Protein G (Lieferant Firma Invitrogen)

0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 5,0)

0,01 – 0,1% Tween 20

0,1 M Zitronensäure (pH 2-3)

Resolutionspuffer (Kit der Firma Invitrogen)

3. Methoden

3.1 Zellkultur und Isolation primärer Tupaia-Hepatozyten

Die Infektions- und die damit einhergehenden Inhibitionsexperimente wurden stets mit primären Tupaia-Hepatozyten durchgeführt, die zuvor aus der Leber des südostasiatischen Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* gewonnen wurden. Seglen beschrieb 1976 die Präparation von Zellen durch die Verwendung der Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode, auf die bei den durchgeführten Versuchen zurückgegriffen wurde. Da für den Infektionserfolg der Leberzellen insbesondere auch das Alter (Differenzierungsgrad) der Hepatozyten eine grosse Rolle spielt, wurden die isolierten Zellen direkt in Kultur genommen. Dementsprechend wurden alle Infektionsexperimente mit frischen Tupaia-Hepatozyten durchgeführt.

Gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes wurden die Tiere zunächst für 10 Minuten mit Kohlenstoffdioxid begast. Zur sicheren Feststellung des eingetretenen Todes wurde das Fehlen der Kornealreflexe überprüft und dem Tier zusätzlich das Genick ausluxiert. Um eine möglichst saubere und keimfreie Präparation zu ermöglichen, wurden die Tupaias anschliessend für wenige Minuten in ein Ethanolbad getaucht. Nachdem das Tier auf einer Styroporunterlage mit Hilfe von Nadeln auf dem Rücken fixiert worden war, wurde mit einem Schnitt entlang der Linea alba zunächst das Abdomen und dann der Thorax eröffnet. Im Anschluss daran wurden Hepar und Vena portae freipräpariert. Die Pfortader wurde mittels einer Braunüle (22G, Vasoscan) punktiert und der Kunststoffmantel mit Hilfe einer Klemme fixiert. Um den richtigen Sitz der Braunüle zu bestätigen und damit eine ausreichende Perfusion der Leber zu gewährleisten, wurde zunächst mit einer 20 ml Spritze mit 10-20 ml PBS/5mM EGTA vorperfundiert. Die erfolgreiche Perfusion wird durch eine Aufhellung der bräunlichen Leberoberfläche der unterschiedlichen Lappen dieses Organs bewiesen. Um eine Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte zu erreichen war die verwendete Spüllösung Calcium-Ionen frei, was überdies eine Thrombosierung kleiner Endstromgefässe verhindert. Nach Heparrektomie durch Lösung sämtlicher Ligamente und Gefässe wurde das Organ samt Braunüle vorsichtig auf einen Büchnertrichter gelegt. Damit konnte die eigentliche Perfusionsphase über 20 Minuten mit raumtemperiertem PBS/5mM EGTA beginnen, wobei eine durchschnittliche Durchflussrate von 8 ml/Minute angestrebt wurde. Die Durchflusslösung wurde verworfen. Im Anschluss wurde nochmals für 10 Minuten mit PBS (ohne EGTA)

nachgespült und die entstehende Perfusionslösung wiederum verworfen. Im folgenden begann die Kollagenasebehandlung des Organs mit Hilfe eines geschlossenen rezirkulierenden Systems. Hierzu löste man zuerst 150 mg Kollagenase IV (Sigma) in 200 ml DMEM (ohne Bicarbonat und Phenolrot). Dieses Gemisch wurde sterilfiltriert (Stericup-Filter, Porengrösse 0,22 µm, Millipore, Schwalbach) und anschliessend per Wasserbad auf eine Temperatur von 37 Grad Celsius erwärmt. Daraufhin erfolgte mit dieser Lösung eine erneute 30-minütige Perfusion der Leber, etwa bis zum Poröswerden des Peritoneum viscerales und der Leberkapsel. Folgend wurde das so vorbehandelte Organ auf eine Zellkulturschale verbracht und unter der Sterilbank mittels zwei Einmalskalpellen zerkleinert. Unter gleichzeitiger vorsichtiger Entfernung der Vesica biliaris wurde damit eine mechanische Herauslösung der Hepatozyten vorgenommen. Die Gewebestücke konnten dann mit der zur Perfusion verwandten Kollagenaselösung aufgeschwemmt und in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt werden. Auf einem Schüttler (80-100 rpm) erfolgte eine weitere Inkubationszeit für etwa 10 Minuten bei 37 Grad Celsius. Daraufhin wurde die Lebersuspension mit Hilfe einer Siebdruckgaze (Porengrösse 210 µm; Koenen Siebdrucktechnik, München) filtriert, um nicht desintegrierte Gewebeteilchen abzutrennen. In vorgekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) wurde das Filtrat gleichmässig verteilt und in einer ebenfalls vorgekühlten Zentrifuge (Eppendorf 5810R, Rotor A4-62) bei 4 Grad Celsius und 40 g (446 rpm) für 6 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen und verworfen worden war, wurde das verbliebene Zellpellet langsam in 10 ml eiskaltem DMEM resuspendiert und anschliessend mit DMEM auf 40 ml aufgefüllt. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Hepatozyten und der übrigen in der Leber vorkommenden Zellen verblieben nach Zentrifugation die nicht parenchymatischen Zellen und Blutzellen im Überstand und konnten verworfen werden. Das Pellet besteht vornehmlich aus den gesuchten primären Tupaia-Hepatozyten. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, wobei das letzte Zellpellet nach der letzten Zentrifugation in 5-10 ml (je nach Pelletgrösse) eiskaltem DMEM resuspendiert wurde. Im Anschluss nahm man eine Viabilitätsprüfung der gewonnenen Zellen mittels der Trypanblau-Probe vor. Dazu wurden etwa 10 µl der gewonnenen Zellsuspension mit der gleichen Menge Trypanblau (0,4 % Trypanblau, Sigma) auf einen Objektträger verbracht, gemischt und mit einem Deckgläschen versehen. Mittels Lichtmikroskopie konnte nun die Zellausbeute und der Anteil der lebend gewonnenen Zellen beurteilt werden. Zu wissen ist dabei, dass sich tote Zellen

blau anfärben, wohingegen vitale Hepatozyten farblos bleiben. Durchschnittlich fand man bei erfolgreichen Isolationsschritten eine Lebendzellausbeute von etwa 90 bis 95 Prozent. Durch Tropfversuche wurde anschliessend die bestmögliche Zellzahl pro Napf einer Zellkulturschale ermittelt. Hierzu wurden die Kavitäten einer Zellkulturschale zunächst mit Medium befüllt und anschliessend mit unterschiedlichen Tropfenmengen der Zellsuspension versetzt. Wiederum wurde lichtmikroskopisch die optimale Tropfenzahl für eine optimale Zelldichte von etwa 10^5 Zellen/Napf bestimmt. Für alle hier beschriebenen Versuche wurden die Kavitäten der Zellkulturplatten zunächst mit Kollagen beschichtet (Endkonzentration von 0,8 mg/ml). Die Zellkulturschalen wurden im Brutschrank bei 37 Grad Celsius und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert. Zum Kollagenisieren wurde Rattenschwanzkollagen vom Typ I (c= 3,41 mg/ml; BD Biosciences) verwendet.

3.2 Infektion primärer Tupaia-Hepatozyten mit gereinigten Hepatitis-B-Viren

3.2.1 Grundsätzliches zur Infektion mit und ohne Inhibition durch Antikörper

Die Infektion von primären Tupaia-Hepatozyten mit gereinigtem Hepatitis-B-Virus fand in Zellkulturschalen mit 12 Kavitäten statt. Zu Anfang der Versuche wurden die einzelnen Kavitäten mit Rattenschwanzkollagen vom Typ I kollagenisiert (siehe 3.1). Anschliessend wurden die Kavitäten der Zellkulturplatten mit sterilem PBS gewaschen und direkt danach mit 1 ml pro Kavität des Mediums HGM/+10 % FKS befüllt. Wie beschrieben wurde daraufhin nach Isolation der primären Tupaia-Hepatozyten jede Kavität mit etwa 10^5 Zellen/Napf betropft. Die Kulturschalen wurden vorsichtig geschwenkt, um einen möglichst gleichmässigen Zellkulturrasen zu erhalten. Die Hepatozyten wurden bei 37 Grad Celsius und 5 % Kohlenstoffdioxidatmosphäre im Brutschrank für etwa 4 h inkubiert. Nach Verstreichen dieser Zeitspanne war es dann möglich den Anheftungsgrad dieser Zellen lichtmikroskopisch zu überprüfen. Daraufhin wurde ein Mediumwechsel mit HGM ohne FKS durchgeführt und die Zellen für weitere drei Tage im Brutschrank inkubiert. Am dritten Tag nach Isolation fand dann die Infektion der Zellen statt. Dazu wurden jeweils $5 \cdot 10^8$ Genomäquivalente der Virusfraktion ID 307 Genotyp D pro Kavität eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten stets zwei Kavitäten, die nicht mit Virus infiziert wurden. Ausserdem wurde sowohl bei Infektionen ohne Inhibition, als auch

bei Inhibition der Infektion immer ein Doppelansatz der einzelnen Versuche mit einem definierten Gesamtvolumen von 300 μl pro Vertiefung angesetzt. Nach Infektion inkubierten die Infektionsansätze über Nacht (etwa 15 bis 18 h) im Brutschrank bei 37 Grad Celsius. Nach dieser Inkubationszeit konnten die Mediumüberstände (das Inokulum) abgenommen werden. Dieses Inokulum wurde danach sofort bei - 20 Grad Celsius eingefroren. Daraufhin wurden die Hepatozyten vorsichtig unter der Sterilisationsbank mit 1 ml DMEM (w/o Phenolrot) gewaschen, welche, um Virusrückstände zu entfernen, die spätere autonome Antigenproduktion der infizierten Hepatozyten überlagern könnten. Anschliessend wurden 600 μl frisches HGM in jede Vertiefung gegeben. Die Zellen wurden nun für weitere 12 bis 13 Tage im Brutschrank kultiviert. Jeden dritten bzw. vierten Tag fand ein Mediumwechsel statt, bei dem der Überstand bei - 20 Grad Celsius eingefroren und durch neues HGM ersetzt wurde. Man erhielt damit also die folgenden Überstände: Tag 0 (Inokulat, Ino), Tag 3 (T3), Tag 6 (T6), Tag 9 (T9) und Tag 12 (T12). Diese Überstände konnten nun mittels ELISA auf ihre HBsAg-Produktion untersucht werden, bzw. im Diagnostischen Labor des Instituts für Medizinische Virologie (JLU, Giessen) auf ihren Gehalt an HBeAg überprüft werden. Dabei wurde mit einem Mikropartikel Enzymimmunoassay (MEA) der Firma Abbot (AxSYM) gearbeitet. Diese Verfahren wurden alle prinzipiell sowohl für Infektion ohne, als auch Infektion mit Inhibition angewandt.

3.2.2 Inhibition der HBV-Infektion mit monoklonalen Antikörpern

Die Versuche zur Inhibition der HBV-Infektion wurden an drei Tage kultivierten primären Tupaia-Hepatocyten vorgenommen. Als Antikörper wurden die murinen monoklonalen Antikörper MA 18/07, C 20/2 und Q 19/10 benutzt. Diese sind gegen die unterschiedlichen HBV-Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs gerichtet. Die in diesen Versuchen verwendeten Antikörper wurden so mit HGM verdünnt, dass von den monoklonalen Antikörpern jeweils eine Menge von 5 μg /Kavität eingesetzt wurde. Dieses bezieht sich sowohl auf die Verwendung der reinen Antikörper, als auch auf die Mischung der einzelnen monoklonalen Antikörper, so dass die Antikörperlösungen pro Kavität stets auf die Menge von 5 μg geeicht wurden. Als gereinigtes Virus wurde die Virusfraktion ID 307 mit dem Genotyp D eingesetzt, wobei stets $5 \cdot 10^8$ Genomäquivalente pro Kavität verwendet wurden. Zu Beginn der Versuche wurden die entsprechenden Verdünnungen und Mischungen der

monoklonalen Antikörper und des Virus angesetzt. Jeweils 5 µg monoklonale Antikörper wurden mit $5 \cdot 10^8$ Genomäquivalenten HBV in einem Volumen von 50 µl HGM inkubiert. Die Inkubation der Hepatitis-B-Viren mit den Antikörpern fand für etwa 2 h bei 37 Grad Celsius statt. Anschliessend wurde das Volumen mit HGM auf 300 µl aufgefüllt und diese Lösung auf die primären Tupaia-Hepatozyten gegeben und für weitere 18 h bei 37 Grad Celsius inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände abgenommen und bei – 20 Grad Celsius eingefroren. Die Zellen wurden mit 600 µl DMEM (w/o Phenolrot) pro Kavität gewaschen und anschliessend wurde in jede Vertiefung 600 µl HGM pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen weitere 12 Tage kultiviert, die Überstände jeden dritten Tag abgenommen und eingefroren. Die gewonnenen Überstände konnten dann auf ihren Gehalt an HBsAg bzw. HBeAg untersucht werden (siehe 3.2.1).

3.2.3 Inhibition der Infektion mit aufgereinigten polyklonalen Antikörpern aus Seren

Unabhängig von der Art der Aufreinigung von Antikörpern aus den verschiedenen Seren wurde die Inhibition einer Infektion mit den gewonnenen Antikörperlösungen prinzipiell stets ähnlich durchgeführt. Zunächst sollen exemplarisch die Versuche mit den Serumproben dargestellt werden, die freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin Suhl GmbH zur Verfügung gestellt wurden (siehe 2.4.2).

Die in den verwendeten Seren vorhandenen Antikörper wurden mit Hilfe der Natriumsulfatausfällung aufgereinigt. Im diagnostischen Labor der Medizinischen Virologie der JLU-Giessen wurde die Aktivität an anti-HBs dieser Ausfällungen in mIU/ml bestimmt. Ferner wurde die Proteinkonzentration jeder Probe photometrisch ermittelt. In Abhängigkeit der vorliegenden Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurde eine bestimmte Menge an Protein definiert, die in jeder Kavität beim Infektionsversuch mit Inhibition vorliegen sollte. Damit befand sich in jedem Ansatz die gleiche Menge an Protein. Dieses ist insbesondere für die Vergleichbarkeit der Inhibitionserfolge der unterschiedlichen Ansätze unerlässlich. Um nun aber wirklich die einzelnen Versuchsansätze vergleichen zu können, wurden die Proben auf ihre Aktivität an anti-HBs hin geeicht. Das bedeutet, dass jeder Inhibitionsversuch mit der folgenden Titrationsreihe der Aktivität an anti-HBs im Doppelansatz durchgeführt wurde: 100 IU; 10 IU; 1 IU; 0,1 IU und 0 IU. Bei einem Versuch wurde zum Beispiel zunächst eine Proteinkonzentration von 45,2 µg pro well festgelegt. Es wurden die

entsprechenden Mengen an Antikörperausfällungen hinzugegeben, so dass man Aktivitäten von 100 IU; 10 IU; 1 IU; 0,1 IU und 0 IU erhielt. Um dann in jeder Kavität 45,2 µg Protein zu haben, wurden die entsprechenden Massendifferenzen mit der Ausfällung eines Negativserums ausgeglichen. Zu den entsprechenden Lösungen wurde gereinigtes Virus (Genotyp D) hinzugefügt, wobei stets $5 \cdot 10^8$ Genomäquivalente pro Kavität eingesetzt wurden. Diese Lösung wurde zunächst für 2 h bei 37 Grad Celsius inkubiert. Anschliessend wurde die Lösung mit HGM auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde auf drei Tage kultivierte primäre Tupaia-Hepatozyten gegeben. Diese Ansätze wurden bei 37 Grad Celsius für weitere 18 h inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellüberstände abgenommen und bei -20°C eingefroren. Auch diese Zellen wurden, wie schon beschrieben, mit 600 µl DMEM (w/o Phenolrot) pro Kavität gewaschen und anschliessend wurde in jede Vertiefung 600 µl HGM pipettiert. Die Zellen wurden für weitere 14 Tage kultiviert. Jeden dritten bzw. vierten Tag fand ein Mediumwechsel statt, bei dem die Überstände abgenommen und durch neues HGM ersetzt wurden. Die gewonnenen Überstände wurden gesammelt und auf ihren Gehalt an HBsAg bzw. HBeAg untersucht.

Prinzipiell wurde die gleiche Versuchsdurchführung bei allen Seren durchgeführt, die anti-S enthielten, da sie dadurch auf anti-S geeicht werden konnten. Dieses betrifft, wie schon erwähnt, alle Seren aus Suhl. Ebenso gilt es für die freundlicherweise von Herrn Timo Kürschner zur Verfügung gestellten Seren, wie auch für das Giessener Schafserum (siehe 2.4.2). Auch die von Jennifer Waters gelieferten Proben wurden auf diese Weise geeicht (siehe 2.4.3).

3.3 Herstellung von Fab-Fragmenten

Die durchgeführten Versuche der Inhibition der Infektion wurden mit Fab-Fragmenten der murinen monoklonalen Antikörper C 20/2 und MA 18/07 durchgeführt. Die für die Fragmentherstellung benötigten Substanzen werden größtenteils in einem gebrauchsfertigen Kit der Firma Pierce geliefert (siehe 2.4.5).

Die Isolierung der Fab-Fragmente läuft wie folgt ab: Zunächst wurden 0,5 ml IgG-Lösung mit 0,5 ml „IgG1 mild elution buffer“ versetzt. Eine grobe Trennung der Antikörperfragmente erfolgt mittels Mikrofilter, der Moleküle mit einer Grösse von ca. 50 kDa passieren lässt. Hierbei werden die IgG-Fragmente von noch ungespaltenen Fc-Fragmenten getrennt, indem mit „mild elution buffer“ gewaschen wird. Die aus

dem Mikrofilter aufgefangene Lösung enthält dann hauptsächlich IgG-Fragmente. Anhand der Messung der optischen Dichte bei 280 nm kann anschliessend die Konzentration an IgG in der für die enzymatische Verdauung vorbereiteten Probe bestimmt werden.

Zur Herstellung des „Verdauungspuffers“ wird 40 mg Cystein mit 2 ml „IgG1 digestion buffer (10x)“ vermengt. Den „Working digestion buffer“ erhält man, indem man zu 1,5 ml des hergestellten „Stock-digestion buffer“ 15 ml „IgG1 mild elution buffer“ hinzugibt.

Dann wird eine 2 ml Säule mit immobilisiertem Ficin mit 15 ml des „working digestion buffer“ equilibriert. 100 µl des „Stock digestion buffer“ werden mit 1 ml der oben hergestellten IgG-Lösung versetzt. Diese Lösung wird in die Ficinsäule gelassen und bei 37 Grad Celsius für 5 h inkubiert.

Danach erfolgt die Elution der „verdauten“ Fragmente von der immobilisierten Ficinsäule. 4 ml „Binding buffer“ werden benötigt, um die Verdauungsstücke zu eluieren. Diese Lösung wird aufgefangen und die Ficinsäule noch mehrmals gewaschen, so dass sie wieder verwendet werden kann. Anschliessend beginnt man mit der Abtrennung der Fab-Fragmente von den kompletten IgG-Molekülen und den Fc-Fragmenten. Dazu werden eine Protein A-Säule und der „binding buffer“ auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Protein A- Säule wird ein „storage buffer“ mit 0,02 %igem Natriumazid gegeben. Die Protein A-Säule wird mit 12 ml „binding buffer“ equilibriert und anschliessend werden die 4 ml der „Verdauungslösung“ hinzugegeben und 1 ml Fraktionen gesammelt. Diese Fraktionen enthalten Fab- und $F(ab')_2$ - Fragmente. Mit Zitronensäure kann eine Regeneration der Protein A-Säule erreicht werden, indem man die Säule mit 8 ml 0,1 M Zitronensäurelösung wäscht. Die gewonnenen Fragmente können in ihrer Konzentration mittels Photometrie bestimmt werden und mit Hilfe von Gelelektrophorese genauer beurteilt werden.

3.4 Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten

Die Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten kann nicht auf den anti-S-Titer geeicht werden. Deshalb wird hier wiederum die Masse an Protein definiert. Dabei wurde in den Versuchen von einer maximalen Proteinmenge von 2 µg pro Kavität an Fab-Fragmenten ausgegangen. Die Titrationsreihe besteht dann aus 1 : 10 Verdünnungen. Der Versuch wurde wiederum mit Viren des Genotyp D mit der

bekannten Viruslast von $5 \cdot 10^8$ Genomäquivalenten pro well durchgeführt. Die Zellüberstände wurden regelmässig (siehe 3.2) abgenommen und schließlich auf die Produktion von HBsAg und HBeAg hin untersucht.

3.5 ELISA zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen von HBsAg und HBeAg

Wie bereits erwähnt, wurde der Zellüberstand der Inhibitionsexperimente der einzelnen Infektionen mittels ELISA auf den Gehalt an HBsAg-Produktion untersucht. Der ELISA ist ein sehr sensitives und spezifisches Verfahren, um in Lösung befindliche Proteine nachzuweisen (< 1 ng). Der hier verwendete „Sandwich-ELISA“ fußt auf dem Prinzip, das zu detektierende Protein spezifisch an einen immobilisierten ersten Antikörper binden zu lassen. An das gebundene Protein (in unserem Fall HBsAg) bindet dann spezifisch ein zweiter Antikörper, mit dem ein Enzym konjugiert ist. Dieses Enzym vermag ein zugegebenes chromogenes Substrat zu einem farbigen Endprodukt umsetzen. Dabei ist die Farbreaktion umso ausgeprägter, je mehr Protein an Antikörper gebunden wurde. Insgesamt ist also die Stärke des Farbumschlags ein Maß für die Produktion von HBsAg durch die infizierten primären Tupaia-Hepatozyten. In unserem Fall handelte es sich bei dem ersten Antikörper um den murinen monoklonalen Antikörper C 20/2. An den zweiten anti-HBs- Antikörper ist eine Peroxidase (POD) gekoppelt, die das zugegebene Substrat (OPD) zu einem gelblich-braunen Farbumschlag umsetzt. Das folgende Schema verdeutlicht das Funktionsprinzip eines „Sandwich-ELISA“.

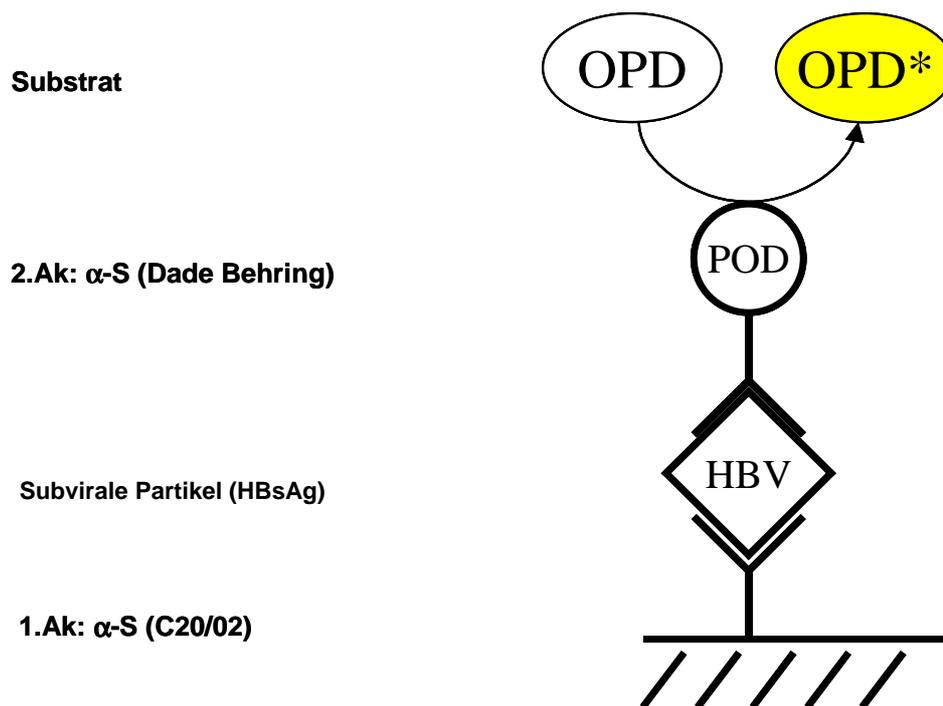


Abb.2: Die Abbildung demonstriert das Funktionsprinzip eines „Sandwich-ELISA“. An der Materialoberfläche ist der erste Antikörper gebunden (C 20/2). An diesen Antikörper bindet spezifisch das gesuchte Protein (HBsAg). An dieses Protein bindet dann der zweite Antikörper, an dem ein spezifisches Enzym (POD) gebunden ist. Dieses Enzym bewirkt einen Farbumschlag des Substrats (OPD). Die Intensität des Farbumschlags ist proportional zur gesuchten Proteinkonzentration. Die Abbildung stammt aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU-Giessen.

Die Zellüberstände enthalten je nach Infektionserfolg unterschiedliche Mengen an HBsAg. Um die Produktion von HBsAg zu quantifizieren wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Maxisorb, Nunc, Wiesbaden) mit dem murinen Antikörper C20/2 beschichtet. Dieser Antikörper lag in einer Stammlösung (1 mg/ml) vor, wurde dann 1:500 in 17,5 mM Beschichtungspuffer (NaPP, pH 7,4) verdünnt und folgend zu je 50 μ l in jede Vertiefung pipettiert. Anschliessend wurde die Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie abgedeckt, um eine Verdunstung des relativ kleinen Volumens zu verhindern. Die Inkubationsdauer für den ersten Antikörper betrug bei 37 Grad Celsius 2 h oder bei 4 Grad Celsius über Nacht. Nach der ersten Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte im „ELISA-Washer“ (Columbus, Tecon) zweimal mit PBS/ 0,1 % Tween 20 und zweimal mit PBS gewaschen. Um ein unspezifisches Bindungsverhalten zu verhindern, wurde in jede Kavität danach 200 μ l TNE/10 %

FKS pipettiert und die Mikrotiterplatte für weitere 2 h auf einem Rüttler bei 37 Grad Celsius inkubiert. Darauf wurde die Platte wiederum im „ELISA-Washer“ zweimal mit PBS/0,1% Tween 20 und zweimal mit PBS gewaschen. Folgend wurden jeweils 50 µl der an den unterschiedlichen Tagen abgenommenen Zellüberstandsproben in jede Vertiefung pipettiert. Um anschließend das HBsAg quantitativ bestimmen zu können, wurde pro Mikrotiterplatte jeweils eine Standardreihe mit gereinigtem HBsAg erstellt. Eine Ausgangskonzentration wurde in sieben Schritten immer 1:2 verdünnt. Von diesen angesetzten Verdünnungen wurden ebenfalls jeweils 50 µl pro Vertiefung pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 Grad Celsius auf dem Rüttler. Im Anschluß fand ein erneutes Waschen zweimal mit PBS/Tween 20 und zweimal mit PBS statt. Danach wurden pro Vertiefung 50 µl des zweiten Antikörpers (anti-HBsAg-Peroxidase-Konjugat; c= 1 mg/ml) hinzugefügt, der zuvor in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/0,1 % Casein hergestellt worden war. Erneut inkubierte die Mikrotiterplatte für 1 h unter Schütteln bei 37 Grad Celsius. Folgend wurde die Platte wieder zweimal mit PBS/0,1% Tween 20, zweimal mit PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde das Substrat vorbereitet. Dazu wurden zwei OPD-Tabletten (o-Phenylendiamin, Dako) in 6 ml Bidest und 2,5 µl Wasserstoffperoxid (30 %, Sigma) aufgelöst. Von diesem Substrat wurde jeweils 50 µl pro well in die Mikrotiterplatte pipettiert und lichtgeschützt etwa 15 Minuten bei 37 Grad Celsius auf dem Rüttler inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin mit 50 µl einer 0,5 M Schwefelsäure (1 N) gestoppt. Im Photometer (LP 400, Diagnostic, Pasteur) konnte dann die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm mit einer Referenzwellenlänge von 692 nm gemessen werden.

Die Bestimmung des HBeAg erfolgte im Diagnostischen Labor des Instituts für Medizinische Virologie der JLU-Giessen. Als Verfahren wurde mit einem Mikropartikel Enzymimmunoassay (MEA) der Firma Abbot (Axsym) gearbeitet. Ein Dank für diese Möglichkeit geht an Herrn Dr. Willems.

3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Proteinauftrennung

Die SDS-PAGE trennt bestimmte Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts auf. Laemmli beschrieb 1970, dass die Proteine durch Inkubation bei hohen Temperaturen mit SDS (anionisches Detergenz) und DTT (Disulfidbrücken-reduzierendes Mittel) vollständig denaturiert und dissoziiert werden. Das SDS bindet

an die Proteine und gibt ihnen damit eine starke negative Ladung. Folglich können die Proteine nach Auftragen auf ein SDS-Gel mit Hilfe einer elektrischen Spannung aufgetrennt werden, indem sie aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode wandern. Durch Verwendung bekannter Proteinmarker und den Vergleich der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine, können Informationen über die Molekülgröße bzw. das Molekulargewicht gewonnen werden. Um Proteinmengen quantifizieren zu können, sollte ein Proteinstandard des zu detektierenden Proteins in unterschiedlichen Mengen mit auf das Gel aufgetragen werden.

Zunächst wurde zu Beginn jeden Versuchs eine Verdünnungsreihe eines Proteinstandards hergestellt (gereinigtes HBsAg). Zusätzlich kam eine definierte Menge an 4 x Probenpuffer und 10 % DTT hinzu, so dass man ein vorher definiertes Gesamtvolumen erhielt. Das fehlende Volumen wurde durch dH₂O ersetzt. Nach dem Zusammenpipettieren der einzelnen Ansätze wurden diese im Wärmeblock 10 Minuten bei 70 Grad Celsius erhitzt. Zwischenzeitlich konnte die Gelkammer (Xcell *SureLock* Minicell, Invitrogen) zusammengebaut und das Gel (Novex-12% Tris/Bis, 17well, 1mm, Invitrogen) eingesetzt werden. Darauf wurde die Laufkammer mit dem Laufpuffer 1xMOPS befüllt. In die innere Kammer des Systems wurden zusätzlich 500 µl Antioxidans (Invitrogen) pipettiert. Der Proteinmarker (SeeBlue Plus2, Invitrogen) wurde folgend in eine Tasche des Gels eingefüllt. Je nach Geldicke wurden 3 µl bei 1mm dicke Gelen verwendet, bei 1,5 mm dicken Gelen benutzte man 5 µl Marker. Nach der Beladung des Gels mit den vorbereiteten Proben wurde eine Spannung von 200 V angelegt, bei einer Stromstärke von ungefähr 100 bis 115 mA. Die Laufzeit ergab sich aus der ausreichenden Auftrennung des Proteinmarkers, was meistens eine Zeitspanne von etwa 45 bis 60 Minuten benötigte.

3.7 Proteindetektion mittels Western Blot und immunologischer Färbung

Nachdem die Proteine bei der Gelelektrophorese in der SDS-PAGE (siehe 3.6) aufgetrennt wurden, sollten sie im folgenden immunologisch detektiert werden. Zunächst werden die Proteine auf eine stationäre Phase (PVDF-Membran) transferiert. Auch hier wird eine Spannung angelegt, so dass die negativ geladenen Proteine dem Strom folgen und aus dem Gel auf die Membran transferiert werden. Dort werden die Proteine gebunden. Nun kann mit Hilfe spezifischer Antikörper das gesuchte Protein

detektiert werden. Ein erster Antikörper bindet direkt am Zielprotein, ein zweiter, enzymkonjugierter Antikörper bindet spezifisch an den ersten. Daraufhin wird ein passendes Substrat hinzugegeben, welches von dem Enzym umgesetzt wird, so dass das daran gebundene Protein nachgewiesen werden kann.

3.7.1 Funktionsprinzip des Western Blot

Zunächst wurde die Blotmembran (Millipore, Eschborn) in eine Wanne gelegt und etwa 5 Minuten in Methanol auf einem Schüttler inkubiert. Anschliessend wurde das Methanol entfernt und die Membran wurde 5 Minuten in 1x Transferpuffer inkubiert. Folgend wurde die Blotkammer (Xcell II Blot Module, Invitrogen) luftblasenfrei zusammengebaut. Die folgende Skizze verdeutlicht den Aufbau der genannten Blotkammer.

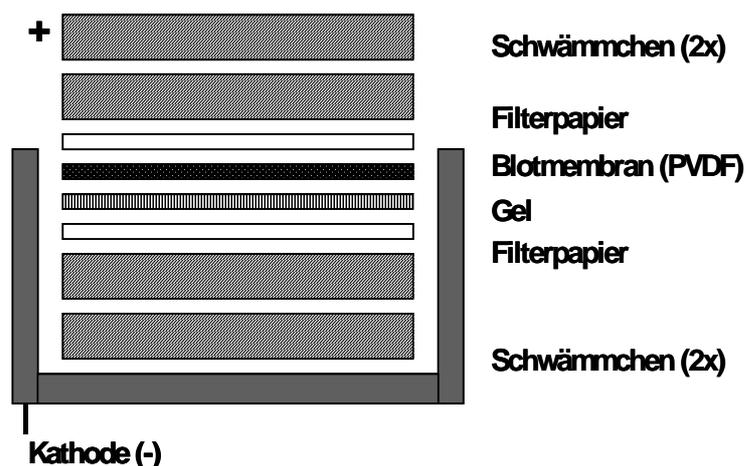


Abb.2 : Blotkammeraufbau mit den einzelnen geschichteten Komponenten. Die Abbildung stammt aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

Die innere Kammer der Apparatur wurde mit Transferpuffer befüllt, die äussere Kammer mit Bidest. Die Spannungsquelle wurde bei einer Stromstärke von 250 mA angeschlossen, die Spannung lag dabei etwas unter 25 V. Abhängig von der Dicke des Gels dauerte der Blotvorgang etwa 1 bis 1,5 h. Im Anschluss daran wurde die Blotmembran in den entsprechenden Blockpuffer gelegt.

3.7.2 Immunologische Anfärbung der transferierten Proteine mit Western

Breeze®

Die Membran wurde in eine vorgefertigte Blocklösung (Roti-Block®, Roth + 1 % BSA) gelegt und über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal für je 5 Minuten in Bidest gewaschen und dann mit dem ersten Antikörper inkubiert. Man verwendete als ersten Antikörper MA 18/07 (c= 1 mg/ml), der zuvor 1:2000 mit TNE/0,1 % FKS verdünnt worden war. Mit Hilfe eines Folienschweissers wurden die Membranen bei diesen Schritten in Folie eingeschweisst, so dass auch mit geringen Volumina effizient experimentiert werden konnte. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte für 1 h bei 37 Grad Celsius auf einem Schüttler. Im folgenden wurde die Membran jeweils für 5 Minuten fünfmal gewaschen, zunächst in PBS, dann dreimal in PBS/0,5 % Tween 20 und ein letztesmal wieder in PBS. Im Anschluss fand die Inkubation mit dem zweiten Antikörper statt (2nd Antibody-Solution, Alkalische Phosphatase konjugiert), die wieder für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius durchgeführt wurde. Erneut wurden die oben beschriebenen fünf Waschschrirte durchgeführt. Danach wurde die Membran jeweils für etwa 2 Minuten dreimal in Bidest gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Blotmembran mit 2,5 ml Chemolumineszenzreagenz für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschliessend in eine neue Folie eingeschweisst. In einer Dunkelkammer erfolgte die Entwicklung des Blots. Der Blotstreifen wurde in einer Autoradiographie-Kassette mit Tesafilm fixiert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionsdauer betrug je nach Versuch zwischen 2 Sekunden und 5 Minuten. Der Film wurde mittels des automatischen Filmentwicklers Curix 60 AGFA (Mortsel, Belgien) entwickelt.

3.8 Silberfärbung

Zur Silberfärbung wird das Gel zunächst über Nacht in eine 1:1 Mischung von Methanol und Bidest gelegt. Danach wird das Gel etwa 15 Minuten unter ständigem Austausch von Bidest gewaschen. Im Anschluss daran wird das vorbehandelte Gel ungefähr 20 Minuten in einer Silbernitratlösung geschwenkt. Hierauf folgend wird das Gel erneut für 10 Minuten gründlich in Bidest gewaschen, um dann sogleich in die Reducerlösung überführt zu werden, wo man es etwa 20 Minuten belässt, bis die gewünschte Bandenstärke erreicht ist. Man kann das Gel daraufhin noch in eine Fixierungslösung (siehe 2.9) legen, so dass das Gel eingescannt oder abfotografiert werden kann.

3.9 Coomassie Färbung von Gelen

Die Gele werden nach Beendigung der Elektrophorese sofort in saubere Schalen überführt und wenigstens eine Stunde in der Fixierungslösung unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Folgend wird der Fixierer durch die Färbelösung ersetzt und unter ständigem Schütteln für mindestens zwei weitere Stunden inkubiert. Dann erfolgt der Transfer der Gele in den Entfärber. Dabei kann das Gel über Nacht unter ständiger Bewegung im Entfärber belassen werden. Dadurch wird der Hintergrund klar und die Proteinflecken sind besser zu erkennen. Die Gele können eingescannt oder auch eingeschweisst werden.

3.10 IgG-Isolierung durch Natriumsulfatfällung

450 µl Humanserum wurden mit 450 µl 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gemischt. Nun wurden zu dieser Lösung 900 µl einer bei Raumtemperatur gesättigten Natriumsulfatlösung (36 Gew. %) langsam hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Indem diese Salzlösung zum Serumgemisch gegeben wird kommt es zu einer Verringerung der Dipolwechselwirkungen zwischen den Oberflächenaminosäuren und dem Lösungsmittel und damit zu einer Verringerung der Proteinlöslichkeit. Vor allem ist eine gute Durchmischung der Lösung während der Natriumsulfatzugabe zu beachten, damit lokal hohe Konzentrationen vermieden werden und ein Ausfallen von Albumin verhindert werden kann. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Probe bei 1500 U/min. 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Rückstand in 900 µl 0,1 M Phosphatpuffer mit pH 7,4 gelöst, die Fällung wiederholt und das Pellet nach Abzentrifugation des Überstands in 250 µl 0,1 M Phosphatpuffer gelöst. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm im Photometer bestimmt.

3.11 Aufreinigung mit DEAE-Sephacel-Ionenaustauscher

Der DEAE-Sephacel-Ionenaustauscher wird vorgequollen in 24 % Ethanol geliefert. 30 ml der homogenen Suspension wurden 30 Sekunden bei 1500 U/min. zentrifugiert und anschliessend konnte der Überstand abgesaugt werden. Der verbleibende Rückstand wurde in 30 ml eines 0,05 M Tris-HCl-Puffers bei pH 8,0 resuspendiert und der Vorgang wurde erneut wiederholt. Nach erneuter Resuspension wurde die Flüssigkeit mittels eines Büchner-Trichters und einem Filterpapier (Schleicher & Schuell Rundfilter 589 Schwarzband) unter Verwendung von einem Liter des

genannten Puffers gewaschen. Der Rückstand wurde in etwa 12 ml des Puffers resuspendiert. Dann wurde eine 1:1 Mischung von Serum und präpariertem Sephacelionenaustauscher vorgenommen. Nach gutem Durchmischen und einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei RT wurde die Mischung bei 1500 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und konnte auf die entsprechenden Antikörperfraktionen hin untersucht werden.

3.12 Antikörperaufreinigung mittels Dynabeads® Protein G

Die beschriebene Aufreinigung bezieht sich auf eine Probenmenge von etwa 100 µl Serum. Zunächst werden die Dynabeads Protein G für 1 bis 2 Minuten gevortext. Es werden 100 µl der Dynabeadsuspension in ein sauberes und silikonisiertes Eppendorfröhrchen überführt. Dann wird das Gefäß für eine Minute auf den Magnetblock gestellt und der erhaltene Überstand wird abpipettiert. Es werden 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit einem pH Wert von 5,0 hinzugefügt. Dieser Waschvorgang wird nochmals wiederholt. Anschliessend wird die Serumprobe zu den gewaschenen Dynabeads hinzugefügt und für 40 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird das Eppendorfgefäß für weitere 2 Minuten auf den Magneten gestellt und der Überstand wird abpipettiert. Zu den Dynabeads wird nun 500 µl des 0,1 M Natriumphosphatpuffers pH 5,0 hinzugegeben. Um eine Immunpräzipitation zu vermeiden wurde dem Puffer 0,01 % Tween 20 beigesetzt. Dieser Waschschrift wird im folgenden noch zweimal wiederholt. Zur Elution der gebundenen Antikörper werden 30 µl 0,1 M Zitronensäure (pH 2-3) zu den Dynabeads hinzugegeben. Diese Lösung wird für 2 Minuten gut gemischt. Nachdem das Eppendorfgefäß wieder auf den Magneten gesetzt wurde, konnte der Überstand mit den gereinigten IgG's abgenommen werden. Die gleichen Schritte werden nochmals durchgeführt, so dass man letztendlich ein Volumen von 60 µl mit gereinigter Antikörperlösung enthält.

4. Ergebnisse

Mit dem Tupaia Hepatozyten Infektionsmodell für die Infektion mit dem Hepatitis B Virus sollen mehrere Fragestellungen beantwortet werden. Zum einen soll eine Beurteilung der Inhibitionspezifizität für eine Infektion mit HBV ganz unterschiedlicher Antikörper und Antikörperklassen vorgenommen werden. Zum anderen soll insbesondere die Bedeutung des PräS1-Oberflächenantigens und dagegen gerichteter Antikörper für den Inhibitionserfolg einer Infektion untersucht werden. Aufgrund des Vorliegens eines unbekannteren Inhibitionsfaktors für die Infektion mit HBV in humanen Seren (Köck et al., 2001), sollte möglichst mit reinen Antikörperlösungen gearbeitet werden. Deshalb wurden zunächst unterschiedliche Aufreinigungsverfahren für Immunglobuline untersucht.

4.1 Aufreinigungsverfahren von Immunglobulinen aus Seren

Man kann unterschiedliche Reinigungsverfahren zur isolierten Gewinnung von Immunglobulinen aus Seren verwenden. Dabei versucht man als optimale Lösung einerseits die Immunglobuline in möglichst hoher Konzentration und maximaler Reinheit zu gewinnen, andererseits die restlichen Serumproteine so gut als möglich zu eliminieren. Es gilt also das für die jeweilige Fragestellung richtige Verfahren auszuwählen, welches die konträren Zielsetzungen bestmöglich vereint.

4.1.1 Vergleich unterschiedlicher Aufreinigungsverfahren

Um die Qualität einzelner Aufreinigungsverfahren zu beurteilen, wurden unterschiedliche Methoden miteinander verglichen. Dazu wurden Seren (1) mit der Natriumsulfatmethode gefällt, (2) mit Sephacel aufgereinigt und (3) mit Hilfe von Dynabeads aufgearbeitet. Bei den Dynabeads handelt es sich um mit Protein G beschichtete Kugeln mit einem Durchmesser von 2,8 µm. Protein G ist ein Zellwandbestandteil, der von Streptokokken der Gruppe G produziert wird. Protein G besitzt eine hohe Spezifizität für Immunglobuline und bindet die meisten Immunglobuline von Säugetieren durch Interaktion mit dem Fc-Fragment von Antikörpern. Das Protein G, welches im folgenden verwandt wird, ist ein etwa 30 kDa schweres Molekül, das an den Dynabeads gekoppelt vorliegt und dessen Albuminbindungsstelle rekombinant entfernt wurde. Somit bleiben lediglich die IgG-Bindungsstellen übrig. Die aus dem Serum gewonnenen Proben wurden auf ein SDS-

Gel aufgetragen, die Gele anschließend mit Coomassie oder nach der Silbermethode eingefärbt.

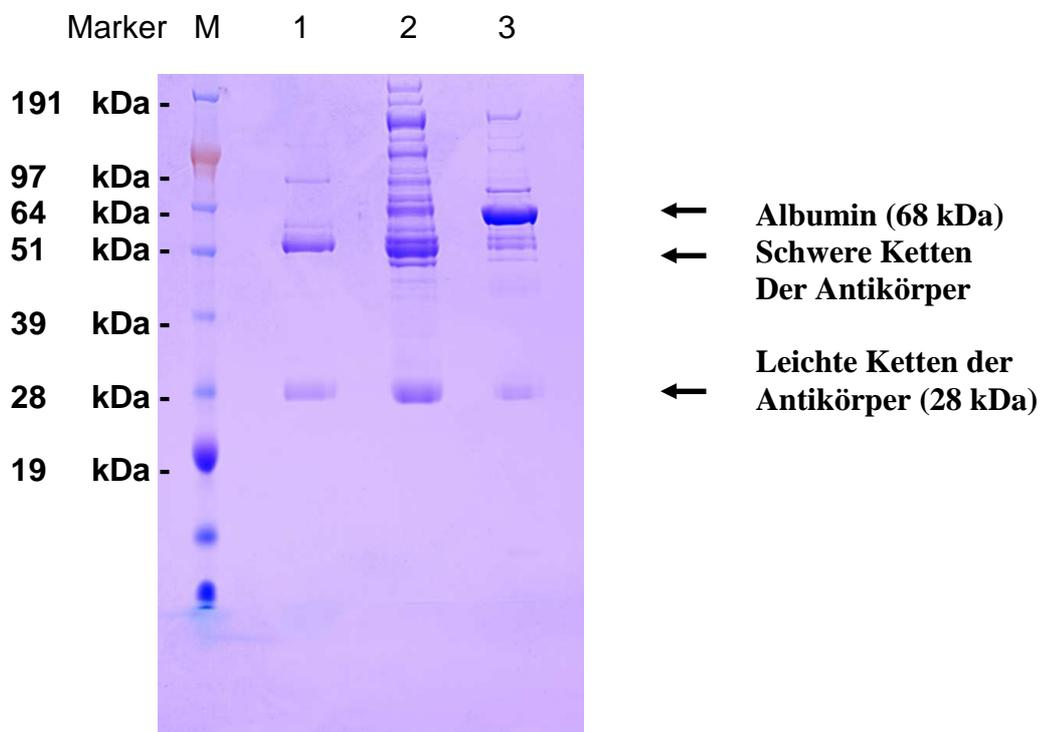


Abb.1: Coomassie-Gel mit den durch verschiedene Immunglobulinaufreinigerungsverfahren gewonnenen Proben. Bei 28 kDa sind die jeweiligen gewonnenen leichten Ketten der Antikörperfraktionen zu sehen. Man beachte die unterschiedliche Stärke der Banden in den einzelnen Spuren. Es wurden stets 5 µg Gesamtprotein pro Spur eingesetzt. Bei ungefähr 68 kDa erkennt man die Bande des Serumalbumin in den unterschiedlichen Spuren. 1 Aufreinigung mit Dynabeads; 2 Natriumsulfatausfällung; 3 Aufreinigung mit Sephacel; M Proteingrößenmarker Seebule

Man sieht auf den Gelen, dass bei allen Aufreinigerungsverfahren die Antikörperfraktionen in Höhe der 28-kDa-Bande erhalten bleiben. Vor allem erkennt man die Reduktion störender Proteine durch die Aufreinigung mit Protein G.

Wie beschrieben, ist die Aufreinigung mittels Protein G sehr spezifisch. Eigentlich sollten also nur die entsprechenden Antikörper nach dieser Aufreinigerungsmethode nachgewiesen werden können. Durch den hohen Gehalt an Serumalbumin ist jedoch eine vollkommene Elimination von anderen Serumproteinen nicht möglich. Dennoch

lassen sich also durch dieses spezifische Verfahren die Antikörper in der höchsten Reinheit gewinnen. Allerdings erkennt man im Vergleich mit den übrigen Methoden, dass auch diese die störenden Proteinfractionen eliminieren. Insbesondere fällt in der Natriumsulfatausfällung die Reduktion der Albuminfraktion auf.

Darüber hinaus bietet die Natriumsulfatausfällung also bei guter Ausbeute für die Gewinnung von Serumantikörpern den Vorteil der einfachen Aufreinigung einer größeren Probenmenge. Deshalb wird bei den folgenden Versuchen auf diese Methode zurückgegriffen.

4.1.2 Natriumsulfatfällung vorliegender Seren

Wie oben gezeigt (4.1.1) ist die Ausfällung mit Natriumsulfat zur Aufreinigung der Antikörperfraktionen von Seren geeignet. Deshalb wurden die zur Untersuchung vorliegenden Seren zunächst mit dieser Methode ausgefällt. Bei den 16 Seren handelt es sich um Hyperimmunseren, die einen hohen Anteil an anti-HBs Antikörpern besitzen und die freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin in Suhl zur Verfügung gestellt wurden.

Von jeder Serumausfällung wurde photometrisch die IgG-Konzentration bestimmt. Um den Erfolg der Aufreinigung zu belegen, wurde ein SDS-Gel mit den hergestellten Proben beschickt und mit Coomassie angefärbt. Jede Ausfällung enthält die zu erwartenden Antikörper. Man findet bei 28 kDa bei jeder Probe eine ausgeprägte Bande. Hierbei handelt es sich um die leichten Ketten der Immunglobuline. Bei ungefähr 51 kDa findet man die schwere Kette. Es handelt sich bei der Natriumsulfatausfällung um eine rein chemische Aufreinigung von Seren. Deshalb erhält man eine Reihe unspezifischer Banden, die unterschiedlichen Serumproteinen entsprechen.

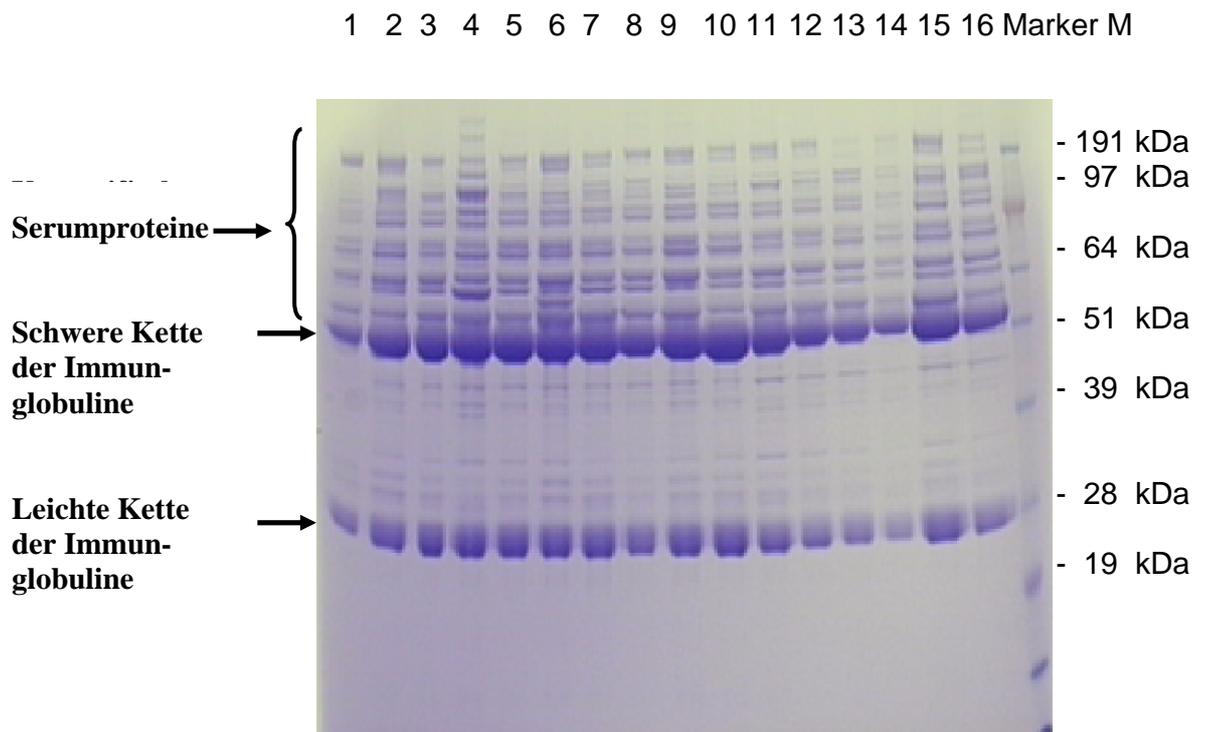


Abb.2: Die Abbildung zeigt die Auftrennung der mit Hilfe der Natriumsulfatausfällung Gewonnenen Proben einiger Hyperimmunseren aus Suhl mit Hilfe eines Coomassie-Gels. Es wurden jeweils 10 µg der entsprechenden Serumausfällung eingesetzt. Man findet bei 28 kDa bei jeder Probe eine ausgeprägte Bande. Hierbei handelt es sich um die leichten Ketten der Immunglobuline. Bei ungefähr 51 kDa findet man die schwere Kette

4.2 Nachweis monoklonaler Antikörper mittels

Western-Blot

Um den Gehalt an Antikörpern gegen HBsAg bestimmen zu können, wurde ein Nachweisverfahren auf der Basis eines Western-Blot entwickelt. Es wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot die vorliegende Membran mit Hepatitis B-Virus Oberflächenprotein beschichtet. Je nach nachzuweisendem Antikörper wird ein zweiter gegen dieses Protein gerichteter markierter Antikörper ausgewählt, der in einer photochemischen Reaktion sichtbar gemacht wird. Kann man also im letzten Schritt eine Reaktion nachweisen, so ist damit das Vorliegen des gesuchten Antikörpers bewiesen. Dabei kann man den Nachweis monoklonaler von

polyklonalen Antikörpern unterscheiden. Monoklonale Antikörper liessen sich in den durchgeführten Experimenten gut nachweisen. Es stellte sich die Frage, ob derartige Nachweise auch im Hinblick auf polyklonale Antiseren möglich wären. Vor allem war im Hinblick auf die folgenden Versuche interessant, ob die vorliegenden Proben anti-präS1 Antikörper enthielten. Um die Nachweismethode zu entwickeln wurde monoklonaler muriner Antikörper verwandt (MA18/07), der gegen die präS1-Domäne des HBs-Antigen gerichtet ist. Um gleichzeitig etwas über die Sensitivität der Nachweismethode sagen zu können, wurde das HBsAg in absteigenden Konzentrationen auf die Membran aufgetragen.

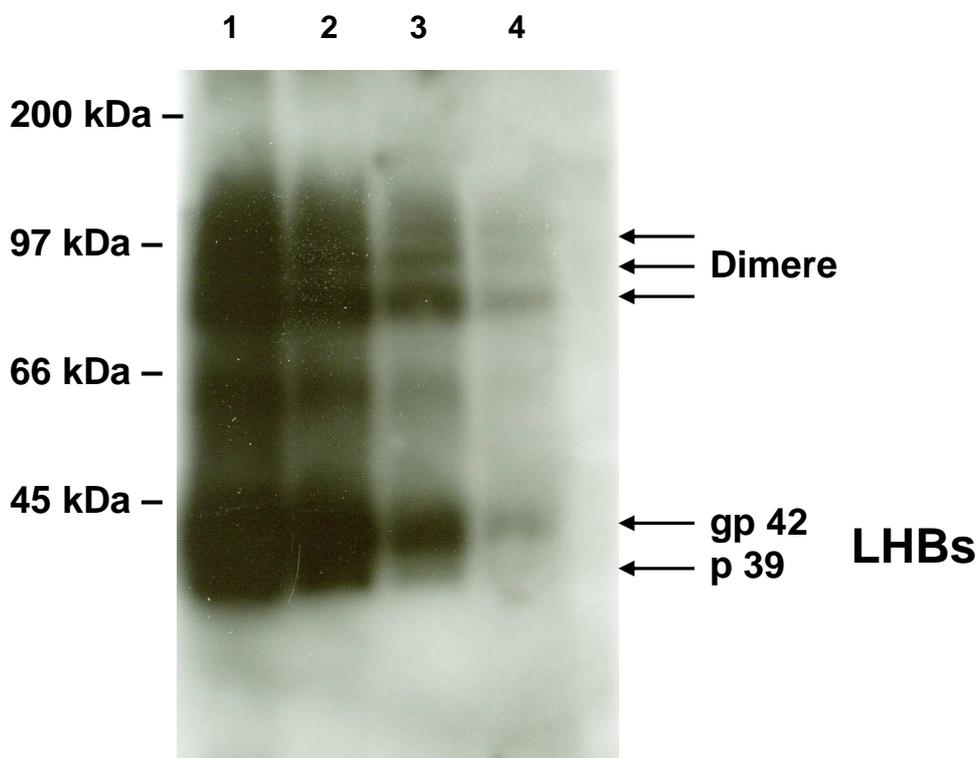


Abb.3: Blotmembran, beschichtet mit absteigenden Konzentrationen von hochreinem HBsAg zum Nachweis von präS1-Antikörpern. Das Antigen wurde mittels Succrose-Dichte-Gradientenzentrifugation aus Patientenserum gewonnen. Der erste Antikörper ist monoklonal, murinen Ursprungs und gegen die präS1-Domäne gerichtet (MA18/07). Als zweiter Antikörper wurde ein anti-Maus-Peroxidaseantikörper verwendet. Die Detektion fand mit Hilfe von Chemolumineszenz statt. Die Spur 1 enthält 100 ng, Spur 2 enthält 50 ng, Spur 3 enthält 25 ng und Spur 4 enthält 12,5 ng HBsAg (Genotyp D).

Man erkennt auf dem Blot, dass bei allen Konzentrationen der aufgetragenen Sphaeren, die nur ca. 10 % präS1 enthalten, dennoch der Nachweis des LHBs gelingt. Damit kann die Sensitivität des Nachweisverfahrens als relativ hoch eingeschätzt werden, da noch Mengen von HBs-Antigen im unteren Nanogrammbereich sehr gut

nachgewiesen werden können. Um die Sensitivität noch besser beurteilen zu können, ist es sinnvoll eine noch genauere Titration des Antigens vorzunehmen.

Dabei wurde in einem weiteren Schritt ein 12 % SDS-PAGE Gel gefahren, welches daraufhin geblottet wurde. Dieses Gel wurde nicht mit dem gesamten HBs-Antigen beschichtet, sondern mit rekombinant hergestelltem, myristoyliertem präS1-Peptid.

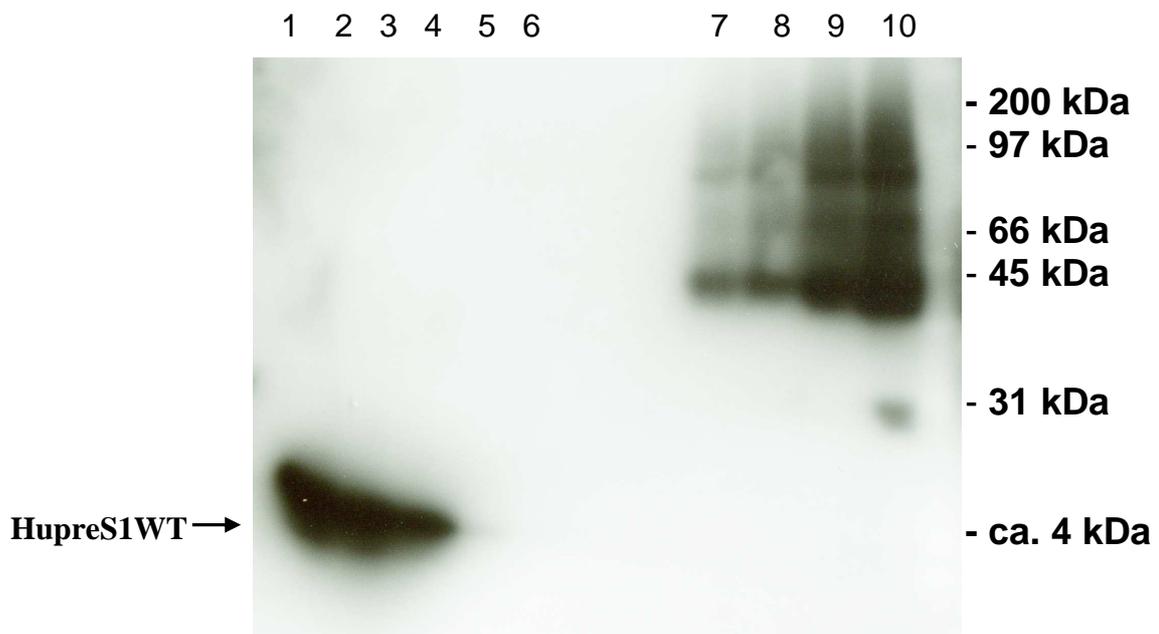


Abb. 4: Die Blotmembran ist auf der linken Seite allein mit dem synthetisch hergestellten präS1-Peptid (HupreS1WT) beschichtet. Auf der rechten Seite sind gereinigte subvirale Partikel aus Seren aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz. Die Belichtungszeit der Films betrug 2 Sekunden. Das präS1-Peptid lässt sich bei einem Molekulargewicht von etwa 4 kDa nachweisen. Erläuterungen zu den einzelnen Spuren:

1	20 ng HupreS1WT	2	10 ng HupreS1WT
3	1 ng HupreS1WT	4	0,1 ng HupreS1WT
5	0,01 ng HupreS1WT	6	0,001 ng HupreS1WT
7	12,5 ng HBsAg	8	25 ng HBsAg
9	50 ng HBsAg	10	100 ng HBsAg

Man sieht auf dem Blot leicht, dass der Nachweis bis 0,1 ng HupreS1WT sehr gut zu führen ist. Auch die Reaktion mit dem kompletten Antigen zeigt, dass der Nachweis monoklonaler Antikörper, die gegen die präS1-Domäne gerichtet sind, sehr

effektiv funktioniert. Um zu überprüfen ob man auch die noch geringeren Konzentrationen von HupreS1WT nachweisen kann, wurde die Belichtungszeit bei der Auswertung von 2 auf 15 Sekunden erhöht. Damit wird zwar der Hintergrund an dem Proteine auch unspezifisch binden verhältnismäßig stärker abgebildet, andererseits können ebenfalls noch geringere Mengen an Antigen sichtbar gemacht werden. Insgesamt zeigte sich, dass die Sensitivität des Nachweisverfahrens bis in den Subnanogrammbereich reicht und damit auch geringe Konzentrationen von anti-präS1 in den verwandten Proben nachgewiesen werden konnten. Dabei handelte es sich allerdings um monoklonale Antikörper. Die folgende Aufgabe bestand also darin auch polyklonale humane Antikörper nachzuweisen.

4.3 Nachweis von Anti-PräS1-Antikörpern aus humanen Seren mittels Western-Blot

Wie oben bereits erwähnt, sollte nun der Nachweis von anti-PräS1 Antikörpern aus humanen Seren mittels Western-Blot erfolgen. Es gelang trotz der hohen Sensitivität des Western-Blot mit dieser Methode kein Nachweis dieser Antikörper. Hierfür sind sicherlich mehrere Gründe anzuführen, die später diskutiert werden sollen.

4.4 Isolationsergebnisse primärer Tupaia-Hepatozyten

Zur Simulation des Verlaufs einer Infektion mit HBV *in vitro* wurde das Infektionsmodell mit primären Tupaia-Hepatozyten benutzt. Dieses schon in der Einleitung beschriebene Modell vereint mehrere Vorteile. Zum einen sind kultivierbare primäre humane Hepatozyten aus Leberteilektomien nur sehr bedingt erhältlich, zum anderen weisen diese Zellen in der Regel eine geringe Suszeptibilität unter experimentellen Bedingungen auf (Gripon et al., 1988). Folglich erschien es sinnvoll auf andere leicht zu beschaffende Zelllinien zurückzugreifen, wie zum Beispiel auf primäre Hepatozyten von Kleinsäugetieren, wie etwa der Ratte. Leider sind diese Zellen nicht für eine HBV-Infektion suszeptibel. Deshalb wurden für die hier zu beschreibenden Inhibitionsexperimente primäre Tupaia-Hepatozyten in einem *in vitro* Zellkulturmodell verwendet. Die Viabilität der isolierten Zellen lag im Allgemeinen bei über 90 % im Trypanblau-Ausschlußverfahren, die Anheftungsraten bei ca. 75 %.

4.5 Inhibition der HBV-Infektion von primären Tupaia-Hepatozyten-Kulturen mit monoklonalen Antikörpern gegen die HBV-Oberflächenproteine

Zunächst wurden die verwendeten Viren mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope der Oberflächenproteine des HBV vorinkubiert. Es sollte untersucht werden, ob dadurch unterschiedliche Inhibitionserfolge der Infektionen erreicht werden konnten.

Die Vorinkubation des Virus mit dem Antikörper dauerte 1 – 2 h. Danach wurde die Virus-Antikörper-Mischung auf die Zellen gegeben. Jeden 3. Tag wurde das Medium abgenommen und in den Zellüberständen das sekretierte HBsAg bzw. das HBeAg bestimmt. Als Inokulat wurde eine gereinigte Virusfraktion mit $2 \cdot 10^5$ Viren/ml des Genotyps D verwendet.

Zur Inhibition wurde jeweils ein Überschuss eines monoklonalen Antikörpers benutzt. Dabei wurden die Antikörper C20/2, Q19/10 und MA18/07 mit den Viren vorinkubiert. C20/2 ist gegen die S-Domäne, Q19/10 präferentiell gegen das präS2 im MHBs und MA18/07 gegen die präS1-Domäne des LHBs gerichtet. Als Kontrolle diente eine Vorinkubation von Viren mit einem Antikörper gegen Hüllproteine des Cytomegalievirus (anti-CMV) und ein Ansatz ohne Virus und Antikörper und schließlich ein Ansatz allein mit Virus.

Die Zellüberstände wurden je nach Abnahmedatum post infectionem bezeichnet. So stellt das Inokulat (Ino) den Zellüberstand nach 24 stündiger Inkubation mit den Hepatozyten dar, T3 bezeichnet den Zellüberstand nach weiteren 3 Tagen, T6 nach 6, T9 nach 9 und T12 nach 12 Tagen, usw.. Diese Zellüberstände wurden mittels eines Sandwich-ELISAs auf die Konzentration an HBsAg untersucht. Eine Verdünnungsreihe mit definierten Mengen an HBsAg diente als Eichreihe.

Tab.1 : Sekretiertes HBsAg in ng/ml der einzelnen Zellüberstände zu den Zeitpunkten Ino, T3, T6, T9, T12; HBeAg als Vielfaches des Grenzwerts für eine positive Reaktion (Sample/Cutoff: S/CO). Der HBeAg-Test wurde mit den Proben des Zeitpunkts T9 durchgeführt.

HBsAg						HBeAg	
Probe	Ino	T3	T6	T9	T12	S/CO	Pos/Neg
Virus	9,564	0,628	0,595	1,139	0,662	1,97	Positiv
Virus	8,207	0,569	0,385	0,863	0,536	2	Positiv
MA 18/07	4,246	0,268	0,243	0,167	0,142	0,4	Negativ
MA 18/07	4,388	0,343	0,201	0,159	0,142	0,25	Negativ
Q 19/10	2,914	0,301	0,151	0,134	0,126	0,3	Negativ
Q 19/10	3,903	0,251	0,159	0,159	0,151	0,4	Negativ
C 20/2	0,251	0,134	0,117	0,117	0,151	0,23	Negativ
C 20/2	0,401	0,075	0,092	0,075	0,092	0,29	Negativ
Anti-CMV	5,939	0,609	0,523	1,059	2,185	3,24	Positiv
Anti-CMV	8,375	0,589	0,305	0,655	1,205	1,5	Positiv
Ohne Virus	0,053	0,060	0,066	0,066	0,179	0,24	Negativ
Ohne Virus	0,086	0,093	0,093	0,093	0,199	0,22	Negativ

Tabelle 1 zeigt die ELISA-Ergebnisse bezogen auf die HBsAg-Konzentration in den jeweiligen Zellüberstandsmedien. Dabei kann man aus der Tabelle den jeweiligen Zeitpunkt der Zellüberstandsentnahme ersehen, außerdem die jeweilige Kombination der Vorinkubation des Virus mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern. Betrachtet man die HBsAg-Konzentrationen eines Ansatzes im zeitlichen Verlauf der Infektion, so sieht man, dass die HBsAg-Konzentrationen im Inokulat am höchsten sind. Dieses ist damit zu erklären, dass die Hüllproteine des Virus noch im ELISA detektiert werden. Als nächstes beobachtet man im typischen Falle der Infektion zum Zeitpunkt T3 und eventuell auch noch zu T6 ein sehr niedriges oder negatives Niveau von HBsAg. Jenes lässt sich folgendermaßen verstehen: Nachdem das Inokulat abgenommen wurde, sind die primären Hepatozyten mehrmals mit Nährmedium gewaschen worden (vgl. Versuchsdurchführung). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass Virus oder anderes Antigen, das nicht selbst von infizierten Hepatozyten produziert worden ist, noch im Versuch verbleibt. Da die mit dem Inokulationsmedium infizierten Hepatozyten anfangs noch kein eigenes HBsAg herstellen, findet man bei T3 und auch noch in Ansätzen bei T6 eine relativ niedrige Proteinkonzentration. Die Anstiege der HBsAg-Konzentrationen zu den Zeitpunkten T9 und T12 beruhen also ganz allein auf der Antigenproduktion mit HBV infizierter

primärer Tupaiahepatozyten. Damit stellt die Höhe der HBsAg-Konzentrationen in den einzelnen Überständen ein direktes Maß für den Infektionserfolg der Zellen dar. Durch Zusatz verschiedener Antikörper in den einzelnen Inokulationsmedien und die eventuell daraufhin folgende Inhibition der Infektion, lässt sich also das Potential der Neutralisation der HBV-Infektion mit einem bestimmten Antikörper ermitteln. Doch zunächst sollte man einen Blick auf den oben beschriebenen normalen Infektionsverlauf ohne Inhibition durch Antikörper werfen. Dazu kann man die ersten zwei Zeilen der Tabelle 1 betrachten, die die Ergebnisse bei alleiniger Inkubation mit Virus darstellen.

4.6 Infektionsverläufe ohne Inhibition und bei Inhibition mit MA18/07

Die folgende Grafik gibt sowohl die Antigenproduktion HBV infizierter primärer Tupaia-Hepatozyten ohne jegliche Form der Inhibition wieder, als auch den Infektionsverlauf bei Inhibition mit einem monoklonalen Antikörper. Dazu wurden Antikörper gegen die unterschiedlichen Domänen des HBV verwendet, unter anderem der Antikörper MA18/07, der gegen das LHBs und dabei insbesondere gegen die präS1-Domäne gerichtet ist. Man erkennt, dass der Ansatz ohne Virus insgesamt unter dem festgelegten cut-off von 1,0 ng/ml verbleibt und damit erwartungsgemäß negativ ist. Auf der anderen Seite kann man gut den typischen Verlauf einer Infektion ohne Inhibition beim Ansatz mit anti-CMV beobachten, wobei die HBsAg-Konzentration ab T6 langsam ansteigt und ab T9 schließlich positiv ist. Beachtet man diese zwei Kurvenverläufe, dann sind die Ergebnisse des Doppelansatzes mit MA18/07 sehr aussagekräftig. Beim Inokulat liegt die HBsAg-Konzentration natürlich im hoch positiven Bereich, sie fällt dann ab, steigt jedoch ab T6 nicht wieder an, so dass ab T3 alle Werte negativ sind. Die Infektiosität des HBV konnte also durch Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper gegen die PräS1-Domäne des LHBs (MA18/07) effizient neutralisiert werden.

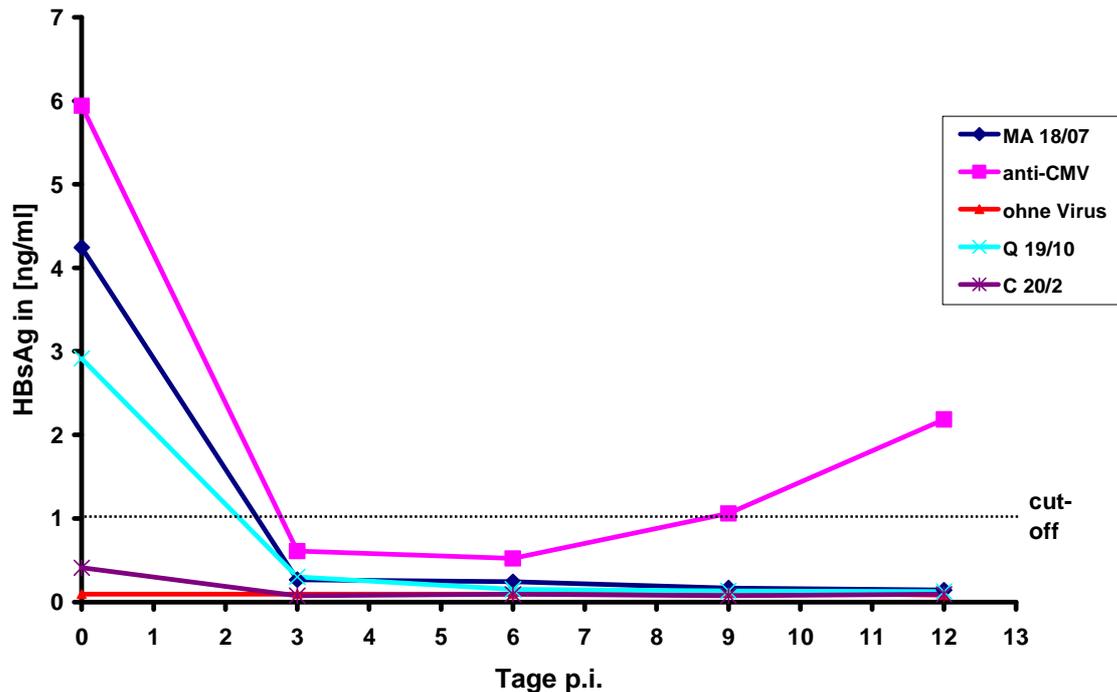


Abb.5: Die Abbildung zeigt die HBsAg-Konzentrationen in [ng/ml] im Zellüberstand zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Mediumabnahme p.i.. Dabei wurden die Ergebnisse für die Inhibition mit MA18/07, Q19/10 und C20/2 dargestellt. Daneben erkennt man Kurven für einen Ansatz mit einem unspezifischen Antikörper (anti-CMV) und für einen Ansatz ohne Virus. Ohne Virus findet wie zu erwarten keine Infektion statt. Mit MA18/07, Q19/10 und C20/2 erkennt man, dass alle Werte (ausser das Inokulat) unterhalb des cut-off liegen. Es findet also eine effiziente Inhibition statt. Der Ansatz mit anti-CMV stellt einen typischen Infektionsverlauf ohne Inhibition dar. Die Hepatozyten produzieren im Infektionsverlauf eigenständig nachzuweisendes HBsAg als Marker für eine stattgefundene Infektion.

4.7 Inhibition der Infektion mit Q19/10

Wie schon in der Einleitung beschrieben, mehren sich die Hinweise, dass die präS1-Domäne eine entscheidende Rolle bei der Infektion eines Hepatozyten mit HBV spielt. Deshalb stellt sich die Frage, ob neben der Möglichkeit der Inhibition der Infektion durch einen gegen präS1 gerichteten Antikörper auch die Möglichkeit der Inhibition besteht, wenn die Antikörper gegen andere Strukturproteine des HBV gerichtet sind. Deshalb sollte die Inhibition der Infektion mit dem Antikörper Q19/10 untersucht werden. Dieser monoklonale Antikörper ist gegen die präS2-Domäne im MHBs gerichtet. Aus der Darstellung wird ersichtlich, dass auch hier die Inhibition erfolgreich ist (siehe Abbildung 5).

4.8 Inhibition der Infektion mit C20/2

Zur Betrachtung der Inhibition mit monoklonalen Antikörpern gehört natürlich auch die alleinige Verwendung eines nur gegen die S-Domäne gerichteten Antikörpers. Dazu wurde der murine Antikörper C20/2 verwendet, der gegen das SHBs gerichtet ist. Auch bei der Inhibition mit C20/2 ist also deutlich zu erkennen, dass die Zellen kein neues HBsAg bilden (siehe Abbildung 5).

Dieses zeigt an, dass keine Infektion mit dem HBV stattgefunden hat. Da C20/2 auch für den Nachweis des HBsAg verwendet wurde, ist es logisch, dass bereits im entsprechenden Inokulum kein HBsAg nachweisbar war. Die bisherigen Versuche haben damit die prinzipielle Inhibierbarkeit einer Infektion mit HBV durch monoklonale Antikörper gegen die drei Hüllproteine belegt. Neben dieser rein qualitativen Aussage durch einen Überschuss an Antikörpern wäre es natürlich wünschenswert, quantitative Aussagen über das Potential der Inhibition der Antikörper machen zu können. Exemplarisch soll dieses anhand eines Antikörpers untersucht werden.

4.9 Titrationsreihe bei Infektionsinhibition mit MA18/07

Um das Potential der Inhibition mit MA18/07 besser beurteilen zu können, wurde eine Titrationsreihe für diesen Antikörper erstellt. In jeweiligen Verdünnungsschritten von 1:10 wurde eine Ausgangsmenge von 2 µg Antikörper MA18/07 mit jeweils der gleichen Menge an Virus vorinkubiert. Der Zellüberstand wurde zu definierten Zeitpunkten auf das Vorliegen von produziertem HBeAg untersucht, um damit den Erfolg der Infektion beurteilen zu können.

Aus der folgenden Abbildung (Abb.6) wird deutlich, dass erst unterhalb einer Konzentration von 70 ng/ml von MA18/07 eine Infektion nachweisbar wird. Außerdem erkennt man in der Abbildung die kontinuierliche Abnahme des Neutralisationspotentials mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers. Damit ist gezeigt, dass die Konzentration an monoklonalen Antikörpern natürlich einen entscheidenden Einfluss auf die Neutralisation einer Infektion hat.

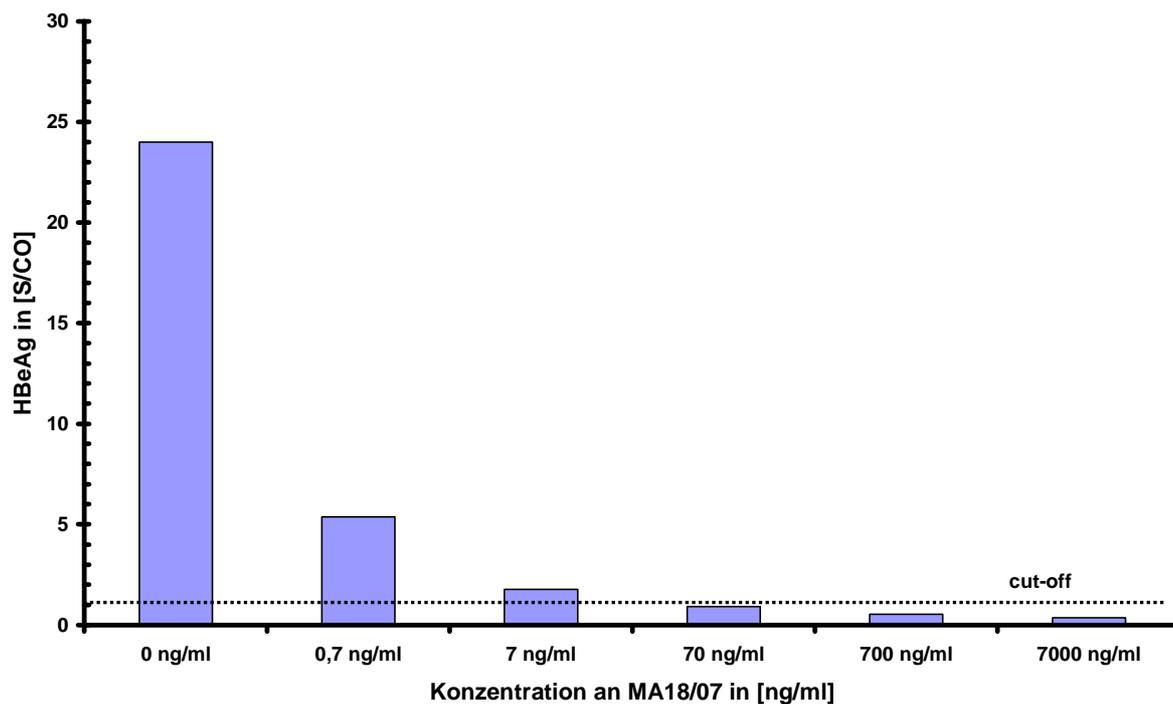


Abb.6: Bei Titration von MA18/07 zeigt die Abbildung das von den Hepatozyten produzierte HBeAg als Maß für eine stattgefundene Infektion von Hepatozyten. Die Menge an vorinkubierten Antikörpern wurde jeweils in 1:10 Verdünnungen heruntertitriert. Als positiv für eine Infektion wird definitionsgemäß eine HBeAg-Konzentration von mehr als 1 S/CO gewertet.

Zusätzlich soll die Inhibition der Infektion in Prozent angegeben werden. Die folgende Abbildung (siehe Abbildung 7) zeigt den Inhibitionserfolg der Infektion in Prozent bei abnehmenden Konzentrationen an MA18/07. Man erkennt, dass erst ab 7 ng/ml MA18/07 der Inhibitionserfolg deutlich abnimmt und somit eine 50%-ige Inhibition bei Werten von etwa 0,4 ng/ml anzunehmen ist.

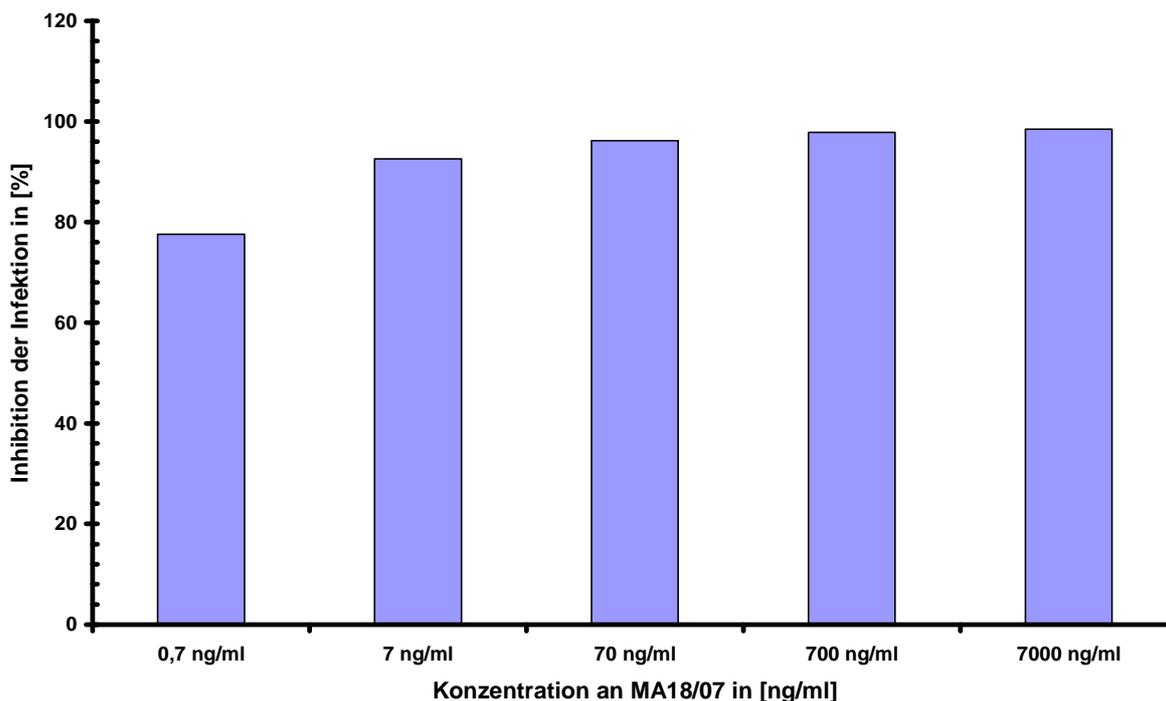


Abb.7: Bei Titration von MA18/07 zeigt die Abbildung den Inhibitionserfolg der Infektion mit HBV in Prozent. Erst ab 7 ng/ml und deutlich erst bei 0,7 ng/ml MA18/07 nimmt die Inhibitionsfähigkeit sichtbar ab. Die Menge an vorinkubierten Antikörpern wurde jeweils in 1:10 Verdünnungen heruntertitriert.

4.10 Inhibition der Infektion durch Kombination von anti-präS1 und anti-SHBs Antikörpern

Bisher wurden Inhibitionsexperimente nur mit einem einzigen monoklonalen Antikörper, der also nur gegen ein einzelnes Epitop gerichtet ist, durchgeführt. Um weitere Aussagen treffen zu können, wurden deshalb auch Versuche mit einem 1:1 Gemisch aus MA18/07 und C20/2 durchgeführt, wobei in 1:10 Verdünnungen ausgehend von 2 µg Antikörper hinuntertitriert wurde. Dabei ist der Antikörper MA18/07 präferentiell gegen die präS1-Domäne der HBV-Oberflächenproteine gerichtet, C20/2 ist allein gegen SHBs gerichtet. Es wurde stets die gleiche HBV-Präparation verwendet.

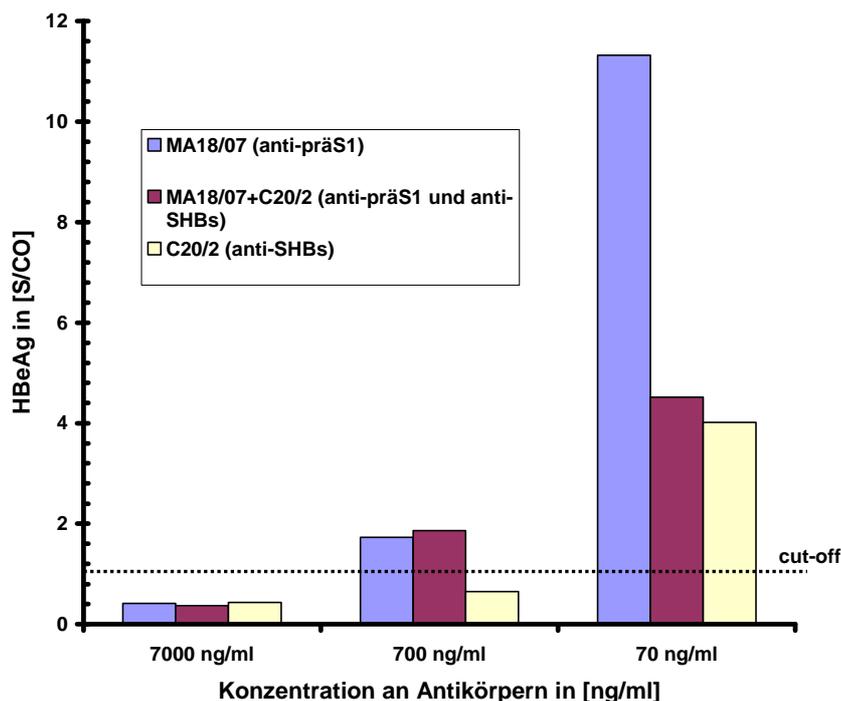


Abb.8: Die Abbildung zeigt die HBeAg-Produktion als Maß für die Infektionsrate primärer Hepatozyten. Im ersten Fall wurde die Inhibition lediglich durch Verwendung von MA18/07 oder C20/2 erreicht. Der zweite Versuch verwendet MA18/07 und C20/2 in Kombination für die Inhibition.

Im Vergleich zur Abbildung 6 fällt auf, dass bei einer Antikörperkonzentration von 700 ng/ml auch bei alleiniger Verwendung von MA18/07 eine Infektion stattfindet. Dieses veranschaulicht, dass direkte Konzentrationsvergleiche zwischen den unterschiedlichen Infektionsversuchen nicht möglich sind.

Die Grafik veranschaulicht aber dennoch, dass eine Inhibition mit 7000 ng/ml Antikörperkonzentration sowohl bei Kombination von Antikörpern, als auch bei alleiniger Verwendung von MA18/07 oder C20/2 erreicht werden kann. Interessanter ist das Inhibitionsverhalten bei größeren Verdünnungen der Antikörper. So ist die Inhibition bei 700 ng/ml Antikörperkonzentration zwischen MA18/07 bzw. MA18/07 und C20/2 als ungefähr gleich zu beurteilen, wohingegen bei 70 ng/ml die Kombination aus MA18/07 und C20/2 wesentlich besser inhibiert, als die alleinige Benutzung von MA18/07. Interessanterweise fällt die hohe Inhibitionsintensität bei alleiniger Verwendung von C20/2 auf. Hier zeigt sich die hohe Bedeutung eines Antikörpers gegen die S-Domäne. Die alleinige Nutzung eines Antikörpers gegen präS1 ist längst nicht so effektiv. Das bessere Inhibitionsergebnis bei alleiniger

Nutzung von C20/2 bei niedrigen Konzentrationen im Vergleich zur Kombination aus MA18/07 und C20/2 weist nochmals auf die Bedeutung des Verhältnisses der einzelnen Antikörper zueinander hin. Ein Verhältnis von 1:1 scheint damit für die Inhibitionspezialität ungünstiger. Dieses soll später genauer diskutiert werden. Weiter soll hier der Inhibitionserfolg der Infektion nochmals graphisch in Prozent veranschaulicht werden, insbesondere das Verhältnis bei alleiniger Nutzung von anti-präS1 oder bei Verwendung eines Kombinationsimpfstoffes aus anti-S und anti-präS1.

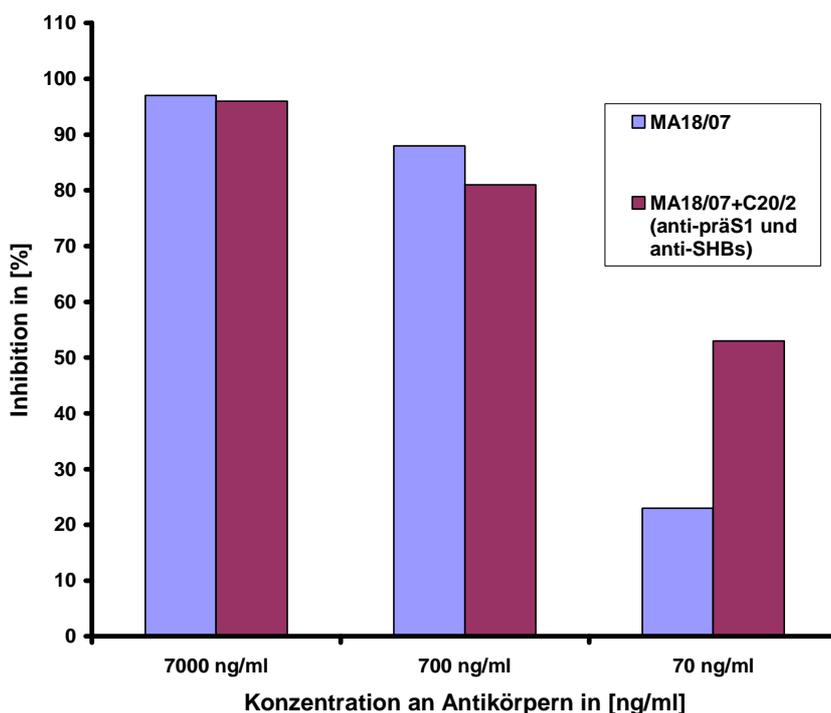


Abb. 9: Die Abbildung zeigt die Inhibitionsfähigkeit der Antikörper MA18/07 und C20/2 + MA18/07 in Prozent bei Infektion mit HBV. Bei höheren Konzentrationen ist der Inhibitionserfolg der kombinierten Antikörper nicht besser, erst bei niedrigen Konzentrationen ist die Kombination von MA18/07 und C20/2 (anti-präS1 und anti-SHBs) deutlich effektiver.

Die nächste logisch folgende Überlegung wäre die Inhibition mit einer Antikörperkombination, die gegen alle drei Domänen des HBV gerichtet ist.

4.11 Inhibition der Infektion mit anti-S, anti-präS1 und anti-präS2

Um den Verhältnissen in vivo möglichst nahe zu kommen, wurde ebenfalls eine Inhibition mit einer Kombination aus gegen alle drei Oberflächenproteine des HBV

gerichteter Antikörper verwendet. Dazu wurde das Serum eines Schafs, das gegen gereinigte HBsAg-Filamente immunisiert worden war, mit Hilfe der Natriumsulfat-ausfällung aufgereinigt. Die verwendeten Viren (HBV, Genotyp D) werden zunächst mit den Antikörperausfällungen aus dem Serum 1h vorinkubiert. Danach wurde die Virus/Zellmedium-Mischung auf die Zellen gegeben. Jeden dritten Tag wurde das Medium abgenommen und das HBs- bzw. HBe-Antigen bestimmt. Äußerst wichtig war, dass die Antikörperfraktionen auf das Anti-HBs geeicht waren und dann jeweils in 1:10 Verdünnungen heruntertitriert wurden. Damit sich in jedem Zellansatz trotz natürlich unterschiedlicher Proteinkonzentrationen der Ausfällungen die gleichen Mengen an Protein befand, wurde fehlendes Protein durch Proteinausfällungen aus Negativserum ausgeglichen. Damit erhielt man für festgelegte Konzentrationen an anti-HBs-Titern die jeweilige Stärke der Inhibition.

Laut Definition der WHO ist ein ausreichender Schutz vor Infektion noch bei einem anti-HBs-Titer von 10 IU gegeben. Bei einigen Seren, wie beispielsweise der Ausfällung des anti-HBs-, anti-präS1- und anti-präS2- haltigen Schafserums, liegen natürlich dann neben der definierten Menge an anti-HBs, auch noch anti-präS1 und anti-präS2 vor. In dem vorliegenden Beispiel konnte also vom Vorliegen von drei polyklonalen Antikörperspezifitäten ausgegangen werden. Um einen Vergleich der Potenz der Inhibition anstellen zu können, wurde bei diesem Versuch wiederum die Inhibition mit monoklonalen Antikörpern gegen präS1 und SHBs durchgeführt. Diese Antikörper wurden jeweils bei einer Konzentration im Überschuss bei der Vorinkubation mit Virus verwendet.

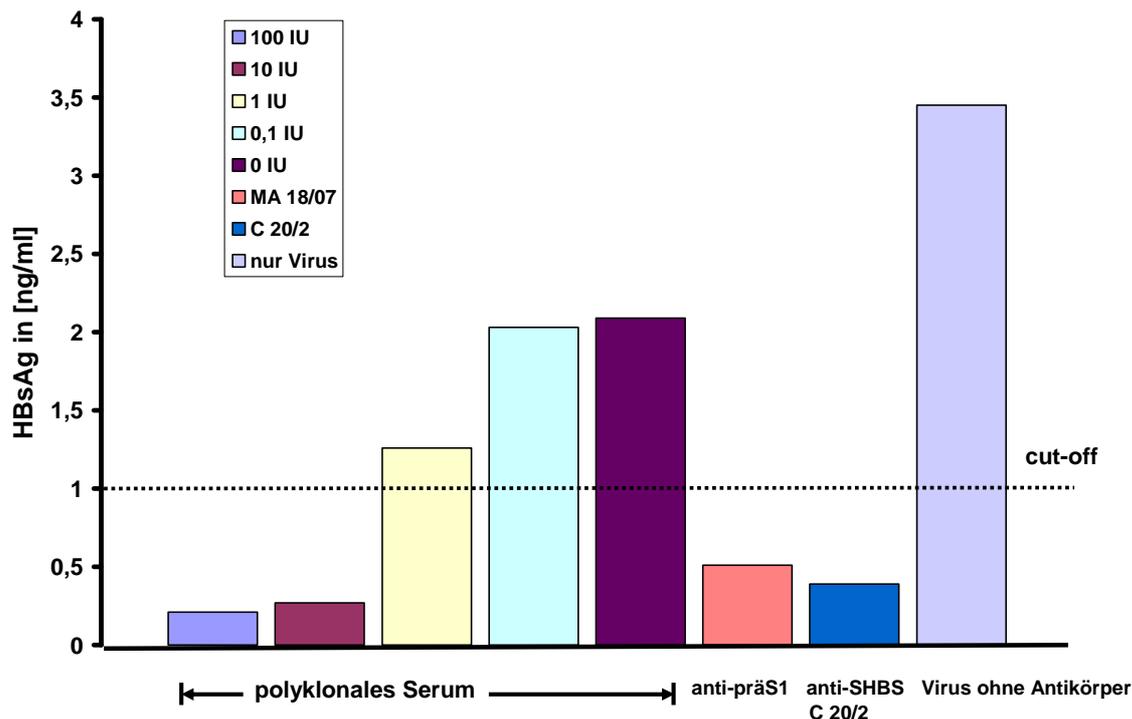


Abb.10: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Neutralisation der HBV Infektion bei unterschiedlichen Mengen an Antikörpern aus der Ausfällung eines Schafserums, das anti-HBs, anti-präS1 und anti-preS2 enthält. Zum Vergleich sind die Antigenproduktionen bei Inhibition mit einem Überschuss eines monoklonalen Antikörpers dargestellt.

Die Abbildung zeigt sehr gut, dass durch die Ausfällung des Schafserums sowohl bei einer Antikörpermenge von 100 IU, als auch noch bei einer Menge von 10 IU eine vollständige Inhibition der Infektion erreicht werden kann und auch mit 1 IU noch eine erkennbare Inhibition erzielt werden kann. Damit wird die inhibitorische Potenz der Schafserum-Antikörper-Ausfällung unterstrichen. Inwiefern das Vorhandensein aller drei gegen das Oberflächenprotein von HBV gerichteten Antikörperklassen eine derartige Inhibition bewirkt, kann nur vermutet werden, da die Konzentration von präS1- und präS2-Antikörpern im Schafserum nicht bekannt war. Wenn man – unberechtigterweise- annähme, dass die präS-Antikörper nicht vorhanden wären, würden 50% Inhibition mit etwa 2 IU anti-HBs erreicht.

4.12 Inhibition der Infektion mit weiteren monoklonalen

Antikörpern

Weiterhin wurden Inhibitionsexperimente mit weiteren monoklonalen murinen Antikörpern durchgeführt. Dabei handelt es sich um die Antikörper RFHBs 1 und RFHBs 7, die beide der Klasse IgG1 angehören. Diese Antikörper wurden freundlicherweise von Frau Jennifer Waters zur Verfügung gestellt [Waters *et al.*, 1986]. RFHBs 1 bindet an die Aminosäuren 124-137, der Antikörper RFHBs 7 bindet an die Aminosäuren 139-147 der α -Determinante des SHBs. Auch diese Antikörper wurden im Rahmen des Infektionsexperimentes zunächst mit dem Virus vorinkubiert. Insgesamt wurden die Antikörper jeweils auf die Aktivität in IU geeicht, wobei – um je Ansatz die gleichen Proteinmengen zu haben – ein Proteinausgleich mit Ziegenserum durchgeführt wurde. In den Zellüberständen wurde das von den Hepatozyten produzierte HBsAg bzw. HBeAg als Marker der Infektion nachgewiesen. Man sieht auf der folgenden Grafik, dass eine Antikörperaktivität von 100 IU erforderlich ist, um eine Infektion vollständig mit RFHBs 1 zu inhibieren. Als Vergleich zur Inhibition mit diesem Antikörper, soll der monoklonale murine Antikörper RFHBs 7 betrachtet werden.

Im Vergleich fällt die bessere Neutralisationsfähigkeit des Antikörpers RFHBs 7 auf, wenn man beachtet, dass neben der Inhibition bei 100 IU auch noch Inhibitionen bei 10 und 1 IU möglich sind. Dieses deutet darauf hin, dass das Potential der Inhibition bei RFHBs 7 stärker ausgeprägt ist als bei RFHBs 1 (vergleiche Abb. 11).

Ähnliches kann ebenfalls mit einem Blick auf die HBeAg-Produktion der Zellen gezeigt werden. Ob die Gründe für die bessere Inhibition in dem unterschiedlichen Angriffspunkt der Antikörper oder an einer höheren Affinität liegen, kann an dieser Stelle nicht entschieden werden.

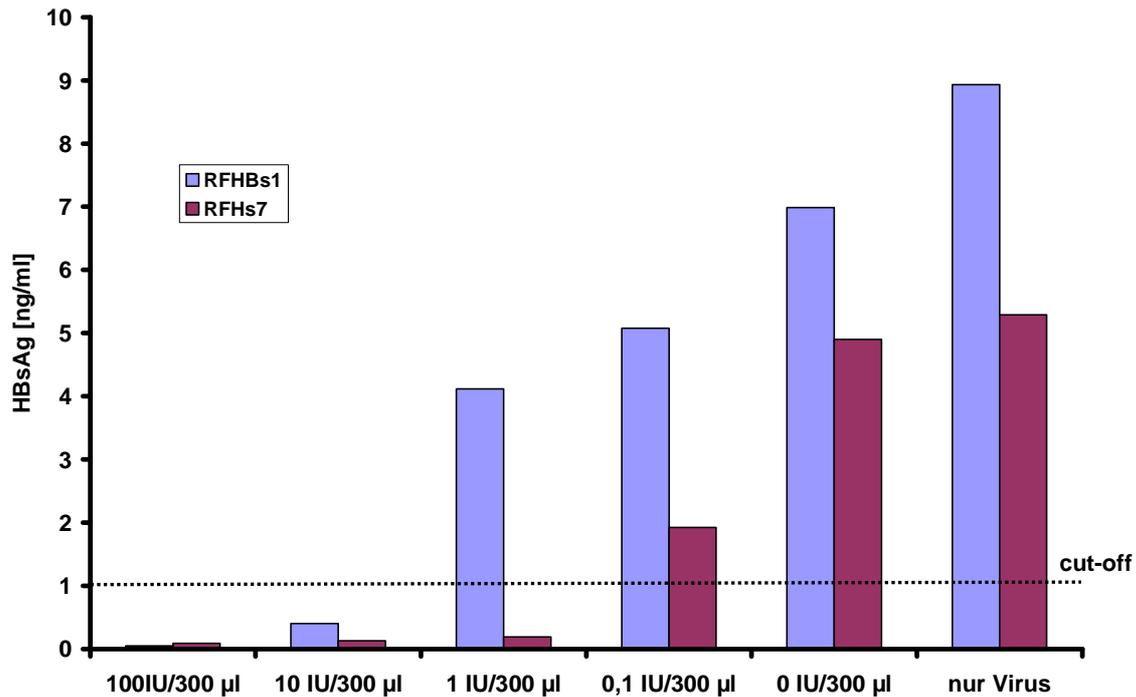


Abb.11: Dargestellt ist die HBsAg-Produktion zum Abnahmezeitpunkt T12. Die Antikörper RFHBs1 und RFHs7 wurden in absteigenden Konzentrationen eingesetzt. Man erkennt, dass bei einer Antikörperkonzentration von 1 IU/300 µl RFHs7 die Infektion noch inhibieren kann, wohingegen bei RFHBs1 eine deutliche Infektion zu beobachten ist.

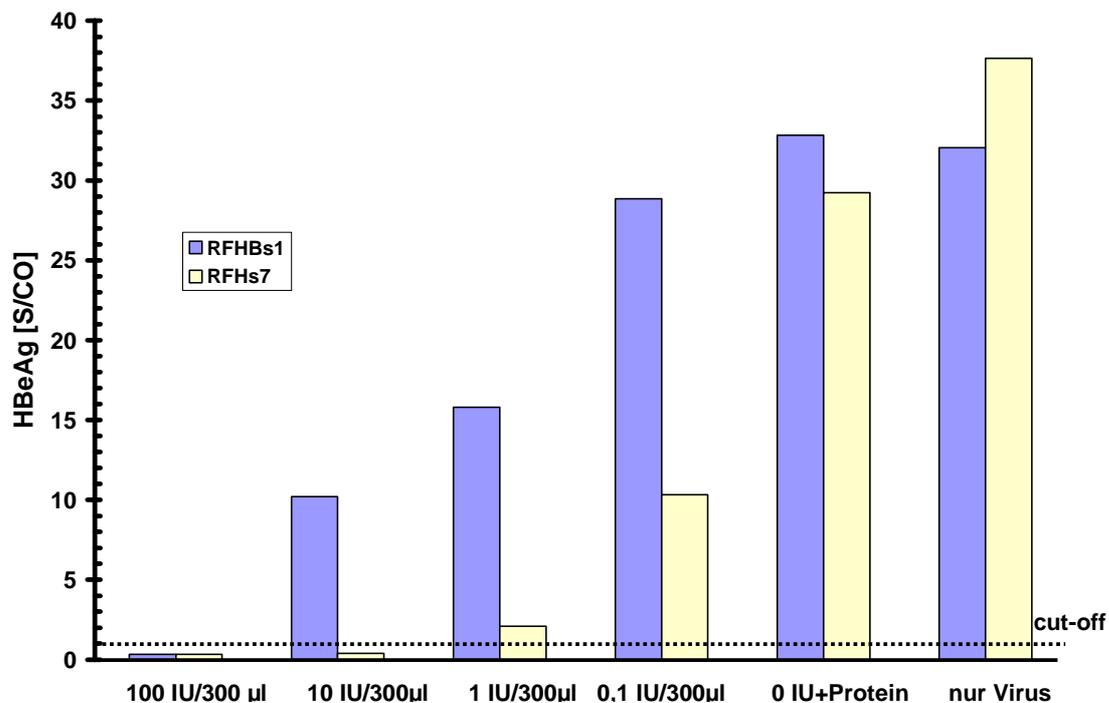


Abb.12: Die Abbildung zeigt die HBeAg-Produktion zum Zeitpunkt T 12. Die Antikörpermengen sind wiederum auf die Aktivität in IU geeicht. Beim Vergleich von RFHBs1 und RFHBs7 sieht man, dass RFHBs7 die Infektion bei 10 IU/300 µl noch inhibieren kann, was RFHBs1 nicht gelingt.

Auf den Abbildungen 11 und 12 erkennt man die bessere Inhibitionsfähigkeit von RFHBs 7 im Vergleich mit RFHBs 1. Interpoliert auf 50% Inhibition ist RFHBs7 etwa 20 mal wirksamer.

4.13 Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten monoklonaler Antikörper

Die gewünschten Fragmente erhält man indem man den Antikörper an spezifischen Schnittstellen mittels Verdauungsenzymen zerschneidet. In diesem Fall wird wieder mit dem Immunglobulin der Klasse IgG₁ gearbeitet, das durch Enzymverdauung in die Fragmente Fc, F(ab')₂ und Fab zerlegt werden kann. Entscheidend für die folgenden Versuche ist das Fragment Fab, welches die Antigen-Bindungsstelle enthält. Durch die alleinige Arbeitsweise mit der Antigen-Bindungsstelle kann gewährleistet werden, dass Nebeneffekte des Antikörpers, wie die Tendenz zur Agglutination oder Ausfällung ausgeschlossen werden. Das IgG wird zur Herstellung der Fab-Fragmente durch das Enzym Ficin zerlegt. Wichtig ist, dass Ficin vor der Reaktion mit Cystein aktiviert werden muss. Ein Vorteil von Ficin ist, dass es über einen relativ weiten pH-Bereich effektiv wirksam ist. Das Ficin wird zur Aufspaltung der IgGs als immobilisiertes Enzym verwendet, was den Vorteil mit sich bringt, dass eine Kontamination des gewünschten IgG-Fragments gering gehalten wird. Desweiteren ist die Regeneration des Enzyms möglich, was eine erneute Verwendung gewährleistet. Für die folgenden Inhibitionsexperimente werden die monoklonalen Antikörper MA18/07 und C20/2 mittels Ficinverdauung in die einzelnen Bestandteile der Antikörper zerlegt, so dass die Fab-Fragmente dieser Antikörper für die Inhibitionsexperimente zur Verfügung stehen. Zunächst musste aber gezeigt werden, dass bei der Herstellung von Antikörperfragmenten auch tatsächlich die gesuchten Fab-Fragmente entstanden sind. Hierzu wurden unterschiedliche Fraktionen des Herstellungsprozesses mittels eines Silbergels dargestellt, wobei man prinzipiell die Proteine sowohl im unreduzierten Zustand, wie im mit DDT reduzierten Zustand auftrennen kann.

Komplette Fab-Fragmente weisen ein Molekulargewicht von 50 kDa auf. Zunächst wurde die Reaktion mit Ficin über Nacht durchgeführt, was zu einem starken Abbau führte. Im weiteren wurde die Inkubationszeit mit dem Enzym auf 6 Stunden reduziert (siehe Abb.13). Die hierbei entstandenen Fraktionen an Fab-Fragmenten wurden mittels eines Silbergels aufgetrennt.

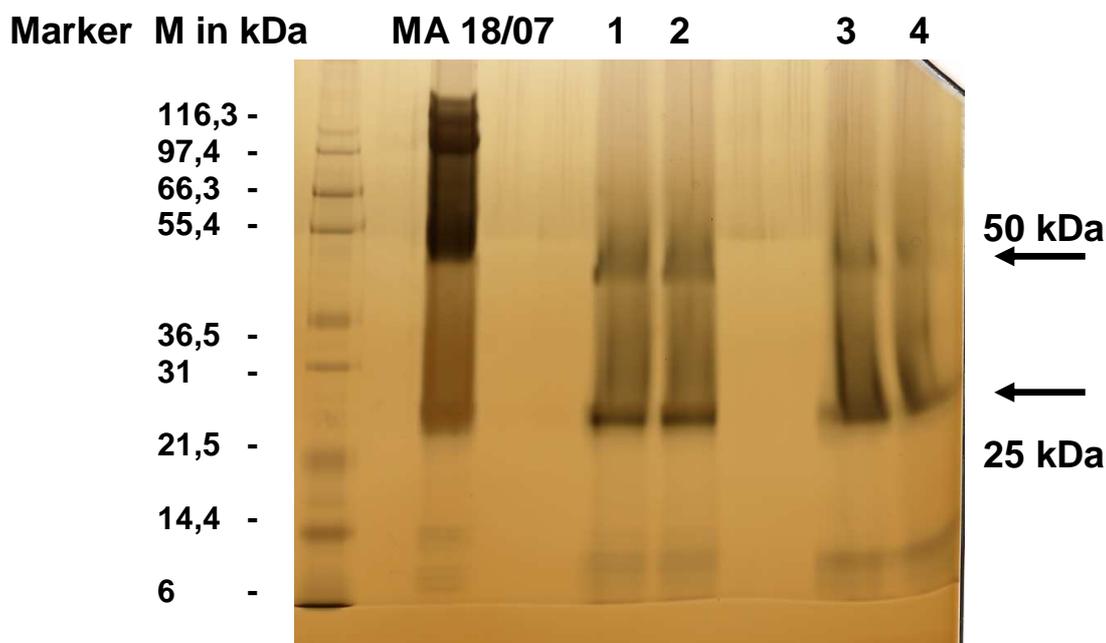


Abb. 13: Silbergelfärbung von vier Fraktionen (1,2,3,4) nach enzymatischer Herstellung von Fab-Fragmenten aus dem monoklonalen Antikörper MA 18/07. Dabei wurde die Inkubationszeit mit dem Ficin auf ca. 6 h begrenzt. Auf das SDS-Gel wurden 2 μ g der jeweiligen Proben unreduziert aufgetragen. Außerdem wurde der Antikörper MA18/07 direkt aufgetragen, neben der Auftragung des Proteingrößenmarkers (Abkürzung M).

Wie man auf der Abbildung 13 sehen kann, ergeben sich in allen vier Fraktionen Banden sowohl bei 50 als auch bei 25 kDa. Deshalb kann man folgern, dass neben reinen Fab-Fragmenten (50 kDa) ebenfalls ohne DTT ein Reduktionseffekt (Cystein) für Fragmente mit einer Größe von 25 kDa sorgt. Daneben ist in der obigen Abbildung allerdings auch gut zu sehen, dass in allen Fraktionen Fab-Fragmente in deutlicher Weise vorhanden sind. Folglich hat eine Verkürzung der Inkubationszeit mit dem Ficin tatsächlich für eine reinere Herstellung von Fab-Fragmenten gesorgt, wobei ein deutlich niedrigerer Reduktionseffekt zu beobachten ist. Da für die

folgenden Versuche eine relativ große Menge an Fab-Fragmenten nötig war, wurden die einzelnen Fraktionen gepoolt. Auch hier soll kurz anhand eines Silbergels dargestellt werden, dass diese Probe genügend Fab-Fragmente enthält.

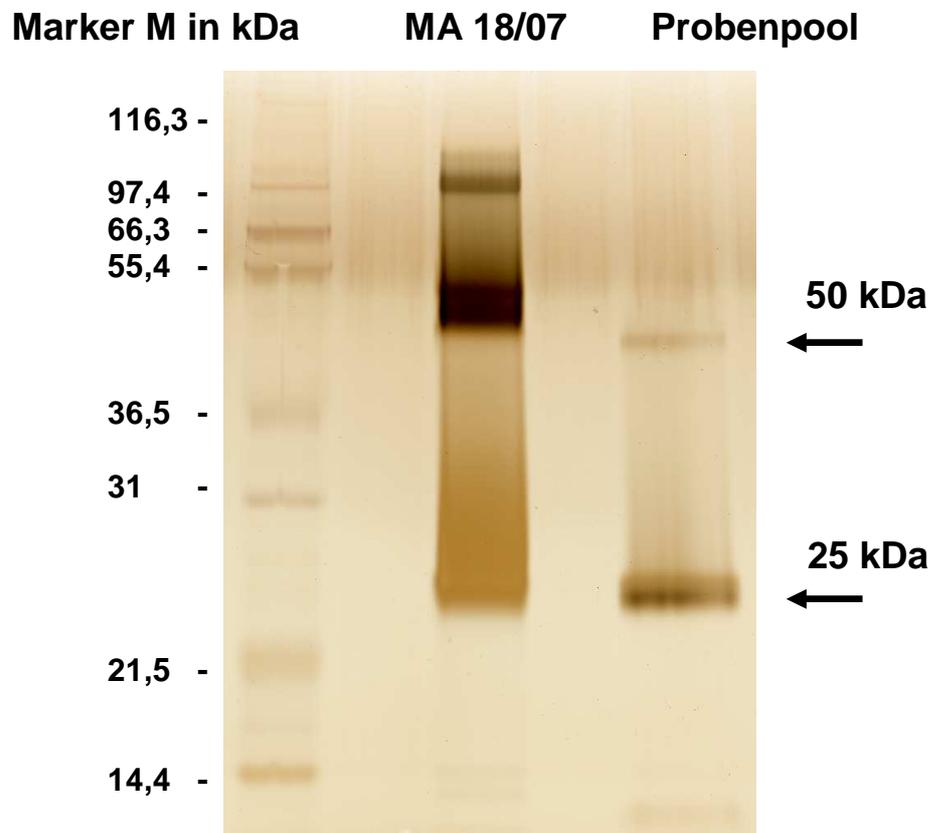


Abb. 14: Silbergeldarstellung einer aus Fab-Fragment-Fraktionen gepoolten Probe. Neben dem ursprünglichen monoklonalen Antikörper MA 18/07 wurde auch hier zur Größenbestimmung der einzelnen Proteinfragmente ein Proteingrößenmarker aufgetragen (M). Es wurden jeweils 2 μg aufgetragen und alle Proben waren unreduziert.

Auf der Abbildung 14 erkennt man, dass der Probenpool 50 kDa schwere Fab-Fragmente enthält. Um in den folgenden Versuchen zur Inhibition der Infektion mit Fab-Fragmenten mehrere Aussagen treffen zu können, wurden die oben beschriebenen Versuche mit MA18/07 auch mit dem monoklonalen murinen Antikörper C20/2 durchgeführt. Auch die Fab-Fragmente dieses Antikörpers werden auf ihr Inhibitionspotential hin untersucht.

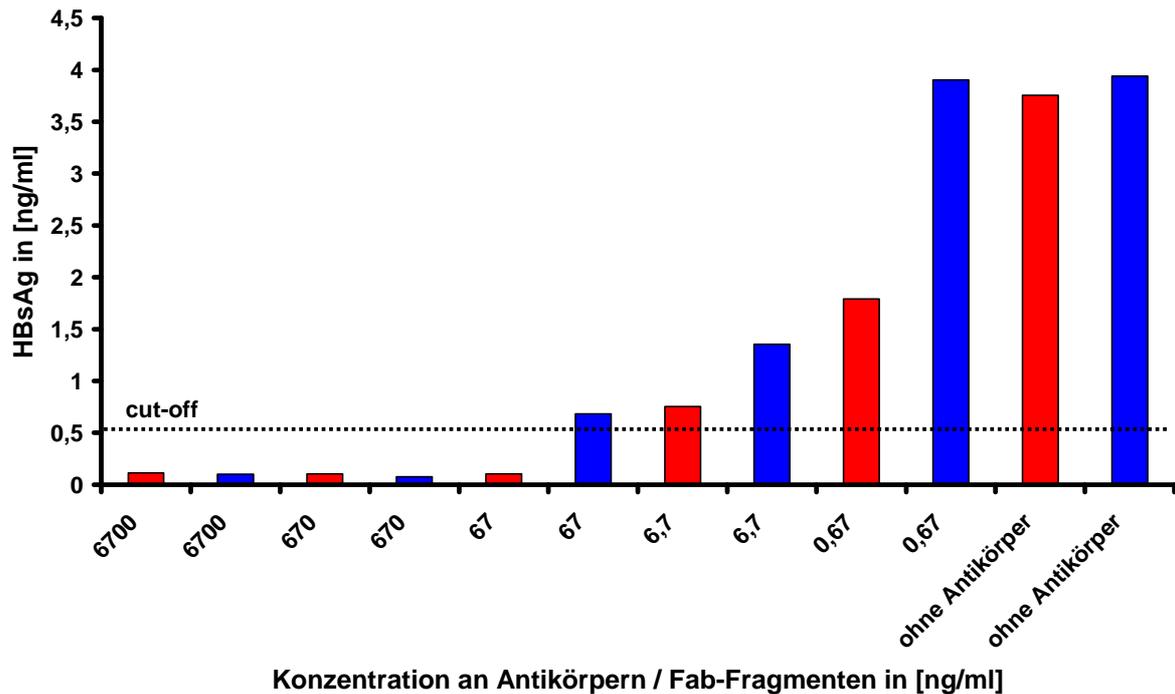


Abb. 15: Darstellung der HBsAg-Produktion von primären Tupaia-Hepatozyten am Tag 9 (T9) post infectionem. Dabei wurde das Virus mit unterschiedlichen Konzentrationen von MA18/07 (in der Abbildung rot) bzw. Fab-Fragmenten von MA18/07 (in der Abbildung blau) vorinkubiert. Insbesondere erkennt man, dass bei einer Konzentration von 67 ng/ml bei der Inhibition mit dem kompletten Antikörper noch keine Infektion stattgefunden hat, wohingegen bei Verwendung der Fab-Fragmente eine Infektion nachgewiesen werden kann.

Die Abbildung 15 (rot) zeigt die Bildung von HBsAg in Abhängigkeit von der Menge des inhibierenden Antikörpers MA18/07. Man erkennt, dass eine vollständige Inhibition der Infektion bei einer Konzentration von 6700 bis 67 ng/ml gegeben ist. Im folgenden sollte untersucht werden, wie die Inhibition mit den Fab-Fragmenten dieses Antikörpers funktioniert.

Auf der gleichen Abbildung (blau) erkennt man, dass auch mit den Fab-Fragmenten von MA18/07 eine ausreichende Inhibition erreicht werden kann. Allerdings ist die Potenz der Inhibition schlechter (in etwa 10 %). Folglich ist das Potential der Fab-Fragmente von MA18/07 als geringer in bezug auf die Inhibitionsfähigkeit einer Infektion mit HBV zu beurteilen.

Festzuhalten bleibt an dieser Stelle, dass die Herstellung funktionsfähiger Antikörperfragmente mit einem hohen Inhibitionsvermögen gelungen ist. Die Einschränkung der Inhibitionsfähigkeit ist teilweise sicher auch mit der Reduktion eines Teils der

Antikörperfragmente zu erklären, die damit unwirksam sind. Ähnliche Ergebnisse wie bei MA18/07 sind auch mit dem monoklonalen Antikörper C20/2 zu beobachten. Die folgende Grafik macht deutlich, dass eine vollständige Inhibition der Infektion bis einschließlich einer Konzentration von 670 ng/ml C20/2 möglich ist. Der Antikörper C20/2 ist gegen die S-Domäne der Oberflächenproteine des HBV gerichtet.

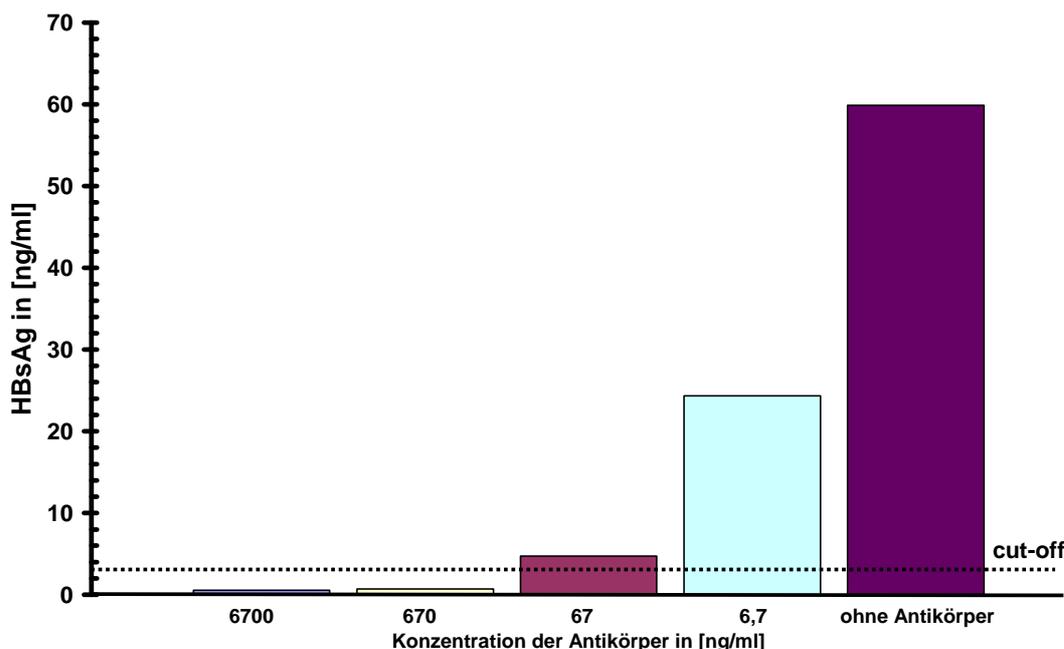


Abb. 16: Darstellung der HBsAg-Produktion zum Zeitpunkt T12 eines Inhibitionsexperiments mit primären Tupaia-Hepatozyten bei Inhibition mit unterschiedlichen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers C 20/2.

Auch hier soll im Vergleich ein Blick auf die Inhibitionsfähigkeit der Antikörperfragmente geworfen werden.

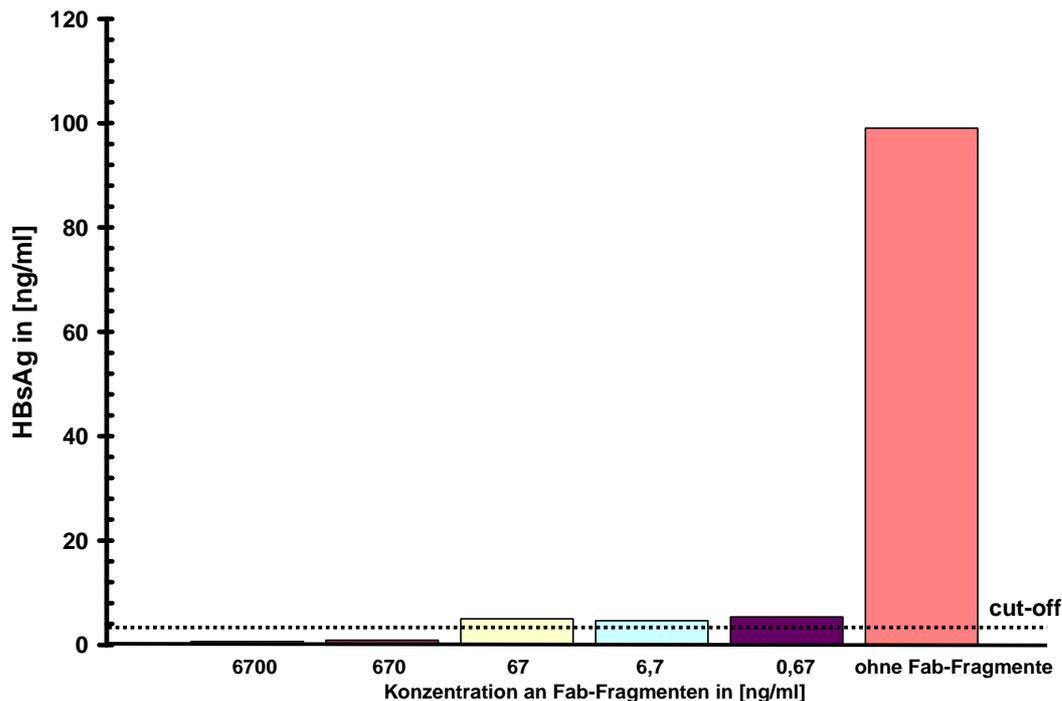


Abb. 17: Darstellung der HBsAg-Produktion zum Zeitpunkt T12 der Infektion primärer Tupaia-Hepatozyten bei Inhibition der Infektion mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fab-Fragmenten des Antikörpers C20/2.

Die Abbildung lässt erkennen, dass in diesem Fall die Neutralisation der Infektion auch bei den Konzentrationen 6700 und 670 ng/ml funktioniert. Deshalb ist die Potenz zur Neutralisation einer Infektion durch die Fab-Fragmente von C20/2 als ebenso hoch anzusiedeln, als die von C20/2.

4.14 Inhibition mit spezifischen Antikörpern gegen präS1

Um noch intensiver die Inhibition der Infektion durch alleinige Nutzung von Antikörpern gegen die präS1-Domäne untersuchen zu können, wurden im folgenden Inhibitionsexperimente mit spezifischen Antikörpern gegen die präS1-Domäne durchgeführt. Dazu wurden insbesondere polyklonale Antikörper eingesetzt, die gegen die präS1-Domäne in Kaninchen hergestellt wurden und die im folgenden mit H 762 bezeichnet werden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Schaller, ZMB, Heidelberg). Außerdem nutzten wir ebenfalls im Kaninchen durch Impfung mit Engerix hergestellte Antikörper, die damit gegen die S-Domäne

gerichtet sind und im folgenden mit H 651 bezeichnet werden (H. Schaller).

Die mit diesen Antikörpern durchgeführten Inhibitionsexperimente folgen in ihrer Durchführung dem bereits mehrmals beschriebenen Modus. Die Virusfraktion wurde zunächst mit den Antikörpern zwei Stunden lang vorinkubiert, um dann in den jeweiligen unterschiedlichen Virus - /Antikörperverhältnissen zu den primären Hepatozyten gegeben werden zu können. Das Ausmaß der zu den unterschiedlichen Zeitpunkten produzierten HBsAg- bzw. HBeAg- Mengen diente als Marker für eine erfolgreiche Infektion der Zellen. Zunächst sollte also im folgenden überprüft werden, ob überhaupt mit den im Hasen hergestellten Antikörpern eine Inhibition einer Infektion erreicht werden konnte (mit H 651). Daraufhin sollte gezeigt werden, dass selbst nur unter Verwendung eines Antikörpers gegen präS1 (mit H 762) eine Inhibition gelingen konnte.

Deshalb führten wir als erstes das Inhibitionsexperiment mit gefällten Antikörpern aus der Fraktion H 651 durch, wobei es sich wie beschrieben um anti-S Antikörper handelt (Genotyp A, Impfung mit Engerix).

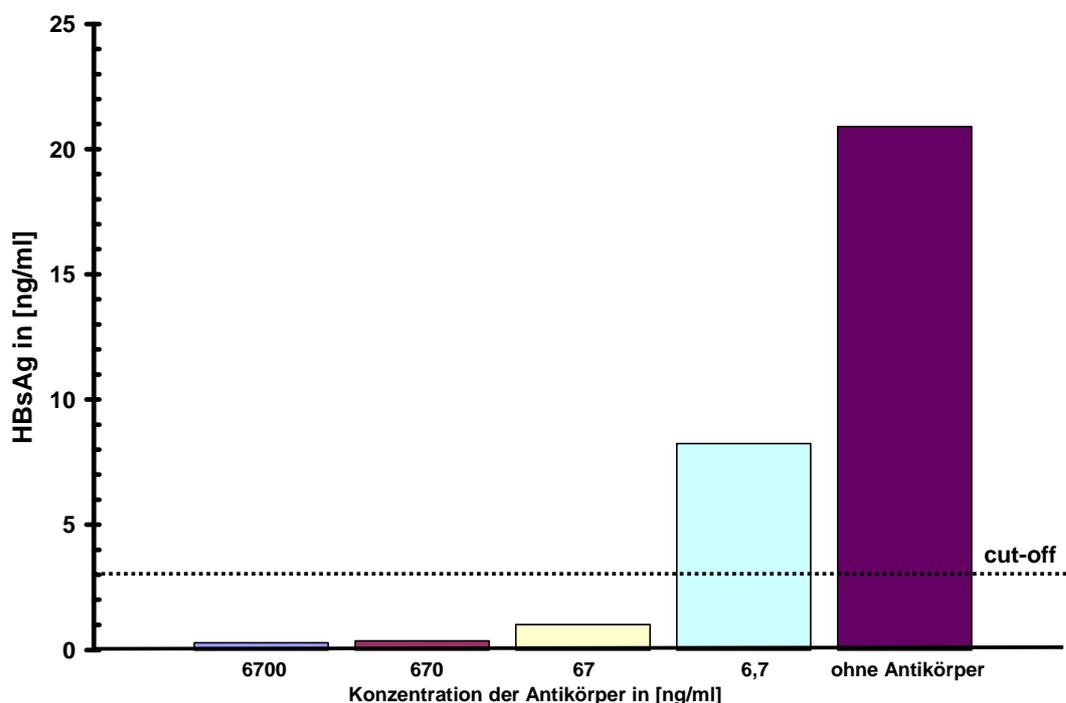


Abb. 18: Die Abbildung zeigt die HBsAg-Produktion zum Zeitpunkt T12 bei Inhibition mit unterschiedlichen Konzentrationen an Antikörpern gegen die S-Domäne, hergestellt in Kaninchen (H 651).

Wie man gut auf der obigen Abbildung erkennen kann, findet man eine komplette Inhibition der Infektion bis einschließlich zu einer Menge von 0,02 μg H 651. Interpoliert findet man 50 % Inhibition etwa bei einer Konzentration von 5ng/ml. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass prinzipiell auch die im Kaninchen hergestellten polyklonalen Antikörper gegen die S-Domäne fähig sind, eine Infektion mit dem Hepatitis B Virus zu verhindern. Dieses ist insgesamt nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass schon vorher mit den monoklonalen Antikörpern gegen die S-Domäne gezeigt wurde, dass eine Inhibition der Infektion ohne Probleme möglich ist (Experimente mit C20/2). Im Umkehrschluß lässt sich nun folgendes postulieren: Da ebenfalls bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers MA18/07 (gegen die präS1-Domäne gerichtet) eine Infektion effizient neutralisiert werden konnte, sollte auch bei Nutzung von H 762 (polykonal gegen präS1) eine Verhinderung der Infektion möglich sein.

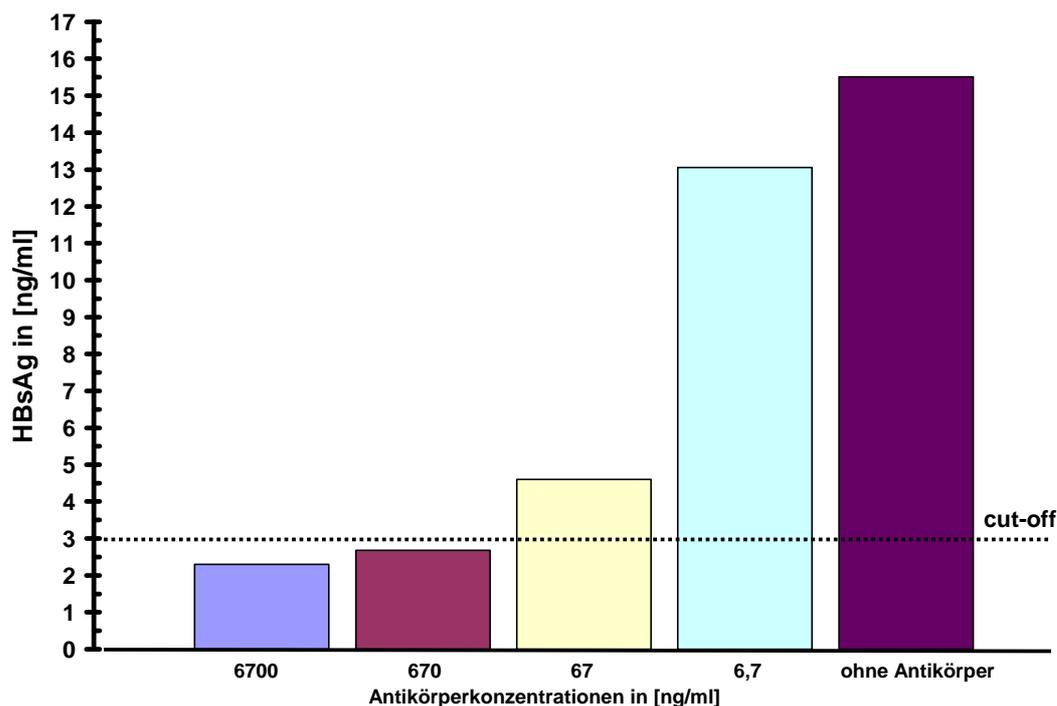


Abb. 19: Die Abbildung zeigt die HBsAg-Produktion zum Zeitpunkt T12. Dabei wurde den einzelnen Fraktionen jeweils eine unterschiedliche Menge des polyklonalen Antikörpers H 762 zugesetzt. Dieser im Kaninchen hergestellte Antikörper ist lediglich gegen die präS1-Domäne gerichtet.

Wenn man die Abbildungen 18 und 19 miteinander vergleicht, so sieht man zunächst, dass beide der unterschiedlichen Antikörper, eine Infektion mit HBV verhindern können. Auffällig ist jedoch, dass die Antikörper gegen die S-Domäne in schon niedrigerer Konzentration einen Infektionserfolg verhindern. Allerdings sollte man bedenken, dass bei den gesamten polyklonalen Seren, die nicht auf Antikörpermenge oder anti-S bestimmt wurden, nicht exakt gesagt werden kann, ob der Antikörper schlecht bindet oder zu wenig Antikörper gegen die präS1- oder S- Domäne vorhanden sind.

4.15 Inhibition der Infektion mit polyklonalen humanen Antikörpern gegen HBV

Im folgenden werden für die Inhibitionsexperimente wiederum polyklonale Antikörper genutzt. Diese Antikörper sind humanen Ursprungs und wurden durch die Natriumsulfatfällung aus unterschiedlichen Probandenserum gewonnen. Die Konzentration der einzelnen Antikörperausfällungen wurde photometrisch bestimmt, die Aktivität an anti-HBs der einzelnen Serumausfällungen wurde von einem externen Labor für Diagnostische Mikrobiologie mit Standardverfahren ermittelt. Um, wie in den vorhergehenden Versuchen auch, einen Vergleich der Inhibitionsfähigkeit der einzelnen Serumausfällungen zu erhalten, wurden die verwendeten Proben auf die anti-HBs Aktivität eingestellt. Sich damit ergebende Unterschiede in den Proteinkonzentrationen wurden durch Zugabe von Negativserumausfällungen ausgeglichen. Damit erhält man für die unterschiedlichen Antikörperausfällungen jeweils die gleiche Aktivität an anti-HBs bei gleichem Proteingehalt der Proben. Insgesamt ist damit der direkte Vergleich der Inhibitionsfähigkeit ganz unterschiedlicher Patientenserum gegeben. Zur Ermittlung der Inhibition wird der schon mehrmals beschriebene Weg gewählt (siehe 3.1.3). Die unterschiedlichen Ausfällungen der Patientenserum werden bei verschiedenen definierten anti-HBs Aktivitäten zunächst für etwa 2 Stunden mit der Virussuspension vorinkubiert. Daraufhin werden diese Antikörper-Virusmischungen mit dem Zellkulturmedium zu den primären Tupaia-Hepatozyten gegeben. An den definierten Zeitpunkten wird der Zellüberstand abgenommen und mittels ELISA auf den Gehalt an neu produziertem HBsAg bzw. HBeAg untersucht. Diese Werte gelten als Maß für die erfolgte Infektion der Zellen.

Die im folgenden verwendeten Hyperimmunseren wurden freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin in Suhl zur Verfügung gestellt. Dabei finden wir in den zur Verfügung stehenden Proben vorwiegend hochtitrige Spiegel von antiHBs. Diese große Konzentration an Antikörpern gegen die S-Domäne wurde entweder durch eine Impfung mit nachfolgender Boosterung der Patienten mit dem Standardimpfstoff Engerix (Genotyp A) erreicht oder es liegen Seren von mit Hepatitis-B Virus infizierten Patienten mit nachfolgender Boosterung vor.

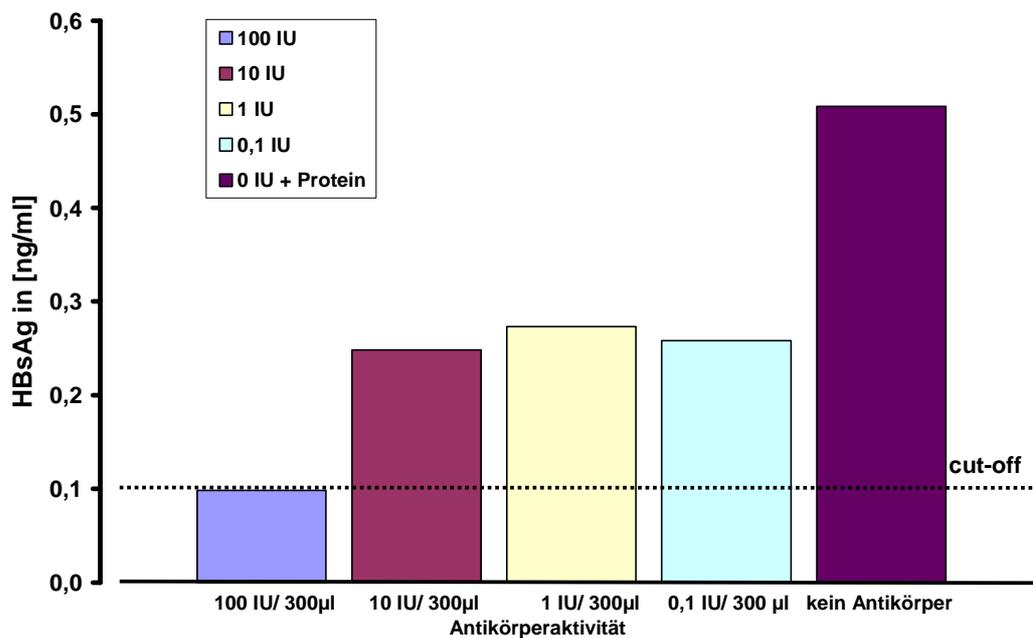


Abb. 20: Auf der Abbildung findet man die HBsAg-Produktion zum Zeitpunkt T12. Dabei wurde die Inhibition der Infektion durch Zugabe an Antikörpermengen unterschiedlicher Aktivität an anti-HBs erreicht. Bei dem zugegebenen Antikörper (ID 10 66 834) handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper, der nach Impfung mit Engerix und folgender Boosterung im Serum eines Patienten vorlag. Der Antikörper wurde mit Hilfe der Natriumsulfatausfällung aus dem Hyperimmunserum gewonnen.

Die Abbildung 20 zeigt die Inhibition mit dem durch Engerix-Impfung gewonnenen polyklonalen humanen Antikörper. Wie man leicht erkennt ist eine sicher messbare Inhibition der Impfung nur bei einer Menge von 100 IU anti-HBs möglich. Dabei enthält diese Antikörperausfällung lediglich anti-HBs, da der Impfstoff Engerix lediglich gegen die S-Domäne des HBV gerichtet ist.

Zum Vergleich soll die Inhibition mit einem anderen Serum (ID 10 66 757) betrachtet werden. Dieses Serum stammt von einem Spender, der zunächst an einer Infektion mit HBV gelitten hat. Im weiteren wurde der Spender mit dem Impfstoff Engerix geboostert.

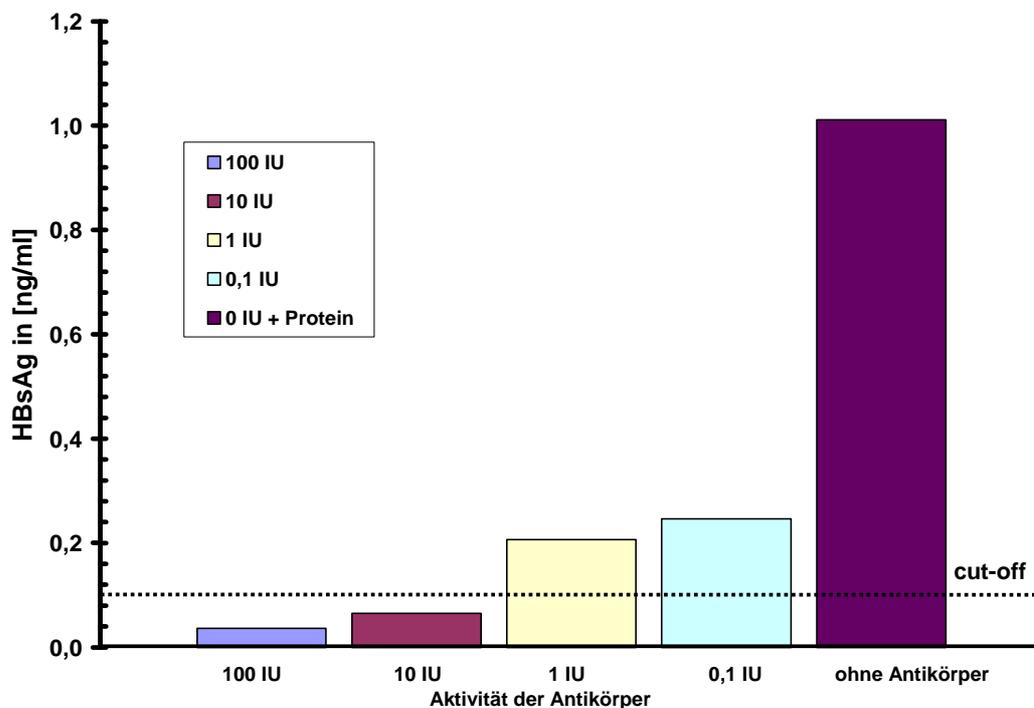


Abb. 21: HBsAg-Produktion zum Zeitpunkt T 12 bei Inhibition mit Antikörpern der Natriumsulfatausfällung des Serums ID 10 66 757. Der Spender hatte an HBV gelitten und wurde im weiteren mit dem Impfstoff Engerix geboostert. Eichung der Aktivität auf anti-HBs.

Man erkennt auf der Abbildung 21 sehr gut, dass die Antikörper dieser Serumausfällung die Infektion mit HBV sehr viel besser inhibieren als die anti-HBs Antikörper des Serums ID 10 66 834. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei ID 10 66 757 um ein Serum eines Patienten, der bereits einmal mit HBV infiziert gewesen ist. Das hat die Konsequenz, dass die Antikörperausfällung hier neben anti-S möglicherweise auch anti-präS1 und anti-präS2 enthält. Folglich ergibt sich eine Inhibition der Infektion sowohl bei 100 IU als auch noch bei 10 IU, was im Vergleich mit Abbildung 20 direkt ins Auge fällt. Selbst mit 0,1 IU ist noch eine entsprechende Inhibition erkennbar. Weiterhin soll an dieser Stelle der Infektionsverlauf anhand eines weiteren Serums dargestellt werden. Dieses Serum

(ID 10 61 908) stammt von einem Spender, der mit dem Engerix-Impfstoff geimpft worden ist.

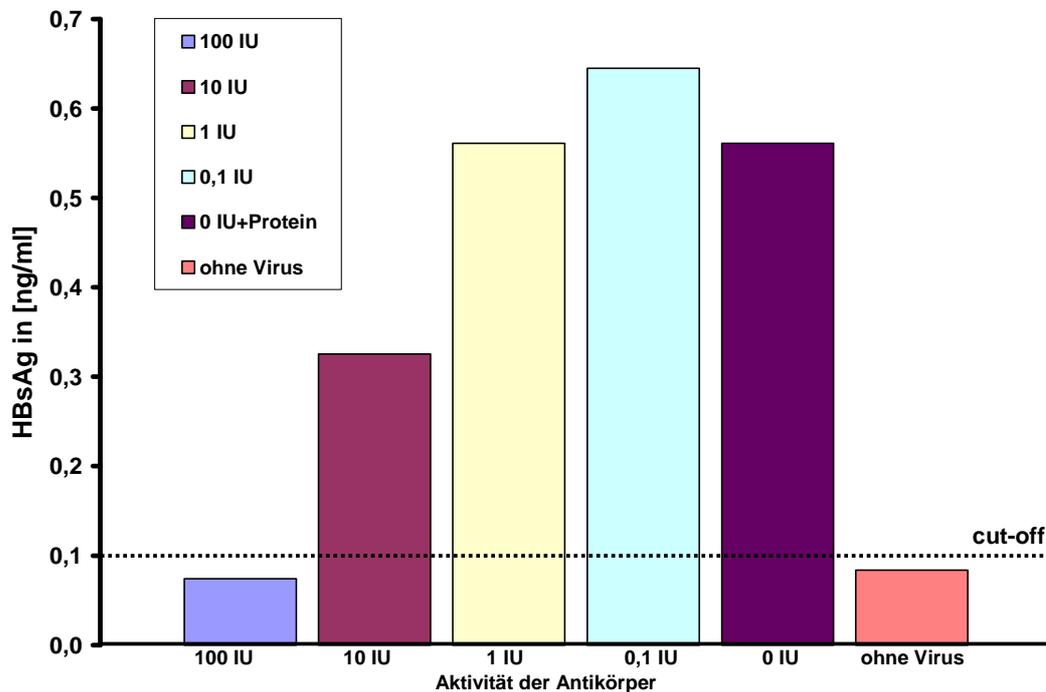


Abb. 22: HBsAg-Produktion bei Inhibition der Infektion mit unterschiedlichen Antikörpermengen aus der Antikörperausfällung des Serums ID 10 61 908 zum Zeitpunkt T 12 der Infektion. Das Serum stammt von einem Patienten, der mit Engerix geimpft worden ist.

Das bei der Abbildung 22 verwendete Serum enthielt lediglich Antikörper gegen die S-Domäne des Hepatitis-Virus. Im Vergleich zur Abbildung 21 ergibt sich wiederum ein geringeres Potential der Inhibition der Infektion, was damit quasi kongruent zu den Ergebnissen ist, die in der Abbildung 20 dargestellt wurden. An dieser Stelle wäre es hilfreich, wenn man ein Serum zur Verfügung hätte, das sicher neben anti-S auch anti-präS1 enthält. Glücklicherweise stand für die weiteren Versuche ein solches Serum zur Verfügung (ID 155), welches von einem Spender stammte, der sowohl mit einer Vaccine gegen die S-Domäne geimpft worden war, wie mit einem Impfstoff der Firma Berna-Tech, der ebenfalls anti-präS1 Antikörper induziert. Aufgrund früherer Untersuchungen war bekannt (Stahl, 2001), dass die Natriumsulfatausfällung sowohl anti-S, als auch anti-präS1 beinhaltet.

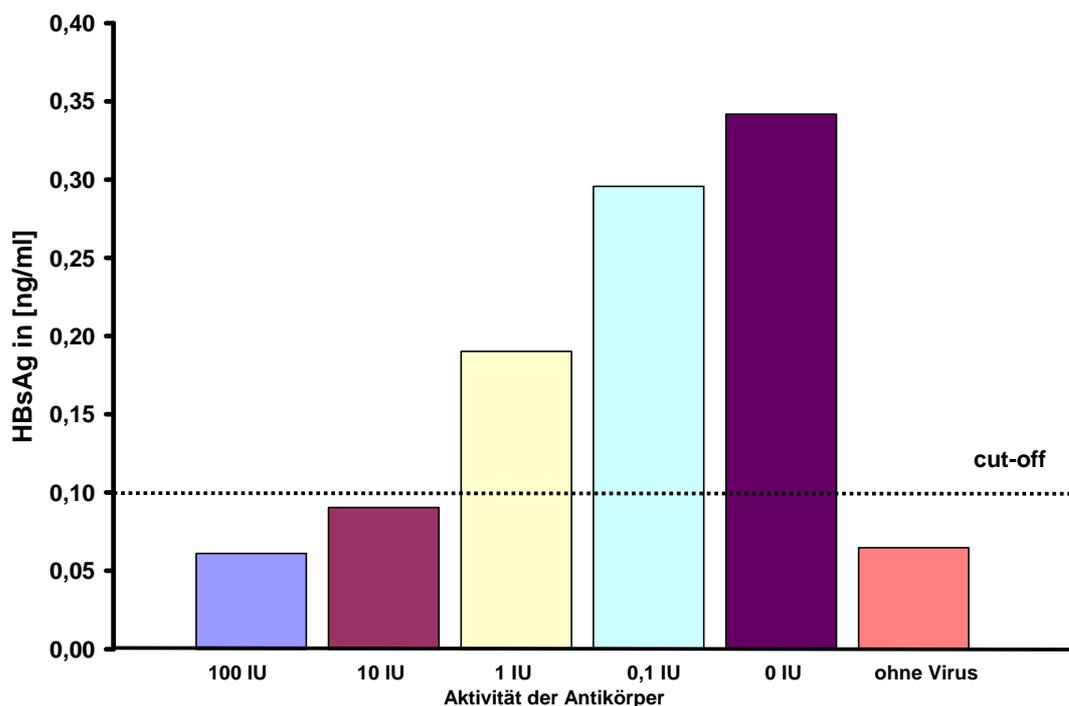


Abb. 23: HBsAg-Produktion zum Zeitpunkt T 12 bei Inhibition der Infektion mit unterschiedlichen Mengen an Antikörpern aus der Ausfällung des Serums ID 155. Dabei wurden die Antikörper wiederum auf die Aktivität an anti-HBs geeicht. Das Serum enthielt wahrscheinlich sowohl anti-S, als auch anti-präS1.

Die Abbildung zeigt, dass auch die Neutralisation mit ID 155 einen ähnlich großen Erfolg hat, wie die Inhibition mit dem Serum ID 10 66 757, das von einem Spender stammt, der eine Infektion mit HBV durchgemacht hat. Abbildung 23 läßt erkennen, dass selbst noch bei 10 IU eine vollständige Inhibition gegen Infektion mit HBV gegeben ist.

Das unterstreicht die bisherigen Ergebnisse. Im folgenden soll mit einer weiteren Grafik ein synaptischer Blick auf die bisherigen Ergebnisse ermöglicht werden.

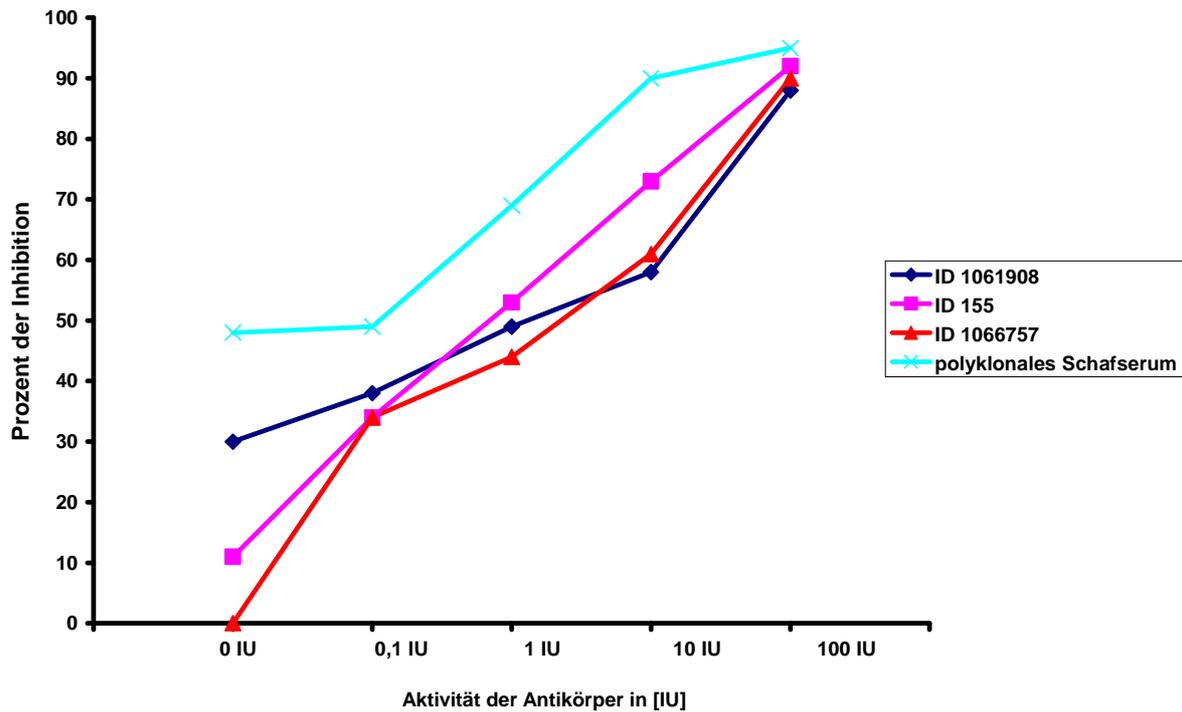


Abb. 24: Die Abbildung zeigt den Erfolg der Inhibition der Infektion mit den unterschiedlichen Antikörpern bei verschiedenen Aktivitäten. Bei sehr hohen Aktivitäten inhibieren alle Antikörper. Bei niedrigeren Aktivitäten sieht man deutliche Unterschiede. Zu den verschiedenen Antikörpern siehe Text.

Auf der Abbildung 24 erkennt man folgendes: Die Inhibition der Infektion gelingt nahezu komplett bei Verwendung von sehr hohen Konzentrationen der unterschiedlichen Antikörper. Das polyklonale Schafserum ist ein ausgefälltes Serum, das Antikörper gegen alle drei Oberflächendomänen des HBV enthält. Durch mehrmalige Boosterungen erhielt man in diesem Serum sehr hohe Konzentrationen an anti-HBs, wie wahrscheinlich auch an anti-präS1 und anti-präS2. Die Inhibition der Infektion mit dieser Serumausfällung ist sehr gut. Die schlechteste Inhibition ergab sich bei 10 IU mit dem Serum ID 10 61 908. Dieser Antikörper enthielt lediglich anti-S, was einen geringen Neutralisationserfolg ergab. In diesem Spannungsfeld lagen die Proben ID 155 und ID 10 66 757. Beide Serumausfällungen inhibieren die Infektion im interessanten mittleren Aktivitätsbereich von 10 IU besser als lediglich ein Serum mit Antikörpern der Klassen anti-S.

5. Diskussion

Bisher standen für *in vitro* Infektionsversuche mit HBV lediglich primäre humane Hepatozyten zur Verfügung (Gripon et al., 1988), obwohl schon mehrere humane Hepatomzelllinien etabliert worden waren. Allerdings war keine dieser Zelllinien für eine Infektion mit HBV suszeptibel. Gripon et al. beschrieben 2002 die Zelllinie HepaRG, die erstmals auch für Infektionsexperimente mit HBV und HDV *in vitro* geeignet ist (Gripon et al., 2002). Diese Zelllinie wurde aus einem Lebertumor einer weiblichen Patientin, die unter einer chronischen Hepatitis-C Infektion litt, gewonnen. Der Hauptnachteil dieser Zelllinie ist, dass sie während der Wachstumsphase der Zellen nicht für eine HBV Infektion suszeptibel ist. Erst nach mindestens zwei Wochen Kultur können die Zellen mit HBV infiziert werden, allerdings nur unter Nutzung von DMSO- und Hydrokortison- haltigem Medium. Darüber hinaus können hohe Infektionsraten nur in Anwesenheit hoher Konzentrationen des Fusionspromotors PEG während der Infektion gefunden werden (Gripon et al., 2002; Jaoude et al., 2005; Gripon et al., 2005). Da diese Zelllinie nicht zur Verfügung stand, wurden die Infektionsexperimente mit primären Tupaia-Hepatozyten durchgeführt, die ebenfalls für eine HBV Infektion *in vitro* suszeptibel sind (Köck et al., 1996). Außerdem benötigen primäre Tupaia-Hepatozyten-Kulturen kein DMSO- oder PEG- haltiges Medium für eine optimale Infektion. Tupaia-Hepatozyten sind besser verfügbar und zeigen eine weitaus geringere Heterogenität und höhere Suszeptibilität für eine Infektion mit HBV. Darüber hinaus konnten Resultate der *in vitro* Studien *in vivo* verifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem *in-vitro*-Modell (Tupaia-Hepatozyten-Infektionsmodell) der Infektions- bzw. Inhibitionserfolg bei Neutralisation von HBV mit unterschiedlichen Antikörpern untersucht werden. Le Seyec et al. konnten unter Verwendung humaner Hepatozyten und rekombinantem HBV mit definierten Mutationen in der präS1-Region zeigen, dass die AS 3-77 der präS1-Domäne essentiell für eine Infektion sind (Le Seyec et al., 1999; Neurath et al., 1986). Unter Verwendung myristoylierter HBV präS1-Peptide variabler Länge, konnte die HBV-Binderegion näher charakterisiert werden (Glebe et al., 2005; Urban et al., 2005). Die Daten zeigen, dass die ersten 8 AS von präS1 (19 AS bei Genotyp A) für eine Infektion entbehrlich sind, die AS 9-18 sind essentiell, die AS 19-28 sind wiederum entbehrlich und die AS 29-48 verstärken die Bindung und vermögen eine Infektion zu inhibieren. Interessanterweise inhibiert der monoklonale Antikörper MA18/07, der

gegen die AS 20-27 der präS1-Region gerichtet ist (Heermann et al., 1984; Sominskaya et al., 1992), die Infektion im Tupaia-Infektions-Modell (Glebe et al., 2003). Dieses konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Kap. 4.6). Der Befund ist erstaunlich, da diese Region offensichtlich nicht für einen Infektionserfolg essentiell notwendig ist. Ähnlich gute Neutralisationserfolge ergaben sich in der vorliegenden Arbeit (siehe Kap. 4.7) auch bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers Q19/10, der präferentiell gegen die N-glykolysierte präS2-Domäne des MHBs von HBV gerichtet ist (Glebe et al., 2003).

C20/2 ist ein konformationsabhängig gegen die α -Determinante der S-Domäne gerichteter monoklonaler Antikörper. Dieser Antikörper zeigt also keine Reaktion gegen die Bindedomäne des Virus. Dennoch konnte gezeigt werden, dass auch C20/2 die Infektion ebenfalls effizient zu inhibieren vermag (siehe Kap. 4.8; Glebe et al., 2003). Bei der derzeit üblichen HB-Impfung ist die infektiösitätsneutralisierende, schützende Wirkung des Antikörpers gegen HBV-spezifische, subtypenunabhängige Oberflächenepitope im SHBs-Protein die Basis (Iwarson et al., 1985; Ogata et al., 1999; Shearer et al., 1998). Somit kann die Neutralisation mit C20/2 am ehesten mit dem derzeit üblichen Impfstoff verglichen werden. Interessanterweise ist die Neutralisation mit C20/2 allein nicht potenter als bei Verwendung von Q19/10 oder MA18/07. Könnten also *in vivo* im Serum gleich hohe Konzentrationen von inhibierenden Antikörpern gegen präS1 bzw. präS2 erreicht werden wie Konzentrationen an anti-S, so liegt die Vermutung nahe, dass ein ähnlich potenter Infektionsschutz erreicht werden könnte. Überdies legt die Titrationsreihe der Infektionsinhibition mit MA18/07 (siehe Kap. 4.9) nahe, dass schon sehr geringe Konzentrationen an Antikörpern gegen die präS1-Domäne eine Infektion verhindern könnten. Überdies sind Mutationen in den gruppenspezifischen SHBs-Epitopen bekannt, vor allem die Mutation des Glycins in Position 145 des SHBs-Proteins nach Arginin (G145R) (Cooreman et al., 2001). Darüber hinaus stellt sich das Problem der Virusmutationen derzeit noch viel dringender als früher, da insbesondere unter antiviraler Therapie mit reversen Transkriptasehemmern (z.B. Lamivudin) oder bei Reaktivierung einer HBV Infektion nach Chemotherapie, gehäuft Virusmutationen auftreten. Neueren Untersuchungen zu Folge könnten Varianten bei Infektion von Tupaia-Hepatozyten daneben zu Apoptose in Hepatozyten und damit zu einem ernsthafterem Krankheitsverlauf führen (Baumert et al., 2005). Zwar scheint ein präexistenter konventioneller Impfschutz mit anti-S auch vor Escape-Mutanten zu

schützen, dennoch sind diese vermehrungs- und übertragungsfähig. Umso mehr sollte in Hinblick auf eventuell neu auftretende Virusmutanten ein Augenmerk auf einen Kombinationsimpfstoff gelegt werden, der sowohl anti-S, als auch anti-präS Antikörper aktiv induziert. In diesem Zusammenhang sei noch auf eine Arbeit von Kuroda et al. verwiesen, die bereits Anfang der 90er Jahre zeigte, dass ausreichend hohe Titer an anti-präS2 mit Impfstoffen der dritten Generation erreicht werden konnten (Kuroda et al., 1991). Die Inhibition der Infektion durch Kombination von anti-präS1 und anti-S ergibt aber bei niedrigeren Gesamtkonzentrationen einen besseren Infektionsschutz als eine alleinige Nutzung von anti-präS1 (siehe Kap. 4.10). Dieses mag auch mit der noch weitgehend ungeklärten Virus-Zell-Interaktion zusammenhängen. Die unbestritten essentielle Bedeutung der präS1-Sequenz 2-48 vermittelt wohl die Bindung des Virus an die Zellen, wohingegen die S-Domäne bei späteren Schritten der Infektion eine Rolle spielt (Glebe et al., 2005).

Insgesamt ist aber eine Kombination von anti-S, anti-präS1 und anti-präS2 vermutlich am potentesten, um eine Infektion zu verhindern, was die Versuche mit Antikörpern aus dem polyklonalen Schafserum nahe legen (siehe Kap. 4.11).

An dieser Stelle soll daneben noch kurz auf Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verwiesen werden, die unter Nutzung von Antikörpern gegen die S-Domäne entstanden. Die S-Domäne enthält 8 Cysteinreste und wird durch inter- und intramolekulare Disulfidbrücken (Mangold et al., 1993; Mangold et al., 1995) in eine komplexe dreidimensionale Struktur überführt (Gilbert et al., 2005). Auf die Inhibition der Infektion durch Nutzung des monoklonalen Antikörpers C20/2 wurde bereits verwiesen (siehe Kap. 4.8). Daneben gelang ebenfalls mit den Antikörpern RFHBs 1 (gegen AS 124-137) und RFHBs 7 (gegen AS 139-147) eine Neutralisation (siehe Kap. 4.12). Auch hier korrelieren die Ergebnisse des Tupaia-Hepatozyten-Infektionsmodells mit *in vivo* Untersuchungen dieser Antikörper bei Primateninfektion (Iwarson et al., 1985; Carman et al., 1996). Interessanterweise scheint die Aminosäuresequenz 139-147 für die Neutralisation eine entscheidendere Rolle zu spielen, als die Sequenz 124-137. Dieses legt die bessere Inhibition der Infektion bei Verwendung des Antikörpers RFHBs 7 nahe. Wichtig ist die Beobachtung, dass Antikörper, die mittels des Standardimpfstoffes Engerix induziert wurden, ein HBV des Genotyps D sicher neutralisieren konnten. Der Impfstoff enthält die S-Sequenzen des Genotyps A. Mit Plasmaimpfstoff war schon in den 70iger Jahren gezeigt worden, dass ein HBV-Subtyp als Impfstoff gegen die anderen HBV-Subtypen schützt (wenn

auch schwächer), aber mit den rekombinanten Impfstoffen konnte dieses bisher nicht nachgewiesen werden.

Eine ähnliche Fragestellung ergibt sich bei der Neutralisation des Virus mit Fab-Fragmenten der monoklonalen Antikörper MA18/07 und C20/2. Bei ersterem Antikörper stellt man eine etwas bessere Inhibitionsfähigkeit des kompletten Antikörpers gegenüber den Fab-Fragmenten fest (siehe Kap. 4.13). Bei C20/2 inhibieren die Fab-Fragmente sogar besser, als die kompletten Antikörper. Es bleibt festzuhalten, dass ebenfalls eine Neutralisation des HBV mit Fab-Fragmenten möglich ist. Eine Möglichkeit für die bessere Inhibition der Fab-Fragmente bei C20/2 ist eventuell die grössere Unabhängigkeit von der Konformation. Diese scheint, wie auch die Arbeit von Glebe et al. (2005) nahe legt, vor allem bei der präS1-Domäne eine herausragende Rolle einzunehmen. Die Ergebnisse der Inhibition mit spezifischen Antikörpern gegen präS1 (siehe Kap. 4.14) zeigen nochmals die vergleichbare Inhibitions Potenz von Antikörpern gegen die S-Domäne (H651) und gegen die präS1-Domäne (H762) bei identischen Konzentrationen. Hierbei handelt es sich um polyklonale Antikörper, was beweist, dass auch mit diesen eine Neutralisation effizient möglich ist. Der nächste Schritt bestand darin die Inhibitions Potenz polyklonaler humaner Antikörper zu untersuchen. Die Ergebnisse (siehe Kap. 4.15) zeigen, dass auch eine Inhibition der Infektion mit den durch die Natriumsulfatausfällung gewonnenen Antikörperlösungen möglich ist. Hier erkennt man, dass IgG, das lediglich anti-S enthält (ID 106 19 08), die schwächste Neutralisationspotenz besitzt. Interessanterweise hat die Ausfällung eines Serums (ID 155), das neben anti-S auch anti-präS1 besitzt, eine wesentlich bessere Neutralisationspotenz (siehe Kap. 4.15). In der Promotion von Benno Stahl (2001) war es gelungen, in diesem und einigen weiteren Seren mittels Western Blot anti-präS nachzuweisen, jedoch nur unter Verwendung eines in E.coli exprimierten PräS-Polypeptids. Natürliches LHBs war dagegen nicht geeignet. Auch das hier verwendete myristylierte PräS1-Peptid reagierte nicht. Möglicherweise verhindert die Myristylierung die Reaktivität.

Bei Verwendung von humanen polyklonalen Antikörpern ergab sich wie bei den monoklonalen Antikörpern eine bessere Inhibition, wenn mehrere Antikörperspezifitäten gegen HBV in Kombination eingesetzt wurden. Die sehr niedrige Infektionsrate im Tupaia-Infektionssystem deutete auf die Wirksamkeit von anti-präS1 Antikörpern im verwendeten Serum hin. Diese *in vitro* Ergebnisse korrelieren mit Ergebnissen von Neurath et al., der schon vor 20 Jahren *in vivo*

Experimente durchführte, die die Rolle von anti-präS1 (AS 12-47) Antikörpern zur Infektionsinhibition unterstreichen. Verwiesen werden soll ausserdem auf eine Arbeit (Neurath et al., 1989), in der synthetisch im Kaninchen hergestellte Antikörper gegen die präS-Region (AS 120-145) benutzt wurden, um eine Infektion bei Primaten (Schimpansen) zu verhindern. Dazu wurde das Virus zunächst mit den synthetisch hergestellten Antikörpern *in vitro* vorinkubiert und anschließend den Schimpansen injiziert. Alle serologischen Tests auf eine HBV Infektion wie infektionsassoziierte Antigene (HBsAg, HBeAg) oder Antikörper waren negativ. Ebenfalls waren Laborparameter (ALAT, ASAT) und eine Leberbiopsie normal, so dass von einer Neutralisation des Virus ausgegangen werden konnte (Neurath et al., 1986). Die Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Q19/10 bestätigt diese Ergebnisse, da Q19/10 an die AS 120-130 im PräS bindet. All dieses unterstreicht die Argumente, die die Überlegenheit einer Impfstrategie mit S, präS1 und präS2 Antigenen im Vergleich zur herkömmlichen Impfpraxis mit einfachen S-Impfstoffen belegen. Im Hinblick auf die wachsende Zahl HBV-infizierter Menschen sollte die bisherige Impfpraxis mit dem konventionellen Impfstoff nochmals neu überdacht werden.

6. Zusammenfassung

Für 20 Jahre waren primäre humane Hepatozytenkulturen das einzige *in vitro* System um Infektionen mit HBV zu studieren. In dieser Arbeit wurde die Inhibition einer Infektion mit unterschiedlichen Antikörpern gegen HBV in einem primären Zellkultur-System mit Hepatozyten von *Tupaia belangeri* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass monoklonale Antikörper gegen die drei Oberflächenstrukturproteine des HBV (LHBs, MHBs, SHBs) jeweils allein oder in Kombination eine Infektion inhibieren können. Auch die Verwendung von Antikörperfragmenten (Fab-Fragmente) dieser Antikörper konnte die Infektion effizient inhibieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass humane polyklonale Antikörper ebenfalls in der Lage sind, eine Infektion mit HBV zu verhindern. Insbesondere bei gleichzeitiger Verwendung von Antikörpern gegen die S-, präS1- und präS2-Domäne konnte eine bessere Inhibition beobachtet werden, als bei alleiniger Nutzung von Antikörpern gegen die S-Domäne. In Anbetracht einer steigenden Anzahl von escape-Mutanten unter antiviraler Therapie mit reversen Transkriptasehemmern (wie z.B. Lamivudin) oder bei Reaktivierung einer Infektion mit HBV nach Chemotherapie, sollte die bisherige Impfpraxis neu überdacht werden. Die derzeitigen gebräuchlichen Impfstoffe enthalten lediglich das SHBs und induzieren einzig Antikörper gegen die S-Domäne. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass ein Kombinationsimpfstoff mit Antikörpern sowohl gegen die S-Domäne, als auch gegen die präS-Domänen weitaus effektiver wäre.

7. Summary

For over 20 years, primary human hepatocytes were the only possible *in vitro* system for studying HBV infections. We checked different antibodies against HBV using differentiated primary hepatocytes from *tupaia belangeri* to see if inhibition of infection is possible. It could be shown that monoclonal antibodies against the surface proteins of HBV (LHBs, MHBs, SHBs) could stop infection solely or in combination. Furthermore, Fab-fragments of monoclonal antibodies could also neutralize infectivity efficiently. In addition to these results we showed that also human polyclonal antibodies could avert infection of tupaia hepatocytes. Especially combination of antibodies against S-, preS1- and preS2-domain led to excellent results of inhibition. In view of escape mutants, frequently arising under antiviral therapy with reverse transcriptase inhibitors (e.g. lamivudine) or after reactivation of HBV after

chemotherapy, the use of current vaccination should be reconsidered again. The current vaccination against HBV contains only SHBs and induces only antibodies against the S-domain. The results suggest the advantage of combination of anti-S, anti-preS1 and anti-preS2 antibodies against the current anti-S vaccination.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ag	Antigen
AK	Antikörper
α (anti-)	Antikörper gegen
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ASHV	Arctic ground squirrel Hepatitis Virus
Asn	Asparagin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Celsius
ca.	circa
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	Und andere Autoren
etc.	et cetera

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
cccDNA	covalently closed circular DNA
GE	Genomäquivalente
Gly	Glycin
gp	Glykoprotein
GSHV	Ground squirrel Hepatitis Virus
h	Stunde
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HGM	Hepatocyte Growth Medium
HHBV	Heron Hepatitis B Virus
ID	Identifikationsnummer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAP	Leberacetonepulver
LDL	Low density lipid
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
μ	Mikro
M	Molarität (mol/l Lösung)
m	milli
mAK	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHBs	Middle Hepatitis B surface protein
min	Minute

mind.	Mindestens
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
myr	Myristoyl-
n	nano
N-	Amino-
NaN ₃	Natriumazid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
nm	Nanometer
oct	octanyl-
OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
o/n	über Nacht
ORF	Open Reading Frame
p	pico
PAGE	Polyacrylamid- Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHH	primäre humane Hepatozyten
p.i.	<i>post infectum</i>
POD	Peroxidase
PTHs	primäre Tupaia-Hepatozyten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHBs	Small Hepatitis B surface protein

Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
TNE	Tris- Natrium- EDTA
Tup	<i>Tupaia belangeri</i>
v.a.	vor allem
w/o	ohne
WHO	World Health Organization
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WMHBV	Woolly monkey Hepatitis B Virus
z.B.	zum Beispiel

8. Literatur

Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. und Knowles, B.B. (1979). *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.* Nature 282: 615-616.

Aldrich, C.E., Coates, L., Wu, T.T., Newbold, J., Tennant, B.C., Summers, J., Seeger, C. und Mason, W.S. (1989). *In vitro infection of woodchuck hepatocytes with woodchuck hepatitis virus and ground squirrel hepatitis virus.* Virology 172: 247-252.

Almeida, J.D., Rubenstein, D. und Scott, E.J. (1971). *New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis.* Lancet 2: 1225-7.

Andre, F. (2000). *Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East and Africa.* Vaccine 18 Suppl 1, S 20-2.

Aufiero, B. und Schneider, J. (1990). *The hepatitis B virus X-gene product transactivates both RNA polymerase II and III promoters.* EMBO J. 9(2): 497-504.

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.

Baumert, T.F., Yang, C., Schurmann, P., Kock, J., Ziegler, C., Grulich, C., Nassal, M., Liang, T.J., Blum, H.E., von Weizsäcker, F. (2005). *Hepatitis B virus mutations associated with fulminant hepatitis induce apoptosis in primary tupaia hepatocytes.* Hepatology 41 : 247-56.

Beasley, R.P. und Hwang, L.Y. (1984). *Epidemiology of the hepatocellular carcinoma.* In: Vyas, G.N., Dienstag, J.L. und Hoofnagle, J.H. (Hrsg.). *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Grune & Stratton, Orlando: 209-224.

Beasley, R.P., Lin, C.C., Chien, C.S., Chen, C.J. und Hwang, L.Y. (1982). *Geographic distribution of HBsAg carriers in China.* Hepatology 2: 553-556.

Böttcher, B., Wynne, S.A. und Crowther, R.A. (1997). *Determination of fold of the core protein of the hepatitis B virus by electron cryomicroscopy.* Nature 386: 88-91.

Bosch, V., Bartenschlager, R., Radziwill, G. und Schaller, H. (1988). *The duck Hepatitis B-virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5' end of the viral DNA minus strand.* Virology 166: 475-485.

Bruss, V. und Gerlich, W.H. (1988). *Formation of transmembraneous hepatitis B e antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein.* Virology 163: 268-275.

Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E. und Galle P.R. (1996). *Myristoylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity.* Virology 218: 396-399.

Blumberg, B.S., Gerstley, B.J., Hungerford, D.A., London, W.T und Sutnik, A.I. (1967). *A serum antigen (Australia antigen) in Down 's syndrome, leukemia, and hepatitis.* Ann Intern Med 66: 924-31.

Budkowska, A., Bedossa, P., Groh, F., Louise, A., Pillot, J. (1995). *Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain.* J Virol; 69: 840-8

Carman, W.F., Zanetti, A.R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckermann, A.J., Thomas, H.C. (1990). *Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus.* Lancet 336, 325-9.

Carman, W.F., Trautwein, C., van Deusern, F.J., Colman, K., Dornan, E., McIntyre, G., Waters, J., Kliem, V., Muller, R., Thomas, H.C., Manns, M.P. (1996). *Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis.* Hepatology 24: 489-93

Chen, H.S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H. und Miller, R.H. (1993). *The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks.* J. Virol. 67: 1218-1226.

Chisari, F.V. und Ferrari, C. (1995). *Hepatitis B virus immunopathogenesis.* Annu. Rev. Immunol. 13: 29-60.

Chulanov, V.P., Shipulin, G.A., Schaefer, S und Gerlich, W.H. (2003). *Kinetics of HBV DNA and HBsAg in acute hepatitis B patients with and without coinfection by other hepatitis viruses.* J. Med. Virol. 69: 313-323.

Conway, J.F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P.T., Stahl, S.J. und Steven, A.C. (1997). *Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy.* Nature 386: 91-94.

Cooper, A., Paran, N. und Shaul, Y. (2003). *The earliest steps in hepatitis B virus infection.* Biochimica et Biophysica Acta 1614: 89-96.

Cooreman, M.P., Leroux-Roels, G. und Paulij, W.P. (2001). *Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen.* J Biomed. Sci. 8: 237-47.

Courouce-Pauty, A.M., Plancon, A., Soulier, J.P. (1983). *Distribution of HBsAg subtypes in the world.* Vox Sang 44, 197-211.

- Dane, D.S., Cameron, C.H. und Briggs, M. (1970).** *Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis.* Lancet: 695-8.
- Delius, H., Gough, N.M., Cameron, C.H., Murray, K. (1983).** *Structure of the Hepatitis B Virus Genome.* J. Virol 47: 337-343
- De Meyer, S., Gong, Z.J., Hertogs, K., Depla, E., van Pelt, J.F., Roskams, T., Maertens, G. und Yap, S.H. (2000).** *Influence of the administration of human annexin V on in vitro binding of small hepatitis B surface antigen to human and to rat hepatocytes and on in vitro hepatitis B virus infection.* J Viral Hepat. 7(2): 104-14.
- Doerr, H.W. und Gerlich, W.H. (2002).** *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder.* Thieme Verlag, Stuttgart, Kap.26.
- Doms, R.W. und Helenius, A. (1986).** *Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acid treatment.* J Virol. 60(3): 833-9.
- Faruqi, A.F., Roychoudhury, S., Greenberg, R., Israel, J. und Shih, C. (1991).** *Replication- defective missense mutations within the terminal protein and spacer/intron regions of the polymerase gene of human hepatitis B virus.* Virology 183: 764-768.
- Fernholz, D., Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. und Will, H. (1993).** *Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier.* Virology 194: 137-148.
- 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, Ch. 4, 5
- Fujisawa, Y., Kuroda, S., Van Eerd, P.M., Schellekens, H. und Kakinuma, A. (1990).** *Protective efficiency of a novel hepatitis B vaccine consisting of M (pre S2 + S) protein particles (a third generation vaccine).* Vaccine. 8: 192-8.
- Galle, P.R., Hagelstein, J., Kommerell, B., Volkmann, M., Schranz, P. und Zentgraf, H.W. (1994).** *In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus.* Gastroenterology 106: 664-673.
- Ganem, D. und Varmus, H.E. (1987).** *The molecular biology of hepatitis B viruses.* Ann. Rev. Biochem. 56: 651-693.
- Gavilanes, F., Gonzales, J.M. und Peterson, D.L. (1982).** *Structure of hepatitis B surface antigen.* J. Biol. Chem. 257: 7770- 7777.
- 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.
- Gerlich, W.H. und Thomssen, R. (1999).** *The viruses of hepatitis.* In: Oxford textbook of clinical hepatology. Birchner, J. Benhamou, J.P., McIntyre, N., Rizetto, M. und Rodes. J. (Hrsg.), Oxford Medical Publications, 2nd edition, Oxford University Press. Vol. I: 828-870.

- Gerlich, W.H. und Thomssen, R. (1975).** *Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume.* Develop. Bio. Standard. 30: 78-87.
- Gerlich, W.H., Goldmann, U., Müller, R., Stibbe, W. und Wolf, W. (1982).** *Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase.* J. Virol. 42: 761-766.
- Gerlich, W.H., Uy, A., Lambrecht, F., Thomssen, R. (1986).** *Cutoff levels of Immunglobulin M Antibody against Viral Core Antigen for Differentiation of Acute, Chronic, and Past Hepatitis B Virus Infections.* J. Clinical Microbiology 24: 288-293
- Gibbons, D.L., Reilly, B., Ahn, A., Vaney, M.C., Vigouroux, A., Rey, F.A. und Kielian, M. (2004).** *Purification and crystallization reveal two types of interactions of the fusion protein homotrimer of Semliki Forest virus.* J Virol. 78(7): 3514-23.
- Gilbert, R.J., Beales, L., Blond, D., Simon, M.N., Lin, B.Y., Chisari, F.V., Stuart, D.I., Rowlands, D.J. (2005).** *Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral.* Proc Natl Acad Sci USA; 102: 14783-8
- Glebe, D. und Gerlich, W.H. (2004).** *Study of the endocytosis and intracellular localization of subviral partikeles of hepatitis B virus in primary hepatocytes.* In: Robert K. Hamataka, Johnson Y.N. Lau (Hrsg). Hepatitis B and D Protocols. Methods in molecular medicine. 2:143-151, Humana Press.
- 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.* J. Virol. 77: 9511-9521.
- Glebe, D., Urban, S., Knoop, E.V., Cag, N. Krass, P., Grün, S., Bulavaite, A. Sasnauskas, K. und Gerlich, W.H. (2005).** *Mapping of the hepatitis B virus attachment site by infection-inhibiting preS1 lipopeptides using primary Tupaia hepatocytes.* Gastroenterology. 2005 Jul; 129 (1): 234-45
- Gough, N.M. (1983).** *Core and E antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs.* J. Mol. Biol. 165: 683-699.
- Gripon, P., Diot, C. und Guguen-Guillouzo, C. (1993).** *Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration.* Virology 192: 534-540.
- Gripon, P., Diot, C., Theze, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C. und Guguen-Guillouzo, C. (1988).** *Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide.* J. Virol 62: 4136-4143.
- Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. und Guguen-Guillouzo, C. (1995).** *Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity.* Virology 213: 292-299.

- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. und Guguen-Guillouzo, C. (2002).** *Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15655-15660.
- Gripon, P., Cannie, I. und Urban, S. (2005).** *Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein.* J Virol. 79(3):1613-22.
- Harrisons Innere Medizin (Band 1 und 2);** herausgegeben von Manfred Dietl, Joachim Dudenhausen, Nobert Suttorp, McGraw-Hill
- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H. und Gerlich, W.H. (1984).** *Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence.* J. Virol. 52: 396-402.
- Heermann, K.H., Waldeck, F. und Gerlich, W.H. (1988).** *Interaction between native human serum and the preS2 domain of hepatitis B virus surface antigen.* in: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, pp.697-700. Edited by A.J.Zuckerman. New York: Alan R.Liss.
- Heinz, D., Peters, M., Prange, R., Gerken, G. und Rose-John, S. (2001).** *Possible role of human interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in hepatitis B virus infection.* J Viral Hepat. 2001 May;8(3): 186-93.
- Hilleman, M.R., McAleer, W.J., Buynak, E.B., McLean, A.A. (1983).** *Quality and safety of human hepatitis B vaccine.* Dev Biol Stand 54:3-12.
- 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.
- Ishikawa, T., Kuroki, K., Lenhoff, R., Summers, S. und Ganem, D. (1994).** *Analysis of the binding of a host cell surface glycoprotein of the preS protein of duck hepatitis B virus.* Virology. 202: 1061-1064.
- Iwarson, S., Tabor, E., Thomas, H.C., Goodall, A., Waters, J., Snoy, P., Shih, J.W., Gerety, R.J. (1985).** *Neutralization of hepatitis B virus infectivity by a murine monoclonal antibody: an experimental study in the chimpanzee.* J. Med. Virol. 16: 89-96
- Janeway, C. A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik (2002).** *Immunologie.* Spektrum Verlag, New York und London:
- Jaoude, G.A., Sureau, C. (2005).** *Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus.* J Virol; 79: 10460-6
- Jungers, P., Chauveau, P., Courouce, A.M., Abbassi, A. Devillier, P. und Marie, F.N. (1994).** *Recombinant vaccine and extracting vaccine against hepatitis B in patients with kidney insufficiency. A comparative study.* Presse Med. 23: 277-80.
- Gerlich, W.H. und Kann, M. (2005).** *Hepatitis B.* In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. BWJ Maley and Meulen eds, Vol.2, 1226-1268.

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.

Kao, J.H., Wu, N.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S. (2000). *Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy.* J. Hepatol 33, 998-1002.

Köck, J., Baumert, T.F., Delaney, W.E., Blum, H.E. und Weizsäcker F.v. (2003). *Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the de novo hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes.* Hepatology 38: 1410-18.

Köck, J. und Glebe, D. (2005). *Hepatitis B virus infection of primary tupaia hepatocytes.* in: Weizäcker, F.v., Roggendorf, M. (eds): Models of viral Hepatitis. Monogr Virol. Basel, Karger, 2005; Vol. 25: 96-105.

Köck, J., Nassal, M., MacNelly, S., Baumert, T.F., Blum, H.E. und Weizsäcker, F.v. (2001). *Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus.* J. Virol. 75: 5084-5089.

Kuroda, S., Fujisawa, Y., Iino, S., Akahane, Y. und Suzuki, H. (1991). *Induction of protection level of anti-pre S₂ antibodies in humans immunized with a novel hepatitis B vaccine consisting of M (pre S₂ + S) protein particles (a third generation vaccine).* Vaccine. 9: 163-9.

Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F. und Ganem, D. (1995). *Gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family.* J. Biol. Chem.270: 15022-15028.

Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. 227(5259): 680-5.

Landers, T.A., Greenberg, H.B. und Robinson, W.S. (1977). *Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction.* J. Virol. 23: 368-376.

Legler, K., Strohmeyer, H., Ritter, S., Gerlich, W.H., Thomssen, R. (1983). *Kinetics, subtype specificity and immunoglobulin class of anti-HBs induced by hepatitis B vaccine.* Dev. Biol. Stand. 54: 179-89

Le Seyec, J., Chouteau, P., Canine, I., Guguen-Guillouzo, C. und Gripon, P. (1998). *Role of the pre-S₂ domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity.* J. Virol. 72: 5573-5578.

Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C. und Gripon, P. (1999). *Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S₁ domain.* J Virol. 73(3): 2052-7.

Li, Q., Ding, M. und Wang, H. (1995). *The infection of hepatitis D virus in adult Tupaia.* Zhonghua Yi Xue Za Zhi 75(10): 611-3, 639-40. (Artikel in Chinesisch).

- Lindh, M., Hannoun, C., Dhillon, A.P., Norkrans, G., Horal, P. (1999).** *Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers.* J Infect Dis 179, 775-82.
- Lu, X., Block, T. und Gerlich, W.H. (1996).** *Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line.* J Virol. 70: 2277-85.
- Lürmann, A. (1885).** *Eine Icterus-epidemie.* Berl. Klin. Wochenschr. 22: 20-23.
- Mabit, H., Vons, C., Dubanchet, S., Capel, F., Franco, D., Petit, M.A. (1996).** *Primary cultured normal hepatocytes for hepatitis B virus receptor studies.* J Hepatol 24: 403-12
- Mabit, H., Dubanchet, S., Capel, F., Dauguet, C., Petit, M.A.(1994).** *In vitro infection of human hepatoma cells (HepG2) with hepatitis B virus (HBV): spontaneous selection of a stable HBV surface antigen-producing HepG2 cell line containing integrated HBV DNA sequences.* J Gen Virol; 75: 2681-9
- Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Baba, K., Ito, Y., Miyamoto, H., Funatsu, G., Oda, K., Usuda, S., Togami, S. Nakamura, T., Miyakawa, Y. und Mayumi, M. (1984).** *A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleotide acid bears the receptor of polymerized human as well as chimpanzee albumins.* Gastroenterology. 86: 910-918.
- Macrae, D.R., Bruss, V. und Ganem, D. (1991).** *Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly.* Virology 181: 359-363.
- Magnius, L.O. und Espmark, J.A. (1972).** *New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants.* J. Immunol. 109: 1017-1021.
- Magnius, L.O., Norder, H. (1995).** *Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene.* Intervirology 38, 24-34.
- Mangold, C.M., Unckell, F., Werr, M., Streeck, R.E. (1993).** *Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein.* J Virol; 67: 4588-97
- Mangold, C.M., Unckell, F., Werr, M., Streeck, R.E. (1995).** *Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region;* Virol 211:535-43
- Marion, P.L., Oshira, L., Regenry, D.C., Scullard, G.H. und Robinson, W.S. (1980).** *A virus in Beechy and ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2941-2945.
- Mason, W.S., Seal, G. und Summers, J. (1980).** *Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.* J Virol. 36(3): 829-36.

Maurer-Stroh, S. und Eisenhaber, F. (2004). *Myristoylation of viral and bacterial proteins.* Trends Microbiol. 12(4): 178-85.

McAleer, W.J., Markus, H.Z., Wampler, D.E., Buynak, E.B., Miller, W.J., Weibel, R.E., McLean, A.A. (1984). *Vaccine against human hepatitis B virus prepared from antigen derived from human hepatoma cells in culture.* Proc Soc Exp Biol Med 175(3): 314-9.

McAleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J., Hilleman, M.R. (1984). *Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast.* Nature Jan 12-18, 307 (5947): 178-80.

Nassal, M. (1992). *The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly.* J. Virol. 66: 4107-4116.

Neurath, A.R., Kent, S.B., Strick, N., Parker, K., Courouce, A.M., Riottot, M.M., Petit, M.A., Budkowska, A., Girard, M., Pillot, J. (1987). *Antibodies to synthetic peptides from the pre-S1 and pre-S2 regions of one subtype of the hepatitis B virus (HBV) envelope protein recognize all HBV subtypes.* Mol. Immunol. 24: 975-80.

Neurath, A.R., Kent, S.B., Strick, N., Parker, K. (1988). *Delineation of contiguous determinants essential for biological functions of the pre-S sequence of the hepatitis B virus envelope protein: its antigenicity, immunogenicity and cell-receptor recognition.* Ann. Inst. Pasteur Virol. 139: 13-38.

Neurath, A.R., Adamowicz, P., Kent, S.B., Riottot, M.M., Strick, N., Parker, K., Offensperger, W., Petit, M.A., Wahl, S., Budkowska, A, et al. (1986). *Characterization of monoclonal antibodies specific for the pre-S2 region of the hepatitis B virus envelope protein.* Mol. Immunol. 23: 991-7.

Neurath, A.R., Kent, S.B., Adamowicz, P., Riottot, M.M., Price, P., Strick, N., Parker, K., Petit, M.A., Budkowska, A., Girard, M., et al. (1987). *Immunological cross-reactivity between preS2 sequences of the hepatitis B virus envelope proteins corresponding to serological subtypes adw2 and ayw.* Mol. Immunol. 24: 561-8.

Neurath, A.R., Kent, S.B.H., Strick, N. und Parker, K. (1986). *Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus.* Cell 46: 429-436.

Neurath, A.R., Kent, S.B., Parker, K., Prince, A.M., Strick, N., Brotman, B. und Sproul, P. (1986). *Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing.* Vaccine. 4(1): 35-7.

Neurath, A.R., Seto, B. und Strick, N. (1989). *Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (env) protein are virus-neutralizing and protective.* Vaccine 7: 234-236.

Norder, H., Hammas, B., Lofdahl, S., Courouce, A.M., Magnius, L.O. (1992). *Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B*

surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 73, 1201-8.

Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1988). *Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigene subtypes.* *J Gen Virol* 69, 2575-83.

Owada, T., Matsubayashi, K., Sakata, H., Ihara, H., Sato, S., Ikebuchi, K., Kato, T., Azuma, H., Ikeda, H. (2006). *Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry.* *J Viral Hepat*; 13: 11-8

Ogata, N., Cote, P.J., Zanetti, A.R., Miller, R.H., Shapiro, M., Gerin, J. und Purcell, R.H. (1999). *Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus.* *Hepatology.* 30(3): 779-86

Patzer, E.J., Nakamura, G.R., Simonsen, C.C., Levinson, A.D. und Brands, R. (1986). *Intracellular assembly and packaging of the hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum.* *J. Virol.* 58: 884-892.

Persing, D.H., Varmus, H.E. und Ganem, D. (1987). *The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid.* *J Virol.* 61: 1672-7.

Peterson, D.L. (1981). *Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen.* *J. Biol. Chem.* 256: 6975-83.

Prince, A.M. (1968). *An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 60(3): 814-21.

Protzer, U. und Schaller, H. (2000). *Immune escape by hepatitis B viruses.* *Virus Genes.* 21: 27-37.

Radziwill, G., Tucker, W. und Schaller, H. (1990). *Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: Domain structure and RNase H activity.* *J. Virol.* 64: 613-620.

Ren, S. und Nassal, M. (2001). *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.* *J. Virol.* 75: 1104-1116.

Robinson, W.S., Clayton, D.A. und Greenman, R.L. (1974). *DNA of a human hepatitis B virus candidate.* *J Virol* 14: 384-91.

Robinson, W.S., und Greenman, R.L. (1974). *DNA polymerase in the core of the human hepatitis B candidate.* *J Virol* 13: 1231-6.

Robinson, W.S. (1977). *The genome of hepatitis B virus.* *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 357-377.

Robinson, W.S. (1991). *Hepadnaviridae and their replication.* In: Fundamental Virology 2nd Ed pp. 989-1021, Fields, B.N. and Knipe, D.N., Raven Press, New York.

Runge, D.M., Runge, D., Dorko, K., Pizarov, L.A., Leckel, K., Kostrubsky, V.E., Thomas, D., Strom, S.C., Michalopoulos, G.K. (1999). *Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes.* J Hepatol 30:265-74.

Ryu, C.J., Gripon, P., Park, H.R., Park, S.S., Kim, Y.K., Guguen-Guillouzo, C., Yoo, O.J. und Hong, H.J. (1997). *In vitro neutralization of hepatitis B virus by monoclonal antibodies against the viral surface antigen.* J Med Virol. 52(2): 226-33.

Sauerbrei, A., Schacke, M., Schultz, U., Egerer, R., Merkle, I., Glebe, D., Gerlich, W.H., Wutzler, P. (2005). *Alternative methods for validation of cell culture infection with duck hepatitis B virus.* J. Virol. Methods 129: 178-85

Saniewski, M. (2005): *Interaktionen von Hepatitis-B-Virus-Oberflächenproteinen mit hepatozellulären Membranen,* Diplomarbeit Fachbereich Biologie. Justus-Liebig-Universität Gießen

Sattler, F. und Robinson, W.S. (1979). *Hepatitis B viral DNA have cohesive ends.* J. Virol. 32: 226-233.

Schmitt, S., Glebe, D., Alving, K., Tolle, T.K., Linder, M., Geyer, H., Linder, D., Peter-Katalinic, J., Gerlich, W.H. und Geyer, R. (1999). *Analysis of the PreS2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus.* J. Biol. Chem. 274: 476-482.

Schmitt, S., Glebe, D., Tolle, T.K., Lochnit, G., Linder, D., Geyer, R. und Gerlich, W.H. (2004). *Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus.* J Gen Virol. 85(Pt 7): 2045-53.

Seeger, C. und Mason, W.S. (1998). *Replication of the hepatitis B virus genome.* In: R. Koshy und W.H. Caselmann (Hrsg.). Hepatitis B Virus: Molecular Mechanisms in Disease and Novel Strategies for Therapy, Imperial College Press.

Seeger, C., Ganem, D. und Varmus, H.E. (1986). *Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy.* Science 232: 477-484.

Seglen, P.O. (1976). *Preparation of isolated rat liver cells.* Methods Cell Biol. 13: 29-83.

Seifer, M., Heermann, K.H. und Gerlich, W.H. (1990). *Expression pattern of the hepatitis B virus genome in transfected mouse fibroblasts.* Virology 179: 300-311.

Sells, M.A., Chen, M.L. und Acs, G. (1987). *Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis virus DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1005-1009.

- Shearer, M.H., Sureau, C., Dunbar, B., Kennedy, R.C. (1998).** *Structural characterization of viral neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen.* Mol Immunol 35: 1149-60.
- Shouval, D. (2003).** *Hepatitis B vaccines.* J Hepatol.39(1): 70-76.
- Siddiqui, A., Sattler, F.R. und Robinson, W.S. (1979).** *Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus subtype adw2.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4664-4668.
- Sirica, A.E., Richards, W., Tsukada, Y., Sattler, C.A. und Pitot, H.C. (1979).** *Fetal phenotypic expression by adult rat hepatocytes on collagen gel/nylon meshes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 283-287.
- Sominskaya, I., Pushko, P., Dreilina, D., Kozlovskaya, T. und Pumpen, P. (1992).** *Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes.* Med Microbiol Immunol. 181(4): 215-26.
- Soulie, J.C., Devillier, P., Santarelli, J., Goudeau, A., Vermeulen, P. und Geullier, M. (1991).** *Immunogenicity and safety in newborns of a new recombinant hepatitis B vaccine containing the S and pre-S2 antigens.* Vaccine. 9(8): 545-8.
- Stibbe, W. und Gerlich, W.H. (1982).** *Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors.* Virology 123: 424-436.
- Stahl, B. (2001).** Untersuchungen zur Antigenämie und Antikörperbildung bei Hepadnavirusinfektionen des Waldmurmeltiers und des Menschen. Inaugural-Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin. Universität Gießen.
- Standring, D.N., Ou, J.H., Masiarz, F.R. und Rutter, W.J. (1988).** *A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in Xenopus oocytes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8405-8409.
- Stuyver, L., De Gendt, S., van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F., Rossau, R. (2000).** *A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness.* J Gen Virol 81 Pt 1, 67-74.
- Su, J.J. (1987).** *Experimental infection of human hepatitis B virus (HBV) in adult tree shrews.* Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 16(2): 103-6, 22 (Artikel in Chinesisch).
- Summers, J. und Mason, W.S. (1982).** *Replication of the genome hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate.* Cell 29: 403-415.
- 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.

- Summers, J., Smolec, J.M. und Snyder, R. (1978).** *A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4533-37.
- Sureau, C., Guerra, B., Lee, H. (1994).** *The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus.* J Virol; 68: 4063-6
- Suzuki, H. Iino, S. Shiraki, K., Akahane, Y., Okamoto, H. und Domoto, K. (1994).** *Safety and efficacy of a recombinant yeast-derived pre S₂ + S-containing hepatitis B vaccine (TGP-943): phase 1, 2 and 3 clinical testing.* Vaccine. 12: 1090-6.
- Tanaka, J. (2000).** *Hepatitis B epidemiology in Latin America.* Vaccine 18 Suppl 1, S.17-9
- Tai, P.C., Suk, F.M., Gerlich, W.H., Neurath, A.R., Shih, C. (2002).** *Hypermodification and Immune Escape of an Internally Deleted Middle-Envelope (M) Protein of Frequent and Predominant Hepatitis B Virus Variants.* Virology 292: 44-58.
- Thomssen, R., Gerlich, W.H., Bottcher, U., Legler, K., Ritter, S., Stibbe, W., Weinmann, W., Klinge, O., Pfeifer, U. (1983).** *Safety and potency aspects in the preparation of an experimental HBsAg vaccine.* Dev. Biol. Stand. 54: 23-31
- Thomssen, R., Gerlich, W.H., Böttcher, U., Legler, K., Ritter, S., Stibbe, W., Weinmann, W., Klinge, O., Pfeifer, U. (1982).** *Preparation and testing of a hepatitis B vaccine.* Dtsch. Med. Wochenschr. 107: 125-31
- Tiollais, P., Charnay, P. und Vyas, G.N. (1981).** *Biology of hepatitis B virus.* Science 213: 406- 411.
- Trevisan, A., Cavigli, R., Stenico, D., Casara, D. Pasquali, C. und Capri, C. (1998).** *Hepatocyte receptors for polymerized albumin. Experimental study on isolated hepatocytes and in vivo animals.* Minerva Med. 79: 81-90.
- Tuttleman, J.S., Pourcel, C. und Summers, J. (1986).** *Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells.* Cell 47: 451-460.
- Tuttleman, J.S., Pugh, J.C. und Summers, W. (1986).** *In vitro infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus.* J Virol. 58: 17-25.
- Urban, S. Kruse, C. und Multhaup, G. (1999).** *Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction.* EMBO J. 19(6): 1217-27.
- Urban, S. und Gripon, P. (2002).** *Inhibition of duck hepatitis B virus infection by myristoylated Pre-S peptide of the large viral surface protein.* J. Virol. 76: 1986-1990.
- Walter, E., Keist, R., Niederost, B., Pult, I. und Blum, H.E. (1996).** *Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo.* Hepatology 24(1): 1-5.

- Waters, J.A., Brown, S.E., Steward, M.W., Howard, C.R. und Thomas, H.C. (1992).** *Analysis of the antigenic epitopes of hepatitis B surface antigen involved in the induction of a protective antibody response.* Virus Res. 22(1): 1-12.
- Waters, J., Pignatelli, M., Galpin, S., Ishihara, K., Thomas, H.C. (1986):** *Virus-neutralizing antibodies to hepatitis B virus: the nature of an immunogenic epitope on the S gene peptide* J. Gen. Virol. 67: 2467-73
- 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.
- Wolters, B., Junge, U., Dziuba, S. und Roggendorf, M. (2003).** *Immunogenicity of combined hepatitis A and B vaccine in elderly persons.* Vaccine. 21 (25-26): 3623-8.
- Yamada, K., Kotani, M., Eguchi, T. Kobayashi, M., Yamazoe, K., Yanagi, R., Ichikawa, S., Tsuda, F. und Okamoto, H. (1998).** *Efficiency of hepatitis B vaccines with and without preS2-region product in Sumo wrestlers in Japan.* Hepatol Res. 12: 3-11.
- Yamaki, M., Otori, H., Onodera, S., Ishida, N. und Maeda, H. (1982).** *Circular dichroism and biochemical properties of hepatitis B virus core antigen.* Biochem. Biophys. Acta. 706: 165-173.
- Yan, R.Q., Su, J.J, Huang, D.R., Gan Y.C., Yang, C. und Huang, G.H. (1996).** *Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus.* J Cancer Res Clin Oncol. 122(5): 283-8.
- Young, M.D., Schneider, D.L., Zuckerman, A.J., Du, W., Dickson, B. und Maddrey, W.C. (2001).** *Adult hepatitis B vaccination using a novel triple antigen recombinant vaccine.* Hepatology.34(2): 372-6.
- Zhou, S. und Standring, D.N. (1992).** *Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10046-10050.
- Zhou, D.X. und Yen, T.S. (1990).** *Differential regulation of the hepatitis B virus surface gene promoters by a second viral enhancer.* J Biol Chem. 265(34): 20731-4.

9. Danksagung

Da es hier nicht möglich ist alle Mitarbeiter/-innen und Kollegen/-innen der Medizinische Virologie des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen einzeln namentlich zu nennen, möchte ich mich zunächst bei allen für Hilfestellungen und ein wunderbares Arbeitsklima bedanken.

Ein besonderer Dank geht an:

Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die konstruktiven Vorschläge und die stete Diskussionsbereitschaft. Es war eine Freude unter seiner hervorragenden Leitung im Institut arbeiten zu dürfen !

Herrn Dr. Dieter Glebe danke ich besonders für die exzellente Betreuung der Dissertation und sein großes Engagement. Selbst in für mich schwierigen Situationen gelang es ihm durch seine menschlich kompetente Art und seine wissenschaftliche Versiertheit, ein Klima zu schaffen, in dem es Spaß machte, sich noch tiefer in die Materie einzuarbeiten.

Sigrun (Siggi) Broehl danke ich von Herzen für ihre Hilfsbereitschaft und die fachliche Unterstützung in allen Belangen. Als gute Seele des Labors sorgte sie stets für ein harmonisches Miteinander.

Ein Dank an Herrn Dr. Reinhard Vollerthun (Gießen), der mir den Zugang zur Medizin erschloss.

Ein Dank an Herrn Dr. Ulrich Krupp (Sögel) und Herrn Dr. Adam Czaplinski (Basel): zwei Ärzte, die meine klinische Ausbildung geprägt haben.

Worte genügen nicht: Meinen Eltern ein besonderer Dank. Ohne sie wäre nichts gelungen !

10. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.“

Christian Prinz

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Prinz
Anschrift	Landegger Strasse 6 49733 Haren (Ems)
Geburtsdatum	04. Juli 1978
geboren in	Haren (Ems)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schule

August 1985 - Juli 1989	St. Ansgari Grundschule, Haren
August 1989 - Juli 1991	Orientierungsstufe, Haren
August 1991 - Juli 1998	Gymnasium, Haren Abschluß: Abitur

Wehrdienst

August 1998 - August 1999	Ableisten des Zieldienstes im Seniorenzentrum St. Martinus und der kath. Kirchengemeinde St. Martinus, Haren
------------------------------	--

Studium

Oktober 1999 - März 2000	Studium der Mathematik, Physik und Philosophie Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster
April 2000 - März 2005	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
April 2005 - Mai 2006	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität Berlin, Universitätsmedizin Berlin Charite
davon August 2005 - Dezember 2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Basel (Schweiz)
31.03.2002	Ärztliche Vorprüfung
25.03.2003	erstes Staatsexamen
29.03.2005	zweites Staatsexamen
21.06.2006 ab 01.07.06	drittes Staatsexamen Assistenzarzt Kardiologie (MHH)
ab 2003	Stipendiat der „Bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk“