Infektion von Hepatozyten-Kulturen aus Tupaia belangeri mit verschiedenen Hepatitis B Virus-Genotypen und deren Infektionsinhibition durch monoklonale und polyklonale Antikörper

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

Isabel Voth

geboren in Langen

Gießen 2008

Aus dem Institut für Medizinische Virologie

der

Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor:

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

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h.c. W.H. Gerlich

Gutachter:

PD Dr. M. Niepmann

Tag der Disputation:

29.04.2008

So ist das mit der ganzen Welt,

es ist ein immer währendes Werden.

Immanuel Kant

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung: Das Hepatitis B Virus (HBV)

1.1 Nomenklatur und Klassifizierung S. 7

1.2 Geschichte S. 7-8

1.3 Virusmorphologie und Genom S. 9-16

1.4 Viraler Lebenszyklus S. 16-19

1.5 Variabilität von HBV S. 20-26

1.5.1 Variabilität von HBV S. 20

1.5.2 Konsequenzen der HBV-Variabilität im Allgemeinen S. 20-23

1.5.3 Auswirkungen der Variabilität von HBV im Einzelnen S. 23-26

1.6 Schutz gegen HBV einschließlich der unterschiedlichen HBV-Formen S. 26-27

1.7 Ziele meiner Arbeit S. 28

2. Material

2.1 Zellkultur S. 29-31

2.1.1 Isolation primärer Tupaia-Hepatozyten S. 29

2.1.2 Kultivierung primärer Hepatozyten: Wachstumsmedien S. 29-31

2.2 Viruslösungen Infektionsversuche S. 31

2.3 Antikörper Inhibitionsversuche S. 32-33

2.3.1 Monoklonale Antikörper S. 32

2.3.2 Polyklonale humane Antiseren S. 32-33

2.4 Proteinfällung (Fällung von polyklonalen Antikörpern aus Seren) S. 33

2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) S. 34

2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) S. 34-36

2.6.1 SHBs-ELISA S. 36

2.6.2 SHBs-ELISA: Austestung verschiedener Peroxidase-Substrate S. 36

3. Methoden

3.1. Isolation primärer Hepatozyten und Zellkultur S. 37-39

3.2 Sandwich-ELISA zur Charakterisierung von viralen Oberflächenproteinen (HBV-Genotypen A, C und D; acht Virusfraktionen) S. 39

3.3 Proteinfällung (Fällung von polyklonalen Antikörpern aus Seren) S. 39-40

3.4 Gelelektrophorese von den IgG-Fällungen aus den polyklonalen Patientenseren S. 40-41

3.5 Infektions- und Infektionsinhibitionsversuche S. 41-46

3.6 ELISA S. 46-48

3.6.1 SHBs-ELISA von den Zellüberständen Infektions-/Infektionsinhibitionsversuche S. 46-47

3.6.2 SHBs-ELISA: Austestung verschiedener Peroxidase-Substrate S. 47-48

3.7 HBeAg-Bestimmung S. 48

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der verwendeten Viruspräparationen und Antikörper S. 49-54

4.2 SHBs-ELISA: Optimierung; Austestung verschiedener Peroxidase-Substrate S. 54-55

4.3 Infektions- und Infektionsinhibitionsversuche S. 56-78

5. Diskussion S. 79-87

6. Zusammenfassung und Ausblick S. 88-89

7. Literaturverzeichnis S. 90-97

8. Abkürzungen S. 98-100

9. Danksagung S. 101

10. Eidesstattliche Erklärung S. 102

11. Lebenslauf S. 103

1. Einleitung: Das Hepatitis B Virus

1.1 Nomenklatur und Klassifizierung

Das Hepatitis B Virus gehört zur Familie der Hepadnaviridae, Genus Orthohepadnavirus. Der Familienname Hepadnaviridae ergibt sich aus der durch das Virus verursachten Krankheit („Hepatitis“), aus der Art des Virus-Genoms (partiell doppelsträngiges „DNA“-Genom) und der Eigenschaft als „Virus“. Aufgrund seiner den Retroviren ähnlichen Replikation (reverse Transkription) auf der einen Seite, seinen jedoch großen Unterschieden im Virusgenom und in der Virusmorphologie auf der anderen Seite, werden Hepadnaviren auch als Pararetroviren bezeichnet.
Der Begriff „Hepatitis B“ bezeichnet die durch HBV verursachte immunologisch bedingte entzündliche Schädigung des Leberparenchyms.

1.2 Geschichte

Im Corpus Hippocraticum, welches aus circa sechzig Abhandlungen besteht und vermutlich im Zeitraum zwischen 450 und 350 v.Chr. entstanden ist, wurden bereits vier Formen der Gelbsucht beschrieben (Toellner 2000). Das epidemische Auftreten dieser Krankheit wurde schon im Altertum berichtet. 1885 beschrieb Lürmann eine „Ikterusepidemie nach der Impfung von Werftarbeitern mit Pockenvakzine“, „die menschliche Lymphe enthielt“ (Lürman 1885). Diese läßt sich rückblickend sehr wahrscheinlich auf das Hepatitis B Virus als Agens zurückführen. 1938 entstanden Hepatitis-Fälle bei der Anwendung von Masern-Rekonvaleszenten-Sera zum Zwecke der Masern-Prävention. Für diesen und viele weitere Zwischenfälle wurden die Begriffe „Serum-Ikterus“ oder „Serumhepatitis“ geprägt. Auch nach Bluttransfusionen und medizinischen Eingriffen mit unzureichend sterilisierten Geräten kam es im 20. Jahrhundert zu vielen Fällen von Serumhepatitis. Die Entdeckungsgeschichte des Serumhepatitis-Erregers begann jedoch erst 1963 durch B.S. Blumberg, der in Seren Australischer Ureinwohner ein ungewöhnliches Antigen fand, das er für einen genetischen Marker hielt (Blumberg 1967). Dieses Antigen nannte er „Australia Antigen“. Die Assoziation mit dem Hepatitis B-Virus wurde von A. Prince überzeugend nachgewiesen (Prince 1968). Die eigentlichen partikulären Korrelate des

infektiösen HBV, die sog. Dane-Partikel, wurden schließlich 1970 durch Dane im Elektronenmikroskop nachgewiesen (Dane 1970). Im Inneren dieser Partikel wies J. Almeida (Almeida et al. 1971) eine Corestruktur nach, W.S. Robinson 1973 die endogene DNA-Polymerase und 1974 die entsprechende DNA (Miller et Robinson 1886). 1979 gelang die Klonierung des HBV-Genoms. Schon in den 1970er Jahren wurde die Korrelation von HBV und hepatozellulärem Karzinom aufgedeckt.

Ende der 70er Jahre wurden in den USA und in Frankreich zwei Impfstoffe gegen HBV entwickelt. Das zur Impfung verwendete HBsAg wurde damals aus menschlichem Plasma von HBV-Trägern gewonnen. Mittlerweile existieren mehrere Impfstoff-Generationen. Mit Hilfe der Gentechnik gelang es Mitte der 80er Jahre, das HBsAg durch Hefezellen synthetisieren zu lassen.

Erklärtes Ziel der WHO ist es, durch eine weltweite zuverlässige Impfung HBV auszurotten.

1.3 Virusmorphologie und Genom

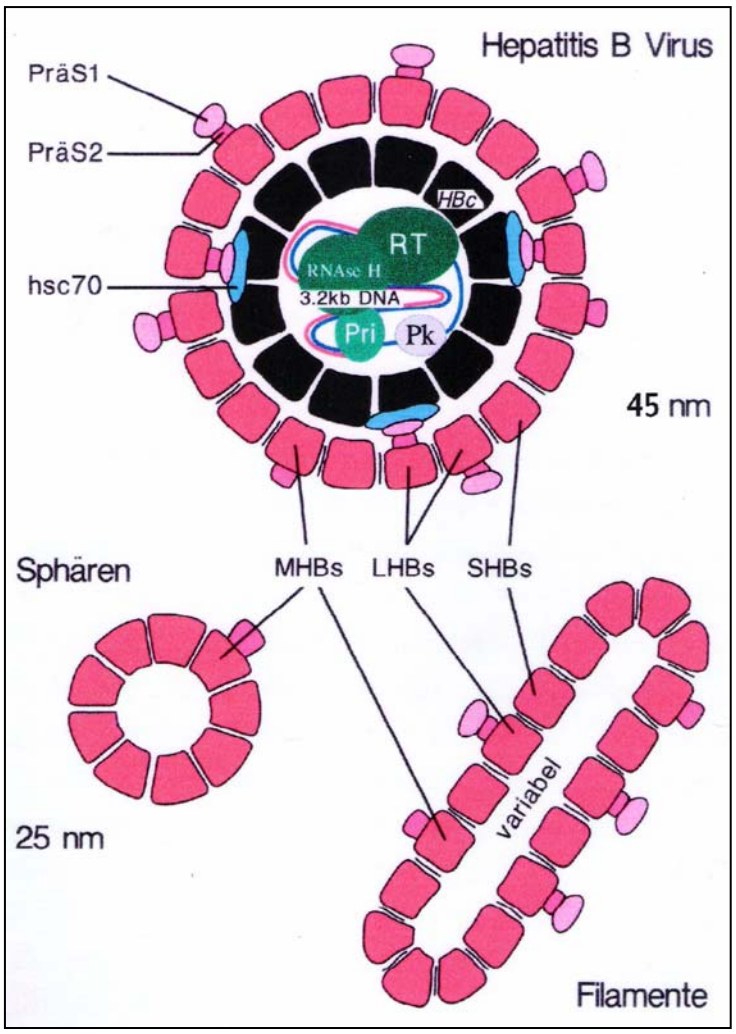

Abb.1: Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus und der subviralen HBsAg-Partikel. Oberer Teil der Abbildung: Darstellung des kompletten Virus (mit Durchmesserangabe) bestehend aus Hülle, Kapsid und Genom. Unterer Teil der Abbildung: Darstellung der beiden Formen subviraler Partikel (mit Durchmesserangabe): Sphären (links) und Filamente (rechts).
Hüllproteine: Die Oberflächenproteine der Virushülle heißen SHBs (S (small)- Hepatitis-B-surface-Protein), MHBs (M (middle) Hepatitis-B-surface-Protein) und LHBs (L (large)-Hepatitis-B-surface-Protein). Sie bestehen aus folgenden Domänen: S-Domäne (SHBs); S- und PräS2-Domäne (MHBs) oder S-, PräS1- und PräS2-Domäne (LHBs). Kapsid: Das Kapsid besteht aus HBc-Protein-Untereinheiten.
Genom-assoziierte Proteine: Das HBV-Genom besteht aus 3,2 kb DNA. Mit dem Genom kovalent verbunden ist die virale DNA-Polymerase. Die virale DNA-Polymerase besitzt eine Primerdomäne (Pri), eine reverse Transkriptase-Aktivität (RT) und eine RNAseH-Funktion (RNAseH). Bild aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

1.) Virushülle

Die aus einer Lipid-Doppelschicht bestehende Virushülle besitzt mehrere hundert Membranprotein-Untereinheiten, die in ihrer Gesamtheit das sog. Hepatitis-B-surface-Antigen (HBsAg) bilden. Das HBsAg läßt sich je nach Länge des Genprodukts in drei unterschiedliche Polypeptide untergliedern (siehe Abb. 2 und 3).

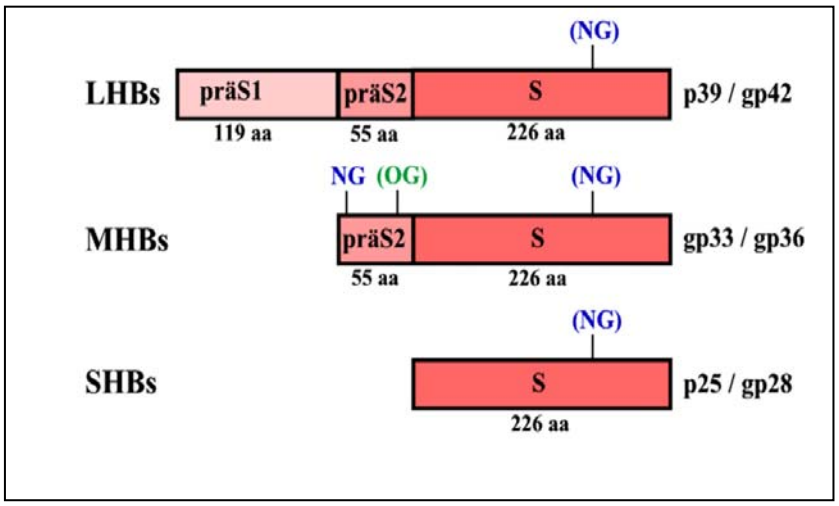

Abb.2: Schematischer Aufbau der Oberflächenproteine von HBV. Es sind N- (NG) und O-Glykosylierungsstellen (OG) dargestellt, die entweder fakultativ (in Klammern dargestellt) oder obligat (ohne Klammern dargestellt) vorhanden sein können. Das L-Protein von HBV ist am Gly-2 des N-Terminus vom PräS1 oder PräS myristoyliert (Myr) (hier nicht dargestellt). Die PräS1-Domäne codiert je nach Genotyp 108 oder 119 AS. Die 55 AS-lange PräS2-Domäne des MHBs ist am N-Terminus acetyliert (hier nicht dargestellt). Bild aus Glebe und Urban 2007.

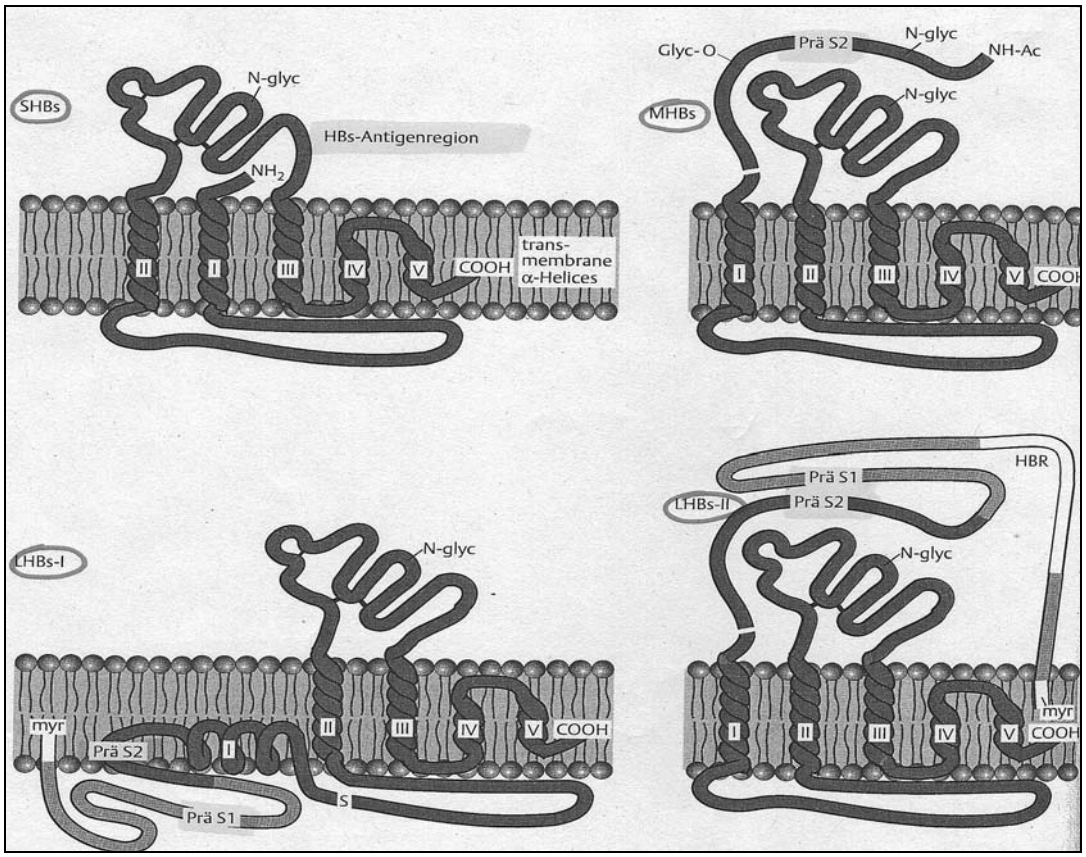

Abb. 3: Topologische Darstellung der HBV-Oberflächenproteine. Dargestellt ist der Aufbau von SHBs, MHBs und LHBs, letzteres in seiner dualen Topologie. Bei LHBs kann, je nach Funktion, die PräS-Domäne auf der Oberfläche (Bindungsbereich an die Zelloberfläche des Wirts) oder cytosolisch verbleiben (als Bindungsbereich für das virale Kapsid/ zur Umhüllung durch HBsAg). Die transmembranösen Helices sind mit I-IV numeriert. N-glyc: N-gebundenes Glykan; Glyc-O: O-gebundenes Glycan; ac: Acetyl-Rest; myr: Myristinsäure-Rest. Bild aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

L (large) Hepatitis B surface protein (LHBs): bestehend aus der PräS1- (108/119 AS, je nach Genotyp), PräS2- (55 AS) und S- (226 AS) Domäne.

M (middle) Hepatitis B surface protein (MHBs): bestehend aus der PräS2- (55 AS) und S- (226 AS) Domäne.

und S (small) Hepatitis B surface Protein (SHBs): bestehend aus der S- (226 AS) Domäne.

Die HBs-Proteine sind durch Disulfid-Brücken vernetzt. Alle drei HBs-Proteine können an ein bis drei Stellen glykosyliert sein, woraus sich somit in der SDS-Gelelektrophorese sechs unterschiedliche Proteinbanden ergeben.

Bei dem LHBs-Protein kommt darüber hinaus die PräS1-Domäne in zwei unterschiedlichen Konformationen vor. Während die PräS1-Domäne nach der Synthese am Endoplasmatischen Retikulum (ER) ausschließlich cytoplasmatisch orientiert ist (Abb. 3-LHBs I), findet man sie bei infektiösen Viren zum großen Teil auf der Oberfläche der Partikel (Abb. 3 LHBs II). Dieses bedingt die duale Topologie des LHBs. Die cytoplasmatische Ausrichtung der PräS1-Domäne wird für die intrazelluläre Interaktion mit reifen HBV Core-Partikeln benötigt („Budding" des Virus). Die PräS1-Domäne des LHBs auf der Virusoberfläche vermittelt die Interaktion des Virus mit zellulären Rezeptorstrukturen während der Infektion des Virus (Glebe und Urban 2007).

Die PräS2-Domäne im MHBs weist N- und O-Glykosylierungen auf (Schmitt et al. 2004) und bindet modifiziertes Serumalbumin (Krone et al. 1999).

Die aus 226 AS-bestehende S-Domäne besitzt zwei bis vier transmembranöse hydrophobe Helices, eine hydrophile innere Schleife (AS 28-79) und eine hydrophile äußere Schleife (AS 99-161) (Abb. 3).

Jeder SHBs-Komplex trägt in seiner äußeren hydrophilen Schleife das immunologische Hauptepitop in der „a"-Determinante (Australia Antigen). Die „a"-Determinante setzt sich aus den AS 99-170 zusammen, das immunologische Hauptepitop aus den AS 124-147 (Abb. 4).

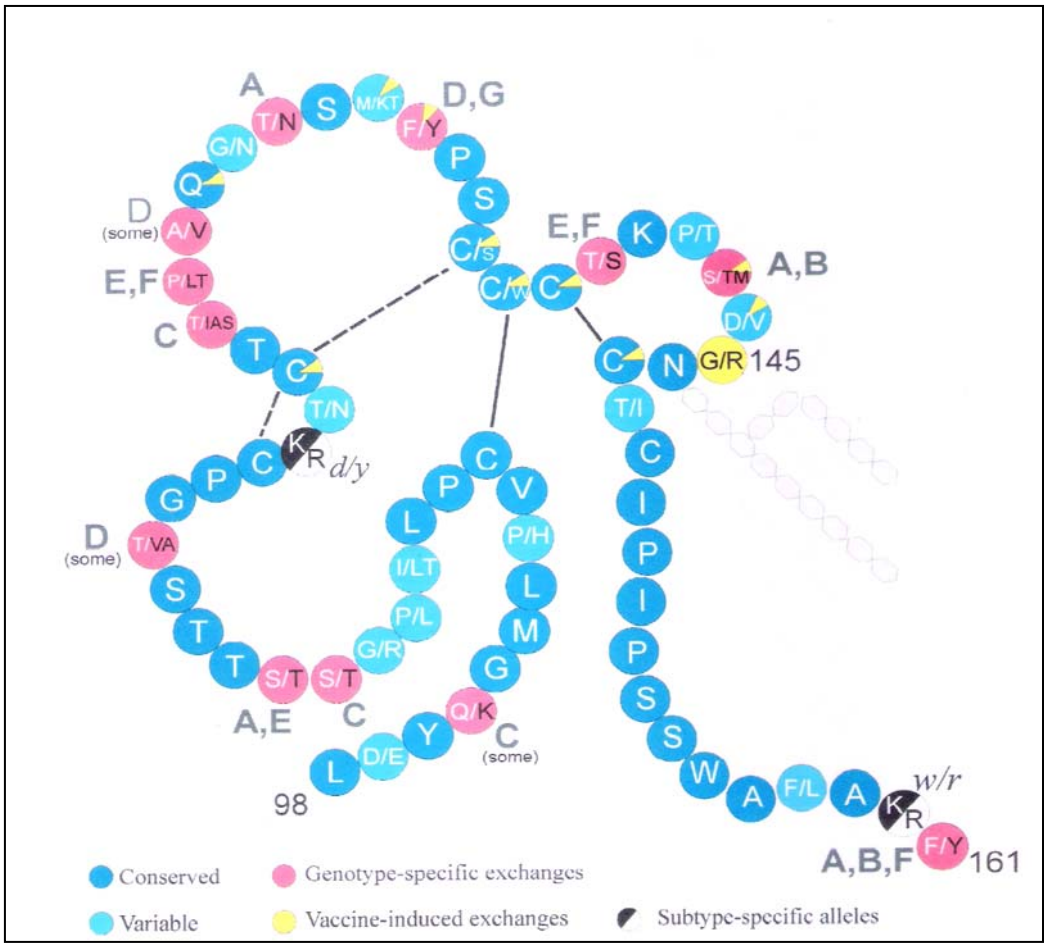

Abb. 4: Schematische Darstellung der Aminosäurensequenz der „a"-Determinante und Darstellung Genotyp-entsprechender AS-Austausche und Subtyp-entsprechender Allele in der „a"-Determinante. Die „a"-Determinante besteht aus dem Bereich AS 122 bis AS 147 des HBV-Genoms. Die Buchstaben A-F bezeichnen den jeweiligen Genotyp. Die Genotyp-entsprechende AS ist an der jeweiligen AS-Position in der Basensequenz der „a"-Domäne neben dem jeweiligen Buchstaben angegeben. Außerdem dargestellt -und in diesem Kontext weniger wichtig- sind die HBV-Subtyp-spezifischen Allele. Die HBV-Subtyp-Klassifikation basiert auf verschiedenen Allelen an Position 122 (d oder y) und 160 (w oder r). Abb. aus Schaefer 2006.

Die Synthese der drei Oberflächenproteine erfolgt am rauhen Endoplasmatischen Retikulum, die Reifung im Golgi-Apparat, wobei die Glykane modifiziert werden und ein Acetyl-Rest an den N-Terminus des MHBs angefügt wird (Schmitt et al. 1999, 2004).

Das HBsAg wird in der Regel bei einer HBV-Infektion überexprimiert und als subvirale, nicht-infektiöse Partikel ohne Nukleokapsid sezerniert (siehe Abb.1 unten links und unten rechts). Entweder sind dieses sphärische Partikel (wenig LHBs, Durchmesser 22 nm; Abb.1 unten links) oder filamentöse Partikel (viel

LHBs, Länge variabel ca. 22 x 200 nm; Abb.1 unten rechts). LHBs kann aber durch ein Retentionssignal, welches innerhalb der PräS1-Domäne liegt, auch im ER retiniert werden (Gallina et al. 1995).
Bei einem chronischen Virusträger findet man im Blut ca. 10^{10} subvirale HBsAg-Filamente, 10^{13} HBsAg-Partikel und etwa 10^{9} infektiöse DANE-Partikel pro ml (Abb.1 oben) (Gerlich und Kann 2005).

2.) Viruskapsid

Die Virushülle umhüllt das Kapsid, das aus 240 Core-Protein-Untereinheiten (HBcAg) aufgebaut ist und wiederum das Virusgenom samt reverser Transkriptase und einiger zellulärer Proteine umschließt. Die Core-Partikel interagieren bei der Umhüllung mit der cytosolisch lokalisierten PräS-Domäne des LHBs (Bruss et al. 2003). Core-Proteine bestehen aus jeweils 185 AS, wobei die carboxyterminale Domäne aus vier Arginin-reichen Clustern besteht.
HBcAg bildet im Zytoplasma durch Disulfidbrücken zusammengehaltene Dimere (Zhou et Standring 1992). Der Zusammenbau der Dimere zu Kapsiden erfolgt spontan, wobei entweder Ikosaeder mit T=3- oder T=4-Symmetrie aus 180 bis 240 Core-Proteinen mit einem Durchmesser von 32 bis 36 nm entstehen (Crowther et al. 1994 und Kenney et al. 1995).

3.) HBeAg

HBeAg-positive Patienten exprimieren außer der prägenomischen RNA eine weitere, etwas längere RNA, die zusätzlich zur AUG-Sequenz für das HBc-Protein eine AUG-Sequenz für die PräC-Region 29 codonaufwärts aufweist. Die PräC-Sequenz bewirkt eine Sekretion des Core-Proteins als HBeAg in das Serum. Personen mit HBeAg haben meist eine Viruslast von 10^{8} Viruspartikeln im Serum oder mehr. Lange Zeit hat man geglaubt, daß Patienten ohne HBeAg, die zu anti-HBe serokonvertiert sind, nicht infektiös seien. Aber die Erfahrung der letzten Jahre hat gezeigt, daß auch HBe-negative und anti-HBe-positive Patienten hoch infektiös sein können und HBV übertragen, weil sie noch Zeichen replikativer Virus-Aktivität in Form von HBV-DNA im Serum aufwiesen (Carman et al. 1989).

4.) Virusgenom

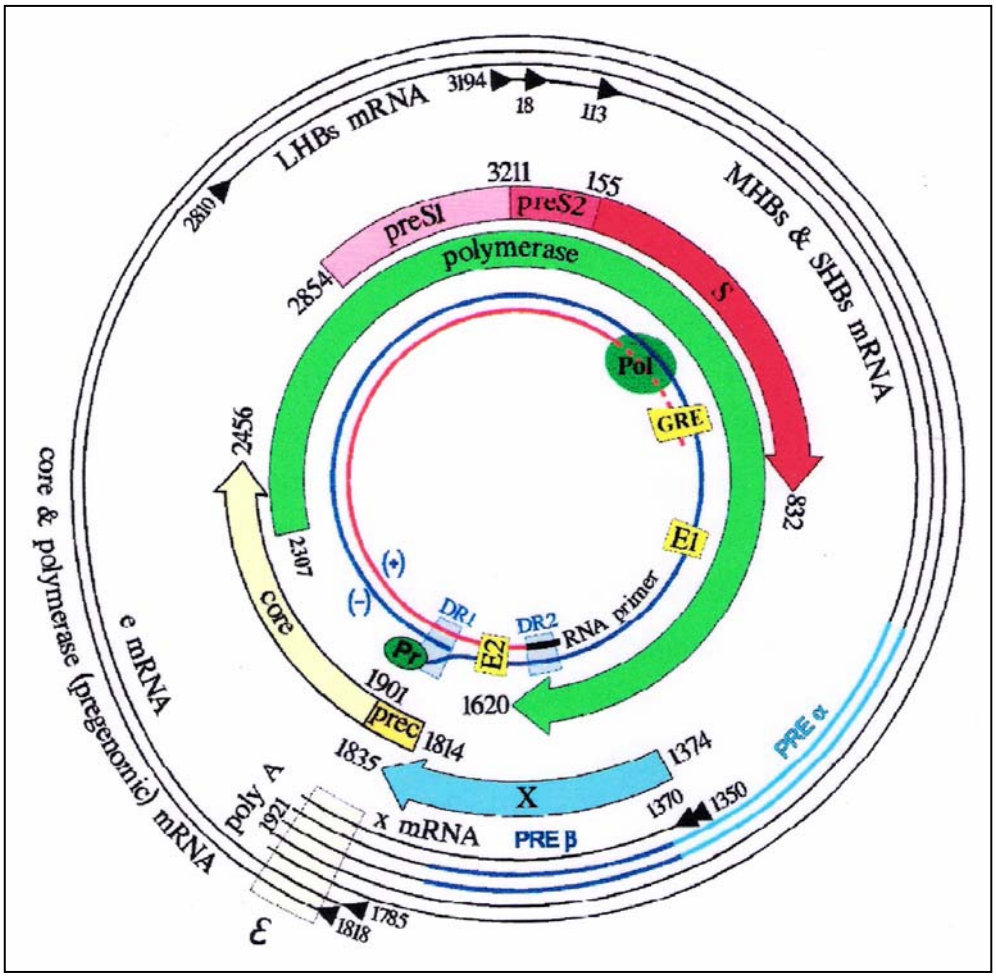

Abb. 5: Genomstruktur von HBV. Dargestellt sind im inneren Abbildungsbereich die DNA-Struktur (bestehend aus einem inkompletten DNA-Plusstrang und einem kompletten DNA-Minusstrang) mit der 5´-kovalent gebunden Primerdomäne (Primase) (Pr) und der DNA-Polymerase (Pol). Im Minusstrang befinden sich vier offene Leseraster (mittlerer Abbildungsbereich), codierend für das Core-Protein, HBeAg, die drei Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs und das HBx. Im äußeren Abbildungsbereich sind die mRNAs von HBV dargestellt. ε: Encapsidations-Signal und Polymerase-Bindungsstelle. DR1: direct repeat 1. PRE: posttranskriptionelles regulatorisches Element. Bild aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

Das HBV-Genom besteht aus einer zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA mit einem kompletten DNA-Minusstrang von ca. 3200 Basenpaaren und einem am 3'-Ende inkompletten DNA-Plusstrang, dessen Länge an diesem Ende variiert. Insgesamt weist der Plusstrang eine Länge zwischen 1100 und 2600 Basenpaaren auf. Die zirkuläre Konformation der DNA entsteht durch Überlappungen von etwa 240 Basenpaaren zwischen Minus- und Plusstrang.

Am 5'-Ende des Plusstranges befindet sich aufwärts ein 18 Basenpaare langer RNA-Primer, der sich vom 5'-Ende der prägenomischen RNA ableitet.
Auf dem Minusstrang lokalisiert sind vier offene Leseraster (ORFs=open reading frames), die für folgende Proteine codieren:

- das Core-Protein (HBcAg) (ORF C), sowie stromaufwärts des Core-Startcodons das HBeAg
- die drei Oberflächenproteine (HBsAg): LHBs, MHBs, SHBs (ORF S)
- die virale Polymerase (ORF P)
- das HBx-Protein (ORF X).

Außerdem befinden sich im Genom verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und andere Signalsequenzen.
Mit dem Genom kovalent assoziiert ist die virale DNA-Polymerase. Die virale DNA-Polymerase besitzt eine Primerdomäne, eine reverse Transkriptase-Aktivität und eine RNAse-H-Funktion (Gerlich und Kann 2005).

1.4 Viraler Lebenszyklus

Nach dem Eindringen von HBV in die Leberzelle mittels der PräS1- und S-Domänen (Glebe und Urban 2007), wird das Core-Partikel freigesetzt und dann zum nuclear pore complex (NPC) transportiert. Dort wird das Virusgenom freigesetzt und gelangt ins Karyoplasma. Dieses bewirkt ein nuclear localization signal auf der Kapsid-Oberfläche, das je nach Reife des HBV-Genoms und Phosphorylierung der Core-Untereinheiten exponiert ist (Kann et al. 1999). Im Zellkern der Wirtszelle wird durch die virale DNA-Polymerase zunächst der DNA-Plusstrang des viralen Genoms komplettiert und die virale DNA durch zelluläre DNA-modifizierende Enzyme kovalent zirkulär geschlossen (cccDNA= covalently closed circular DNA). Die cccDNA ist ein erster Marker für eine erfolgte Infektion, und sie dient als nukleäre Matritze für die nachfolgende virale Transkription, also für die Entstehung der viralen mRNA.
Die Transkription erfolgt im Zellkern am Minusstrang durch die zelluläre RNA-Polymerase II. So entsteht die virale mRNA, wobei man zwei Arten von viraler mRNA unterscheidet:

a.) Einerseits mRNA supergenomischer Länge:

Hieraus wird HBeAg codiert, wenn die mRNA das PräC-Startcodon enthält; HBcAg, wenn die mRNA nur das Core- ohne das PräCore-Startcodon enthält; und als weiteres codiert diese mRNA die virale DNA-Polymerase.

b.) Andererseits entstehen mRNAs subgenomischer Länge:

Diese codieren das HBx-Protein und die Oberflächenproteine (HBsAg).

Im DNA-Minusstrang befinden sich mehrere Bindungsstellen (Promoter, Enhancer, Silencer) für zelluläre Transkriptionsfaktoren, z.B. Glucocorticoidrezeptoren, aber nur eine TATAAA-Sequenz als Stop-Signal (Tang et al. 2001). Die viralen mRNAs sind folglich coterminal. Sie besitzen eine CAP-Struktur am 5'-Terminus und sind am 3'-Ende polyadenyliert. Ein PRE (posttranscriptional regulatory element) verhindert das für mRNAs sonst übliche Spleißen (Huang et Liang 1993). Die Expression der viralen offenen Leseraster wird ausschließlich durch die Promotoren und Enhancer des DNA-Genoms reguliert. Core- und LHBs-Promoter sind leberspezifisch, M/S-HBs- und HBx-Protein-Promoter nicht; sie können in allen Zelltypen wirksam sein (Gerlich und Schaefer 2002). Das Prägenom beinhaltet auch Signale für die Initiation der reversen Transkription. Das sog. Epsilon-Signal z.B. ist für die Bindung der viralen Polymerase erforderlich und initiiert somit die reverse Transkription.

Die Translation des HBcAg und der viralen Polymerase von der Prägenom-mRNA erfolgt im Zytoplasma. Hier interagiert die Prägenom-RNA mit der viralen Polymerase und zellulären Chaperonen. Dieser Komplex wird dann von den Kapsiden eingeschlossen. Bei der Encapsidation, die spontan erfolgt, spielen also auch zelluläre Chaperone eine Rolle, und desweiteren scheint die Phosphorylierung der HBcAg- Untereinheiten wichtig zu sein (Gazina et al. 2000). Die eingeschlossene virale RNA heißt prägenomische RNA, da sie als Template für die reverse Transkription im neu entstandenen Viruspartikel fungiert. Das sog. Epsilon-Signal ist für die Bindung der viralen Polymerase erforderlich und initiiert den Beginn der reversen Transkription. Hieran beteiligt sind auch das DR1 und DR2-Signal, zwei Basenpaarwiederholungen, die 11 Basenpaare lang sind.

Der DNA-Minusstrang stellt das Produkt der reversen Transkription des RNA-Prägenoms dar. Die M-Region dieses Strangs führt zur Translokation der viralen Polymerase an die Stelle des Minusstrangs, wo anschließend die Plusstrangsynthese beginnt. Die Zirkularisierung des Minusstrangs erfolgt schließlich durch die terminale Redundanz und zwei dieser Redundanz benachbarte Domänen 5E und 3E (Liu et al. 2004).

Das nun entstandene reife Nukleokapsid mit seiner genomischen DNA kann entweder an die Surface-Proteine binden, die am rauhen ER translatiert werden und so als reifes HBV in den Blutstrom aus der Zelle entlassen werden, oder es kann zum Nukleus zurücktransportiert werden, wodurch die HBV-DNA amplifiziert wird und in episomaler Form dort verbleibt. Replikative Intermediate oder auch komplette HBV DNA kann in die zelluläre DNA integriert werden. Virus-DNA, die in das Wirtsgenom integriert wird, kann keine Matritze für intakte prägenomische RNA mehr darstellen, kann aber verkürzte Formen der Oberflächenproteine und des HBx exprimieren, die Transkriptions- und Wachstumsfaktoren aktivieren, also einen wachstumsstimulierenden Effekt haben und in Zellkulturen und bei Mäusen Malignome erzeugen (Luber et al. 1996). In Studien an Menschen hat sich gezeigt, daß oxidativer Stress, wie z.B. bei einer Entzündung, nicht nur Schaden an der Wirts-DNA erzeugt, sondern auch die virale DNA-Integration in das Wirtsgenom fördert (Dandri et al. 2002).

Zurück zu den regelrechten Pathway-Schritten des HBV: Da die cccDNA episomal lokalisiert ist, sich nicht selbst replizieren kann und auch nicht interponiert wird wie bei den Retroviren, ist es für das virale Überleben essentiell, daß permanent der Pool intranucleärer Virus-DNA aufgefüllt wird. Dieses kann entweder durch Neuinfektion mit dem kompletten Virus oder durch Reentry der Kapside erfolgen. Der virale Lebenszyklus kann auch allein durch Reentry aufrechterhalten werden. In diesem Fall entsteht zu Infektionsbeginn ein kurzes serologisch stummes Infektionsintervall ohne Virussekretion. Zum Nukleus wird das Genom innerhalb von Core-Partikeln entlang der Mikrotubuli transportiert. Der Import in den Kern erfolgt wie oben für das Primärvirus beschrieben.

Die Expression von Oberflächenproteinen resultiert in der Umhüllung von Nukleokapsiden und letztendlich in Virussekretion. Die Virusassemblierung erfordert sowohl SHBs als auch LHBs, wobei hierzu ausschließlich Sequenzen proximal von AS 108 der PräS-Domäne erforderlich sind. Auch die Cysteinreste in der internen Schleife des SHBs sind essentiell für die Virusassemblierung. Virussekretion ins Blut, für die ebenfalls LHBs und SHBs erforderlich sind, ist für das Überleben des Virus wichtig. Da die Transkription von HBs-mRNA bei de-novo-Infektion jedoch ein spätes Ereignis ist, wird sichergestellt, daß zunächst ein großer DNA-Pool an cccDNA generiert wird, bevor das Virus in den Blutstrom entlassen wird (Tuttleman, Pourcel et Summers 1986). Auf welchem Transportweg das reife, umhüllte HBV aus dem Zytoplasma in das Blut gelangt ist noch unklar.

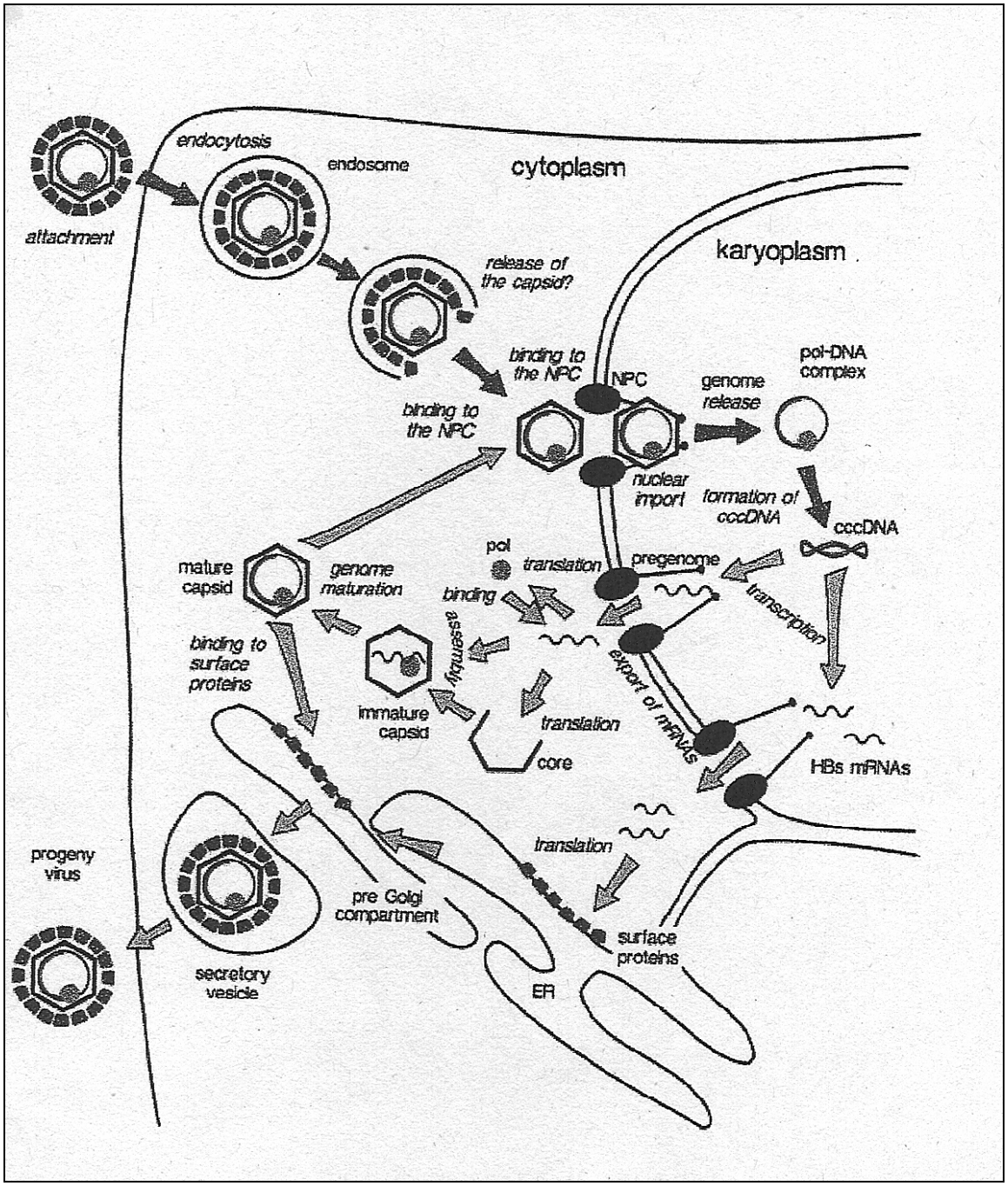

Abb. 6: Darstellung des HBV-Replikationszyklus. Die Phasen Endozytose und Freisetzung des Kapsids sind noch nicht abschließend geklärt und somit hypothetisch. NPC: nuclear pore complex. ER: endoplasmatisches Retikulum. Neben der Darstellung der Replikationsphasen sind hier auch die verschiedenen viralen Nukleinsäuren (rcDNA, cccDNA und mRNAs) dargestellt. Abbildung aus Gerlich und Kann 2005.

1.5. Variabilität von HBV

1.5.1 Variabilität von HBV

Bei HBV handelt es sich um ein DNA-Virus. Die Variabilität von HBV ist jedoch wesentlich höher als bei anderen DNA-Viren. Die Ursache dafür liegt in der für DNA-Viren untypischen Art der Replikation von HBV. Das HBV-DNA-Template wird durch zelluläre RNA-Polymerasen in prägenomische RNA transkribiert, die wiederum durch die virale Polymerase in Form der reversen Transkription in DNA umgeschrieben wird.
Die virale Polymerase weist keine Korrekturfunktion auf. Die Fehlerfrequenz in der DNA des HBV ist wahrscheinlich so hoch wie bei RNA-Viren einschließlich Retroviren. Man kann sie jedoch bei HBV nur abschätzen, da die genaue Messung wegen der überlappenden ORFs erschwert ist (Weber 2004). Man nimmt an, daß jede Base des HBV-Genoms pro Tag allein aufgrund der fehlenden Korrekturfunktion der viralen Polymerase etwa 10^4 Mal durchmutiert, wenn man von einer täglichen Neusynthese von 10^{13} Viruspartikeln ausgeht, die für einen durchschnittlichen Virustiter von 10^9-10^{10} Genomäquivalenten (GE)/ml im Serum zutreffen würde (Gerlich 2002).

1.5.2 Konsequenzen der HBV-Variabilität im Allgemeinen

Als erstes sind die natürlich vorkommenden Diversitäten zu nennen, welche im Lauf der Evolution entstanden sind. So entstehen z.B. die verschiedenen Genotypen und die Subgenotypen und serologischen HBsAg-Subtypen des jeweiligen Genotyps (s.u.). Der jeweilige Genotyp, Subgenotyp und Subtyp stellt somit aus virologischer Sicht die „Idealvariante“ des jeweiligen Virus in seiner jeweiligen Wirtspopulation dar.
Neben den natürlich vorkommenden Diversitäten von HBV sind die aufgrund der selektiven in-vivo-Umgebung des individuellen Wirts selektionierten HBV-Mutanten zu nennen. Diese Mutanten tragen entsprechend ihrer unterschiedlichen Mutationsorte und der dadurch bedingten Konsequenz für das Virus, den Wirt und letztendlich für dessen Population wiederum entscheidend zur Variabilität des HBV bei. Bestimmte Mutanten sind lebensfähiger als andere und setzen sich

daher gegenüber anderen Mutanten durch. Bestimmte Mutationen sind also nicht nur intraindividuell, sondern auch interindividuell häufig.

Die natürliche Evolutionsrate des HBV-Genoms ist im Falle der chronischen HBV-Infektion am höchsten und beträgt ca. 1,4 bis $3{,}2 \times 10^{5}$ Substitutionen/Stelle/Jahr, was relativ gering ist. Bei Lebertransplantationen ist diese Rate jedoch 100-fach erhöht (Weber 2004). In der Evolution des HBV beobachtet man intra-Genotypen-, aber auch inter-Genotypen-Rekombinationen. Genotypenrekombinationen findet man v.a. am Ende des Surface-Gens und Core-Gens und auch zwischen menschlichen und affeneigenen Genotypen. Inter-Genotyp-Rekombinationen sind bei allen Genotypen zu beobachten; intra-Genotyp-Rekombinationen nur bei den Genotypen A, D, F/H und Gibbon-Varianten, nicht aber bei den Genotypen B, C oder bei der asiatischen B/C-Rekombinationsgruppe (Simmonds et al. 2005).

Die Homologie der menschlichen HBV zu tierischen Hepadnaviren ist hoch. Selbst Nagetier-Hepadnaviren weisen eine Homologie von ca. 60% zu menschlichen HBV auf (Kann, Gerlich 2005). Das Genom des HBV scheint insgesamt relativ konserviert zu sein, sowohl in einer Tierart als auch zwischen den Arten, jedoch ist enorme Variabilität aus den verschiedenen Rekombinationsmöglichkeiten und Umweltbedingungen möglich. Bei einem bestimmten Genotyp gibt es wie schon erwähnt unterschiedliche Subgenotypen und Subtypen, was die Variabilität des HBV nochmals erhöht. Verschiedene Genotypen mit ihren verschiedenen Subgenotypen und Subtypen sind wiederum mit verschiedenen Mutationen assoziiert (Chan et al. 2003) (Lim et al. 2006), s.u..

Genotypen

Die HBV-Genotypen unterscheiden sich zu 8 bis 15 % in ihrer Nukleotidsequenz im gesamten Genom.

Würde nicht die AS-Sequenz des HBV für verschiedene überlappende Gene codieren und würde die Virusreplikation, die -transkription und die Virionassemblierung nicht durch jeweilige bestimmte Faktoren (s.o.) reguliert, so würde die genetische Variabilität noch um einiges höher sein.

Im S-Gen betragen die Unterschiede der Genotypen zueinander durchschnittlich über 4 % (Weber 2004) und auch in der „a“-Determinante des SHBs unterscheiden sich die Genotypen durch spezifische AS-Austausche (siehe Abb. 4), wenn auch in geringerem Maße.

Bis heute gibt es acht gut charakterisierte Genotypen: Genotyp A bis H.

Genotyp G weist folgende Besonderheiten auf: Seine genomische Länge übersteigt mit 3248 bp die der anderen Genotypen (s.o.). Desweiteren weist er zwei Stop-Codons in Position 2 und 28 der Prä-Core-Region auf.

Subgenotypen

Neben den Genotypen sind in letzter Zeit Subgenotypen für die Genotypen A, B und C entdeckt worden (Norder et al. 2004; Tanaka, Mizokami 2006). Deren Bedeutung bedarf jedoch noch weiterer Forschung, auch wenn es Hinweise auf virologische und klinische Relevanz gibt (Tanaka, Mizokami 2006).

Subtypen

Die „a"-Determinante enthält die hauptneutralisierenden Epitope des HBV (Haupt-B-Zell-Epitope) und ist allen HBV-Genotypen gemeinsam aber nicht identisch. Einzelne unterschiedliche Allele im S-Gen in dieser Region ergeben unterschiedliche HBV-Subtypen des jeweiligen Genotyps. Darüber hinaus gibt es in dieser Region mutierte Varianten (Escape-Mutanten), die oft nicht detektierbar, aber von biologischer und klinischer Relevanz sind. Allerdings muß erwähnt werden, daß auch durch Punktmutationen im S-Gen der Subtyp geändert werden kann (Weber *2004*), weshalb ich hier auch die Varianten/Mutanten im Unterpunkt „Subtypen" genannt habe.

Von den Subtypen sind neun gut beschrieben: Diese neun Subtypen werden vom S-Gen codiert an Codon-Position 122 (d/y) und 160 (w/*r).* Folgende Kombination der beschriebenen, bis jetzt bekannten Allele, sind möglich: *d* oder *y* und *w1*-*w4* oder *r*. Das eine Allel schließt hier das jeweils andere aus. Bei *d* befindet sich in Position 122 des SHBs Lysin, bei *y* ist es Arginin; bei den *vier w*- Allelen befindet sich in Position 160 des SHBs Lysin, wobei sich die *vier w*-Determinanten im Wesentlichen in Unterschieden in Position 127 voneinander differenzieren lassen. Der *r*- Subtyp weist Arginin in Position 160 des SHBs auf. So ergeben sich neun gut klassifizierte Subtypen und die vier Hauptsubtypen: *adw*, *ayw*, *adr* und *ayr* des jeweiligen HBV-Genotyps. Bei der Klassifizierung dieser gut definierten Subtypen darf aber nicht vergessen werden, daß weitere existieren wie z.B. solche, die sich in verschiedenen a-Subdeterminanten (a_1, a_2^1, a_2^2, a_3) unterscheiden oder solche, die die Allele *x*, *t*, *q*, *g* aufweisen.

Mutanten (Varianten)

Mutanten sind durch Punktmutationen, Deletionen, Substitutionen und Insertionen erworbene genetische Veränderungen des HBV.
Entstehungsmechanismus und Selektion der Mutanten wurden bereits oben unter 1.5.2 beschrieben. Wichtige Mutationen werden unter 1.5.3 beschrieben.

1.5.3 Auswirkungen der Variabilität von HBV im Einzelnen

Die Variabilität von HBV ist somit in hohem Maße gegeben, nicht nur auf genetischer Ebene (s.o.), und sie hat wie im Folgenden erläutert wird auch in verschiedenster Hinsicht große Relevanz.
Die Auswirkungen der Variabilität ergeben sich aus der Betrachtung ihrer Ursachen (s.o.).

So ist der HBV-Genotyp, -Subgenotyp und -Subtyp in einer bestimmten Population und damit in einer bestimmten geographischen Verteilung besonders häufig:

- Genotyp A in Nord-Europa, Nordamerika, aber auch in Süd-Afrika
- Genotyp B und C in Asien (v.a. Ost- und Südasien)
- Genotyp D in Süd- und Ost-Europa und im Mittleren Osten
- Genotyp E in West-Afrika
- Genotyp F in Zentral- und Süd-Amerika
- Genotyp G: geographische Verteilung noch unklar, häufig in den USA
- Genotyp H: geographische Ausbreitung noch unklar (Genotyp H auf Abb. 7 noch nicht aufgeführt).

Abb. 7: Darstellung der geographischen Verteilung der HBV-Genotypen A-F.
Bild modifiziert aus Schaefer, 2007.

Auf der anderen Seite gibt es Mutanten. Mutanten werden im jeweiligen Wirt selektioniert. Die Mutante, die im jeweiligen Wirt selektioniert wird, beeinflusst den klinischen Verlauf der HBV-Infektion, die Virusresistenz gegenüber einer bestimmten Therapie und die Prognose im jeweiligen Wirt wesentlich. Welche der Mutanten sich durchsetzt, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, z.B. von der Vermehrungsfähigkeit des Virus und dem Immunsystem des Wirts. Das Auftreten von Mutanten ist oft mit einem späten Krankheitsstadium und progressiver Lebererkrankung (Leberzirrhose, hepatocelluläres Carcinom) verbunden. Die Lebenserwartung ist dann meist begrenzt. Bei der Übertragung von Mensch zu Mensch setzt sich jedoch dann meist der HBeAg-positive Wildtyp durch (Gerlich 2002).

Bestimmte Mutanten sind wiederum in bestimmten Genotypen, Subgenotypen und Subtypen häufig oder zum Teil auch einzigartig und umgekehrt. Bestimmte Genotypen treten wiederum in bestimmten Populationen auf, sind also bestimmten Umweltbedingungen ausgesetzt und mit diesen assoziiert, was wiederum Unterschiede in der Krankheit bedingt und auch bestimmte Mutationen selektioniert. So wird die Präcore-Mutation gehäuft bei Genotyp D und B gefunden und ist somit vorherrschend in Südeuropa und Asien.

Der Shift vom Wildtyp-Virus zu Präcore- oder Core-Promoter-Mutanten wurde gehäuft während der Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe beobachtet (Okamoto et al. 1994). Man nimmt an, daß die Mutationen unter dem Druck des Immunsystems entstehen. Der HBV-DNA-Titer war bei HBe-positiven Patienten höher als bei anti-HBe-positiven. HBeAg geht also mit einer höheren replikativen Aktivität einher, was mit einem besseren Ansprechen auf Interferontherapie verbunden ist. Bei anti-HBe-positiven Patienten ist die HBV-Replikation häufig verringert. Häufig ist bei diesen Patienten das Stadium des „gesunden“ HBV-Carriers erreicht, ein Status persistenter Infektion mit nur geringer Leberschädigung, wobei häufig HBsAg im Serum präsent ist (aber nicht immer, s.u.), aber die Anzahl von infektiösen Virionen im Serum viel geringer ist als in der hoch virämischen Phase. Oft gelingt es dem Immunsystem trotz inflammatorischer Aktivität nicht, die Virusvermehrung entscheidend einzudämmen. Durch die daraus resultierende chronische Entzündung ist auf Dauer der daraus resultierende Leberschaden hochgradig. Das Ansprechen auf Interferon ist nun geringer. Außerdem ist die Variabilität von HBV-Epitopen in der chronischen Phase höher, was das Überwinden der Infektion in dieser Phase zusätzlich erschwert.

Auch über die unterschiedlichen Mutationshäufigkeiten und –arten hinaus scheint es einige Unterschiede in der Pathogenität und Virulenz der verschiedenen Genotypen zu geben:
Genotyp C ist häufig mit schwerwiegender chronischer HBV-Infektion assoziiert. Beim hepatocellulären Carcinom (HCC) z.B. findet sich häufig Genotyp C. Bei HBV Genotyp C ist das Verhältnis von HBe-positiven Trägern größer als bei Genotyp B und die Viruslast höher (Hagiwara, Kudo et al. 2006). Außerdem findet bei Genotyp C die Serokonversion zu HBeAg später statt, was zu einer progressiveren, chronischeren Lebererkrankung (Kao, Chen et al. 2004) und zu einem schlechteren therapeutischen Ansprechen führt. Die Unterschiede in Pathogenität und Virulenz gehen also nicht nur mit dem Krankheitsverlauf, dem Übertragungsrisiko und der klinischen Prognose einher, sondern auch mit dem Ansprechen auf antivirale Therapien.
In Asien, wo die Genotypen B und C vorherrschen, ist die perinatale Transmission häufig. In Europa, den USA und Afrika, wo die Genotypen A, D und E vorherrschen, kommt es weniger häufig zu perinatalen HBV-Übertragungen.

Dieses könnte an einer kürzeren hochtitrigen Virämieperiode liegen. Die horizontale Transmission in der frühen Kindheit ist in Afrika häufig (Dusheiko et al. 1985), während in Europa und den USA bei Genotyp D die Transmission über intravenösen Drogengebrauch häufiger ist (Kidd-Ljunggren, Myhre et al. 2004).
HBe-positive Patienten haben in der Regel höhere ALT-Level als anti-HBe-positive Patienten. Bei Genotyp D hingegen finden sich jedoch bei vielen anti-HBe-positiven Patienten auch erhöhte ALT-Level. Genotyp D scheint mit einer höheren Krankheitsaktivität und akuterer kürzerer Krankheit einherzugehen als die anderen Genotypen (Kidd-Ljunggren, Myhre et al. 2004). Dieses trifft in besonderem Maße auch beim Vorhandensein von Mutationen für Genotyp D zu (Kidd-Ljunggren, Myhre et al. 2004). Bei Genotyp D finden sich häufiger anti-HBe-positive Patienten als bei den anderen Genotypen.

1.6 Schutz gegen HBV einschließlich der unterschiedlichen HBV-Formen

Alle verfügbaren Impfungen gegen HBV enthielten und enthalten das SHBs, einige auch MHBs und/oder LHBs. Anti-HBs repräsentiert die humorale Immunantwort gegen SHBs. Dieses betrifft vor allem die immunogene Komponente von SHBs, die a-Determinante. Da sich die HBV-Genotypen um mehr als 8 % in ihrem Gesamt-Genom unterscheiden und in einem niedrigeren Prozentsatz auch in der a-Determinante, ist derzeit nicht klar, inwiefern derzeitige Impfungen, die gegen den Genotyp A entwickelt wurden, auch vor anderen HBV-Genotypen schützen (siehe 1.7).
Hohe Dosen anti-SHBs schützen gegen Neuinfektion mit HBV, worauf auch das Prinzip der Impfungen gegen HBV beruht. Anti-SHBs stellt somit einen neutralisierenden Antikörper dar. Patienten, die gegen HBV geimpft wurden, weisen anti-HBs im Serum auf. Seroprotektion nach Impfung wird angenommen, wenn der anti-HBs-Titer über 10 mIU/ml beträgt (Shouval 2003). Serokonversion zu anti-HBs ist definiert als meßtechnisch noch signifikante anti-HBs-Detektion in einem immunologischen Assay, die bei ungefähr 1 mIU/ml liegt (Shouval 2003). Die Impfung wird üblicherweise zu drei Zeitpunkten appliziert: 0, 1 und 6 Monate. Impflinge, die nach allen drei Impfungen einen anti-HBs-Titer über 2,1 und unter

10 mIU/ml entwickeln, werden als „Hyporesponder“, zwischen 10 und 100 mIU/ml als „Low Responder“ bezeichnet.

Die erste Generation von Impfungen gegen HBV wurde in den späten 70er Jahren in den USA und in Frankreich entwickelt. Das in ihnen enthaltene HBsAg wurde aus Plasma von HBsAg-Trägern gewonnen und durch physikalische und chemische Behandlungen teilzerstört und somit inaktiviert, wobei die französische Variante im Gegensatz zu dem amerikanischen Pendant auch schwankende kleine Mengen an PräS1 und PräS2 enthielt.
Um das Risiko möglicher Infektionen, die mit der Impfung übertragen werden könnten, zu umgehen, wurde als zweite Generation von Impfstoffen gegen HBV rekombinantes in Hefezellen hergestelltes SHBsAg entwickelt. Als am besten untersuchte Beispiele sollen hier Engerix-B (SmithKline Biologicals, Belgium) und Recombivax HB-Vax II (Merck & Co, USA) genannt werden. Beide beinhalten nicht-glykosyliertes SHBs p24 und $Al(OH)_3$ als Adjuvans. Das Problem dieser Impfungen liegt in dem zunehmenden Auftreten und der Selektion von Escape-Mutanten im S-Gen nach Impfung mit SHBs-Antigen oder Behandlung mit HB-Immunglobulin.

1.7 Ziele meiner Arbeit

In meiner Doktorarbeit beschäftige ich mich mit verschiedenen Wildtyp-Genotypen von HBV (Genotyp A, C und D).

1. Infektion durch HBV:

- Unterscheiden sich die HBV- Genotypen in ihrer Infektiosität für primäre Hepatozytenkulturen aus Tupaia-Leber?
- Gibt es Unterschiede in der Infektionskinetik?
- Wieviele GE/ml Virus sind für eine optimale *in-vitro*-Infektion notwendig?

2. Schutz durch Antikörper gegen HBV:

- Unterscheiden sich monoklonale und polyklonale Antikörper im Hinblick auf ihre Inhibitionsfähigkeit gegenüber verschiedenen HBV-Genotypen?
- Welche monoklonalen/polyklonalen Antikörper sind zur Inhibition der verschiedenen HBV-Genotypen am besten geeignet?
- Wieviel IU anti-HBs sind notwendig zur Infektionsinhibition der verschiedenen HBV-Genotypen?
- Gewährt der Schutz gegen den einen HBV-Genotyp auch Schutz gegen den anderen?
- Ist dieser Schutz bei den verschiedenen HBV-Genotypen unterschiedlich stark ausgeprägt?

3. Methodik:

- Welches Zellkulturmedium ist optimal für eine Kultivierung primärer Hepatozyten aus Tupaia-Leber und für eine Infektion/Infektionsinhibition geeignet?
- Optimierung des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

2. Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Isolation primärer Tupaia-Hepatozyten

Tiere:

Tupaia belangeri aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen (gezüchtet von Dr. Dr. K. P. Valerius)

Isolationsmedien und Zusatzstoffe:

Phosphate buffered saline (PBS) (Fa. Invitrogen, Kat.-Nr.: 10010)
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) (Fa. Sigma)
Dulbeccos modified eagle medium (DMEM) (Fa. Invitrogen, Kat.-Nr.: 21063)
Kollagenase Typ IV (Fa.: Sigma, Lot: 054K8635)

2.1.2 Kultivierung primärer Hepatozyten: Wachstumsmedien

Tupaia-Medium:

Basismedium:

Williams E (mit Glutamax I, Fa. Lifetechnologies, Kat-Nr.: 32551)
enthält Zusätze wie Kupfer, Mangan, Zink

Weitere Inhaltsstoffe:

0,1 % Bovines Serum-Albumin (BSA) kristallisiert (Fa. Sigma, A-4378)
1 g/l

ITX-Mix (100 x Stock) (Fa. Gibco, Kat-Nr.: 41400-045):
Insulin, bovin: 0,5 mg/ml
Transferrin, human: 0,5 mg/ml
Natriumselenit: 0,5 µg/ml 10 ml/l

Dexamethason (1000 x Stammlösung) (Fa. Sigma, D-4902)
25 mg in 62,5 ml EtOH abs.
Endkonzentration. 0,1 µM 1 ml/l

Hydrocortison (700 mM Stammlösung) (Fa. Sigma, H-0888)
1 g in 4 ml EtOH abs.

Endkonzentration: 50 µM	75 µl/l
HEPES pH 7,4 (Fa. Sigma, H-0887, 1 M Stock)	
Endkonzentration: 20 mM	20 ml/l
Gentamycin (50 mg/ml Stock)	
(Fa. Gibco, Kat-Nr.: 15750-045)	
Endkonzentration: 100 µl/ml	2 ml/l
Amphotericin B (250 µg/ml Stock)	
Endkonzentration: 0,25 µg/ml	1 ml/l
Dimethylsulfoxid (Fa. Sigma, D-8779)	
Endkonzentration: Anheftungsmedium 2 %	20 ml/l
Infektionsmedium 1 %	10 ml/l
Kupfersulfat $CuSO_4x5H_2O$	
Endkonzentration: 2,5 µg/l	100 µl/l

Hepatocyte Growth Medium (nach Block, GD et al.):

Basismedium:

DMEM (Fa. Invitrogen, Kat-Nr.: 21063-029)	1 l

Weitere Inhaltsstoffe:

ITS-Mix (Fa. Invitrogen, Kat-Nr.: 41400-045)	10 ml
BSA (Fa. Sigma, Kat-Nr.: A-4378)	2 g
Glukose (Fa. Merck, Kat-Nr.: 8337.1000)	2 g
Galaktose (Fa. Merck, Kat-Nr.: 4058)	2 g
Ornithin (Fa. Sigma, Kat-Nr.: 0-6503)	100 mg
Prolin (Fa. Sigma, Kat-Nr.: P-4655)	30 mg
Nicotinamid (Fa. Sigma, Kat-Nr.: N-0636)	610 mg
$ZnCl_2$ (Fa. Fluka, Kat-Nr.: 96469)	1 ml (1000^1 x Stammlösung)
$ZnSO_4$ x 7 H_2O (Fa. Sigma, Kat-Nr.: Z-0251)	1 ml (1000^2 x Stammlösung)
$CuSO_4$ x 5 H_2O (Fa. Sigma, Kat-Nr.: C-8027)	1 ml (1000^3 x Stammlösung)
MnSO4 (Fa. Sigma, Kat-Nr.: M-1144)	100 µl (10000^4 x Stammlösung)

zu 1: 0,54 g $ZnCl_2$ in 1 l H_2O lösen
zu 2: 0,75 g $ZnSO_4$ x 7 H_2O in 1 l H_2O lösen
zu 3: 0,2 g $CuSO_4$ x $5H_2O$ in 1 l H_2O lösen
zu 4: 0,25 g $MnSO_4$ in 1 l H_2O lösen

Glutamax I (5 M; Fa. Invitrogen,Kat-Nr.:35050-038)	10 ml
Dexamethason (Fa. Invitrogen)	100 µl
Gentamycin (50 mg/ml; Fa. Invitrogen, Kat-Nr.:15750-045)	2 ml
Amphotericin B (250 µg/ml; Fa. Invitrogen, Kat-Nr.: 15290-018)	1 ml

2.2 Viruslösungen Infektionsversuche

Die durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation gereinigten Viruspräparationen wurden im Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen von D. Glebe und Mitarbeitern aus dem Plasma von HBV-Trägern hergestellt, durch HBV X-Region LightCycler-PCR (Master-Mix Fa. Roche Kat.-Nr. 03515567) in ihrer Konzentration (GE/ml) bestimmt und zur Verfügung gestellt.

Virus	ID-Nr.	Fraktion	%-Sucrose	Konzentration (GE/ml)
HBV Genotyp A				
HBV Genotyp A	ID 253 A	Fr.6	44 %	$2{,}03 \times 10^{11}$
HBV Genotyp A	ID 253 B	Fr.5	44 %	$1{,}34 \times 10^{11}$
HBV Genotyp A	ID 254	Fr.5	44 %	$6{,}26 \times 10^{10}$
HBV Genotyp C				
HBV Genotyp C	ID 158	Fr.5	44,5 %	$1{,}70 \times 10^{11}$
HBV Genotyp C	ID 158	Fr.6	42,5 %	$6{,}00 \times 10^{11}$
HBV Genotyp D				
HBV Genotyp D	ID 304	Fr.6	43,5 %	$2{,}70 \times 10^{11}$
HBV Genotyp D	ID 304	Fr.7	40,5 %	$1{,}10 \times 10^{11}$
HBV Genotyp D	ID 307	Fr.5	45,5 %	$3{,}80 \times 10^{11}$

2.3 Antikörper Inhibitionsversuche

2.3.1. Monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper wurden aus dem Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen von W. Gerlich zur Verfügung gestellt.

Antikörpername	Konzentration	Domäne	Ursprung
MA 18/07	1 mg/ml	AS 20-23 von PräS1 (Genotyp D)	Maus; JLU (Heermann et al.1984)
C 20/02	1 mg/ml	a-Domäne von S	Maus; JLU (Sobotta et al. 2000)
Q 19/10	0,5 mg/ml	PräS2 (N-Glykosid-abhängig)	Maus; JLU (Waldeck et al. 1988)

2. Polyklonale humane Antiseren

Ursprung der Seren: Humane Spender aus dem Institut für Transfusionsmedizin Suhl GmbH, die mit dem Impfstoff Engerix® geimpft wurden.

Aus den Seren wurden die polyklonalen Antikörper mittels der Natriumsulfatmethode ausgefällt.

Serum (Nr.)	Domäne	Spender	Impfung	Boosterung	HBV-Infektion	Abnahme
1066757	S/PräS	1120381	-	06.02.2002	1982	07.03.2002
1061908	S	1118894	25.01.2002	-	-	08.03.2002
1066834	S	1109569	23.10.1997	26.11.2001	-	08.03.2002
1061781	S	1105874	31.07.1999	23.08.2000	-	06.03.2002
1061783	S	1075536	13.02.2002		-	06.03.2002
1061798	S	1113447	19.02.2002		-	06.03.2002
1066594	S	1099510	26.02.2001	27.02.2002	-	06.03.2002

Desweiteren wurden zwei Seren aus anderen Quellen zur Verfügung gestellt (JLU Gießen und Universität Göttingen), aus denen ebenfalls die polyklonalen

Antikörper gefällt wurden. ID 287 ist ein Negativserum, das keine Antikörper gegen HBV enthält.

Serum (Nr.)	Domäne	Ursprung
ID 287	Negativserum	JLU Gießen
ID 155	S und PräS	Universität Göttingen

2.4 Proteinfällung (Fällung von polyklonalen Antikörpern aus Seren)

Fällung von polyklonalen Antikörpern aus Seren:

Na PP-Puffer: 0,2 M pH 7,2:

Na_2HPO_4	6,8 ml 1 M
NaH_2PO_4	3,1 ml 1 M
Bidest	auf insgesamt 50 ml auffüllen
sterilfiltrieren	

Natriumsulfat: 36 % w/w:

Natriumsulfat	36 g
Bidest	64 g
15 Min. rühren	
dann Bodensatz absetzen lassen	
und sterilfiltrieren	

Das Bidest stammt jeweils aus der Reinstwasseranlage des Instituts für Medizinische Virologie der JLU Gießen.

Die Immunglobulinfällungen aus den Seren Nummer 1066757, 1061908, 1066834, ID 155 und die meisten Immunglobulinfällungen aus dem Serum ID 287 wurden von Ch. Prinz, Doktorand am Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen ausgeführt.

2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE):

Novex-12 % Tris Bis Gel (Fa. Invitrogen; 17 Well, 1 mm)

Puffer: MOPS 20x

MOPS	104,6 g
Tris	60,6 g
SDS	10,0 g
EDTA	3,0 g
Reinstwasser	ad 500 ml
pH 7,7	

Proteinstandard (Sea-Blue®) (Fa. Invitrogen)

2xSB	10 µl/Well
10 % DTT (Fa. Sigma)	2 µl/Well
Antioxidans (Fa. Invitrogen, Lot: 1323219)	500 µl

Coomassie-Färbung:

Fixierlösung:	
50 % Methanol, 15 % Essigsäure in Wasser	1 (2) Stunden
Coomassie Brillant Blue R250 Färbelösung:	
0,2 % Coomassie Blue in 50 % Methanol	
15 % Essigsäure	1,75 (4) Stunden
Entfärber:	
15 % Methanol, 5 % Essigsäure in Wasser	3 (2) Stunden
H_2O	30 Minuten

2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA):

Nunc-MaxiSorp®-Platte:

Die Platte hat zu Molekülen mit sowohl hydrophilen, als auch hydrophoben Eigenschaften hohe Affinität. Sie weist 96 Wells auf und besitzt ein Volumen von 400 µl/Well.

Beschichtungspuffer (NaPP):

NaCl	183 mM
$Na_2HPO_4xH_2O$	8,6 mM
KH_2PO_4	2,2 mM

einstellen auf pH 7,4

Tris-Natrium-EDTA (TNE)-Puffer:

Tris-HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	140 mM
EDTA	1 mM

Waschlösungen:

0,1 % Tween 20/PBS

PBS

10 % FKS in TNE

PBS:

NaCl	100 g/170 mM
KCl	2,5 g/3,3 mM
$Na_2HPO_4xH_2O$	18,02 g/10 mM
KH_2PO_4	2,5 g/1,8 mM
Bidest	10 l

pH 7,4

Casein-Lösung:

0,1 % Casein (Fa. Pierce) in PBS

OPD-Substrat:

o-Phenylendiamin	
(Fa. DakoCytomation)	2 Tbl.
Bidest	6 ml
Wasserstoffperoxid	2,5 µl

(Fa. Merck Art.7209)

Abstopp-Lösung:

Schwefelsäure	1 N

2.6.1 SHBs-ELISA

Beschichtungs-Antikörper:

Als Antikörper dient C 20/02 (s.o.)	1:1000

Peroxidase-Konjugat:
anti-HBs-POD (Dade Behring AG Marburg):
affinitätsgereinigter polyvalenter Antikörper aus Ziegenserum

2.6.2 SHBs-ELISA: Austestung verschiedener Peroxidase-Substrate

Verschiedene Peroxidase-Substrate:

OPD Tabletten (Fa. DakoCytomation) 2 mg: o-Phenylendiamin; Edition 15.08.03 Code No. S 2045

ABTS Tabletten (Fa. Roche): jew. 50 mg ABTS; Cat.No. 1 204 521

Solvent for ABTS (Fa. Roche): Natriumperborat, Zitronensäure und Dinatrium-hydrogenphosphat; Cat.No. 1 112 597

BM Blue POD (Fa. Roche): 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine ready-to-use-solution; Cat.No. 1 484 281

3. Methoden

3.1 Isolation primärer Hepatozyten und Zellkultur

Die primären Hepatozyten, an denen sämtliche Infektions- und Infektionsinhibitionsversuche durchgeführt wurden, wurden aus der Leber von Tupaia belangeri gewonnen. Tupaias sind Säugetiere (Ordnung: Scandentia, Familie: Tupaiidae), die auf Bäumen in den tropischen Wäldern Südasiens leben. Die Tiere werden im Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen gezüchtet (Dr. Dr. K.P. Valerius). Das Zellkulturmodell leitet sich von der 1976 von Seglen beschriebenen Präparation von Zellen aus Leber durch die Zwei-Stufen-Kollagenase-Methode ab. Tupaias sind die einzigen Tiere außerhalb den Primaten, die für HBV empfänglich sind.

Vorgehen: Nachdem das Tier aus dem Tierstall in das Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen transportiert wurde, wird es im abgedunkelten Transportkäfig zunächst ca.15 Minuten in einer ruhigen Ecke des Labors belassen, damit es den transportbedingten Streß abbauen kann. Anschließend wird es ca. 10 Min. mit CO_2 begast. Um sich des Todes des Tieres und damit des Verhinderns von Leid für das Tier sicher sein zu können, wird danach zusätzlich dessen Genick gebrochen. Zur Desinfektion des toten Tieres wird es ca. 2 Min. in 70 % Ethanol gelegt.

Anschließend wird es auf einer Styroporplatte in Rückenlage an den oberen und unteren Extremitäten mittels Stecknadeln fixiert.

Das Fell wird beginnend am Abdomen vorsichtig abgezogen und eine Operations-Folie über diesen Bereich geklebt. Das Abdomen wird an der Linia alba eröffnet. Dann erfolgt die Eröffnung des Brustkorbs. Mittels einer Braunüle (22 G, Vasoscan) wird die Pfortader punktiert. Der richtige Sitz der Braunüle wird überprüft, indem sie mit 10-20 ml PBS und 50 mM EGTA durchspült wird. Um die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte zu erreichen und eine Thrombosierung der Leberkapillaren zu verhindern, darf das PBS keine Ca^{2+}-Ionen enthalten. Bei korrekter Braunülenlokalisation, die sich am Aufhellen der Leberoberfläche während des Spülvorganges zeigt, wird diese mittels einer Klemme fixiert. Die hepatischen Ligamente und Gefäße werden durchtrennt, das Tier hepatektomiert und die Leber mitsamt Braunüle auf einen Büchnertrichter verbracht. Hier erfolgt die eigentlich zum Ziel führende transportale Leberperfusion mit oben genannter PBS/50 mM EGTA-Lösung, wobei diese auch hier Raumtemperatur aufweisen,

und das Perfusionsvolumen 10 ml/Min. nicht überschreiten sollte. Das ablaufende PBS wird verworfen. Das Organ hellt nun vollständig auf. Die Nachspülung erfolgt mit raumtemperiertem PBS ohne EGTA bei einem Strom von maximal 10 ml/Min. und Verwerfen des Ablaufs. Dann erfolgt die Kollagenasebehandlung der Leber. Hierzu löst man zunächst 100 mg Kollagenase IV (Fa. Sigma) in 200 ml DMEM ohne Bikarbonat oder Phenolrot, führt eine Sterilfiltration durch (Stericup-Filter, Fa. Millipore, Porengröße 0,22 µm) und erwärmt die Lösung im Wasserbad auf 37°C. Im rezirkulierenden System mit Pumpe wird die Leber anschließend mit einem Druck von maximal 10 ml/Min. ca. 20 Min. mit der Kollagenaselösung perfundiert bis zur Zerstörung der bindegewebigen Leberstruktur. Das nun aufgelockerte Organ wird in eine Zellkulturschale unter die Sterilbank verbracht, die Gallenblase entfernt und die Leber mithilfe zweier Einmalskalpelle zerkleinert. Die Leberzellstücke werden zusammen mit Kollagenase-DMEM-Lösung in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben und 10 Min. bei 37°C und 80 rpm auf einem Rüttelbrett geschüttelt. Die Lebersuspension wird durch eine Siebdruckgaze (210 µm Porengröße, Fa. Koenen Siebdrucktechnik) gegeben, um überschüssige Gewebeteilchen abzutrennen, und das Filtrat gleichmäßig auf 4°C vorgekühlte Falcon-Röhrchen verteilt und unter der Sterilbank auf Eis gestellt. Danach wird es in einer auf 4°C heruntergekühlten Eppendorf-Zentrifuge (581 R, Rotor A4-62) mit 40xg 5 Min. zentrifugiert, um die Kollagenase und die zellulären Elemente, die keine Hepatozyten darstellen (Erythrozyten u.a.), abzutrennen. Der Überstand wird vorsichtig mit dem abgeflammten Sauger entnommen, verworfen und das verbliebene Zellpellet in 10 ml eiskaltem DMEM resuspendiert und dann auf jew. 45 ml DMEM aufgefüllt. Dann erfolgen zwei erneute Zentrifugationsschritte mit oben genannten Parametern. Das letzte Pellet wird je nach Pelletgröße in 5-10 ml eiskaltem DMEM resuspendiert. Anschließend werden alle Resuspendate in ein bis zwei Falconröhrchen zusammengeführt.

Abschließend erfolgt die Vitalitätsprüfung der Zellausbeute. Hierzu bringt man einen Tropfen (ca. 40 µl) Zellsuspension auf einen Objektträger auf und mischt diese mit derselben Menge Trypanblau. Die Zellkerne avitaler Zellen färben sich blau. Die Lebendzellausbeute liegt im Durchschnitt zwischen 90 und 95 %.

Zum Ausplattieren, welches sofort nach der Zellgewinnung geschieht, schwemmt man die Zellsuspension in 37°C warmem Wachstumsmedium (Tup.Med./1%DMSO oder HGM) auf. Es handelte sich um 12-Well-Zellkulturschalen. In jedem Well befanden sich ca. 10^5 Zellen. Um eine optimale

Anheftung der Zellen an die Zellkulturplatten zu erreichen, wurden die Wells vorher mit Kollagen (0,8 mg/ml) behandelt. Hierbei handelte es sich um Typ I-Rattenschwanz-Kollagen der Fa. BD Biosciences (Kat.-Nr. 354236). Die Hepatozyten-Zellkulturschalen wurden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.
Am nächsten Tag wurde das Medium durch Medium ohne FKS gewechselt. Hierzu muß unter optimalen Sterilitätsbedingungen und unter der Sicherheitswerkbank gearbeitet werden. Desweiteren handelt es sich um in jeder Hinsicht sehr empfindliche Zellen; Austrocknung, geringste Änderungen in der Zusammensetzung des Mediums oder geringste Milieuänderungen führen zum Tod der Zellen.
Der weitere Mediumwechsel erfolgte dann alle drei Tage. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2.

3.2 Sandwich-ELISA zur Charakterisierung von viralen Oberflächenproteinen

Dieser wurde im Hinblick auf die nachfolgenden Infektionsversuche und deren Auswertung durchgeführt. Es galt zu klären, ob sich der S-ELISA als Methode eignet, das post infectionem (bei Infektion durch die verschiedenen Genotypen) nachweisbare HBsAg zu detektieren und zu klären, wieviel HBsAg die jeweilige Viruspräparation enthält. Hierzu wurden 3 µl der jeweiligen Virusfraktion des jeweiligen Genotypen in 127 µl Casein 1 % (Fa. Pierce) gegeben und jeweils in 1:2-Verdünnungsschritten in Casein 0,5 % bishin zur 1:16- Verdünnung verdünnt.
Desweiteren wurde eine HBsAg-Standardreihe und mehrere Leerwerte pipettiert.
Zur Zuordnung der Proben zu den Meßwerten und deren Auswertung siehe Teil „Ergebnisse“. Zu den einzelnen Arbeitsschritten beim S-ELISA siehe unten in diesem Teil (Punkt 3.6).

3.3 Proteinfällung (Fällung von polyklonalen Antikörpern aus Seren)

Die Fällung der polyklonalen Antikörper aus den Patientensera aus dem Institut für Transfusionsmedizin Suhl GmbH, erfolgte mit der Natriumsulfatmethode, mit der

es gelingt, unspezifische Proteine im Serum, wie etwa Albumin, von den für die Inhibitionsversuche interessierenden polyklonalen Antikörpern (IgG) weitgehend abzutrennen.

Es wurden 200 µl Hyperimmunserum mit 200 µl 0,2 M Phosphatpuffer gemischt. Dann wurden 400 µl Natriumsulfat langsam hinzugegeben (hineingetropft), das Ganze durch langsames Aufziehen und Ablassen mit der Pipette gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann erfolgte die Zentrifugation mit der Eppendorf-Zentrifuge (5417 R): 1 Minute bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde langsam abpipettiert und verworfen. Das übrigbleibende Pellet wurde vollständig in 200 µl 0,1 M NaPP gelöst.

Dann folgten zwei weitere Fällungen mit 200 µl Natriumsulfat mit oben genannten Schritten. Das letzte Pellet wurde in 0,1 M NaPP-Lösung gelöst und der IgG-Anteil photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, wobei 1,35 OD_{280} einer IgG-Konzentration von 1 mg/ml entspricht.

3.4 Gelelektrophorese von den IgG-Fällungen aus den polyklonalen Patientenseren

Die Gelelektrophorese der Fällungen im Novex-12 %-Tris Bis Gel erfolgte, um den Erfolg der Proteinfällung mit der Natriumsulfatmethode zu demonstrieren. Es kann hier zwischen anderen Serumproteinen, schweren Ketten der Immunglobuline und leichten Ketten der Immunglobuline differenziert werden (siehe „Ergebnisse“).

In silikonisierte 0,5er Eppendorf-Gefäße wurden die gewählten Mengen der Fällungen hineinpipettiert, die wahrscheinlich ein sinnvolles Signal erzeugen würden. Dann wurde die berechnete jeweilige Menge an H_2O hinzugefügt, die so gewählt wurde, daß am Ende ein Gesamtvolumen von 20 µl im Eppendorf-Gefäß enthalten war.

In jedes Gefäß wurden dann 10 µl 2 x SB und 2 µl 10 % DTT pipettiert, die Proben gevortext, für 10 Minuten in den 70°C warmen Heizblock gestellt und anschließend herunterzentrifugiert. Dann erfolgte das Einpipettieren von jeweils 20 µl der Proben bzw. des Markers in die Taschen des Novex®-Gels. Die Spannung wurde zunächst ein paar Sekunden auf 100 V eingestellt, dann auf 200 V. Die Stromstärke lag bei 115 mA.

Nach dem Ende des Gellaufs wurde die Coomassie-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde das Gel zunächst 1-2 h in Fixierlösung unter ständigem Schütteln, dann 2 h auf dem Schüttler in die Coomassie-Färbelösung eingelegt. Jetzt folgte die 3-stündige Behandlung des schüttelnden Gels mit Entfärberlösung, wodurch die Proteinspuren besser differenzierbar werden. Dann wurde das Gel in Wasser gespült und abschließend eingescannt.

3.5 Infektions- und Infektionsinhibitionsversuche

Die Infektion der primären Hepatozyten erfolgte an Tag 2 nach dem Ausplattieren in 12-Well-Schalen. In jedem Well befanden sich ca. 10^5 Zellen. An Tag 0, 3, 6, 9 und 12 post infectionem wurden die Zellüberstände abgenommen, bei -25°C eingefroren und gegen jeweils 600 µl neues Zellkulturmedium ausgetauscht.
Die Inhibitionsversuche wurden mit den im Teil "Material" beschriebenen monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörpern durchgeführt. Es erfolgte eine Vorinkubation der Antikörper mit dem jeweiligen Virus. Das Gemisch wurde dann nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit (s.u.) auf die Zellen gegeben. An Tag 0, 3, 6, 9 und 12 nach Versuchsstart wurden die Zellüberstände abgenommen, bei -25°C eingefroren und gegen 600 µl neues Medium ausgetauscht.

Vergleich zweier Kultivierungsmedien im Hinblick auf die Infektionsfähigkeit von HBV Genotyp D und Infektionsinhibition durch drei verschiedene monoklonale Antikörper

In diesem Versuch sollte zunächst gezeigt werden, daß die in-vitro-Infektion von primären Hepatozyten mit gereinigtem HBV gelingt, und in welcher Viruskonzentration am besten. Dieses sollte zunächst mit HBV-Genotyp D getestet werden, der schon bei anderen Versuchen der Arbeitsgruppe verwendet worden war. Desweiteren sollte mit diesem Versuch geklärt werden, ob es im Hinblick auf den Infektionserfolg Unterschiede bei der Verwendung verschiedener spezifischer Zellkulturmedien gibt. Ein weiteres Anliegen war es zu klären, ob eine Infektionsinhibition gelingt. Diese wurde zunächst mit monoklonalen Antikörpern gegen die drei Hauptdomänen des HBsAg: S, PräS1 und PräS2 durchgeführt.

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Sicherheitswerkbank unter optimalen Sterilitätsbedingungen.

Für die erste Platte wurden verschiedene Konzentrationsstufen von dem Virus ID 307 Fr.5 (Konzentration: $3{,}8x10^{11}$GE), Genotyp D, jeweils im Doppelansatz in Tup.Med./1%DMSO in Form von Verdünnungsreihen hergestellt. Es entstanden so Doppelansätze folgender Konzentrationsstufen: $1x10^{9}$GE, $1x10^{8}$GE, $1x10^{7}$GE, $1x10^{6}$GE, $1x10^{5}$GE und zwei Negativproben (jeweils 300 µl Tup.Med/1%DMSO). Die insgesamt 12 Proben wurden in Eppendorf-Gefäßen auf Eis hergestellt. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten wurden die Eppendorf-Gefäße mittels Tisch-Vortexgerät gevortext und mittels Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die 12 Eppendorf-Gefäße für eine Stunde in den Warmraum (37°C) gestellt.

Dann wurde Well by Well das Medium (Tup.Med./1%DMSO) abgezogen und durch 300 µl Infektionslösung des entsprechenden Eppendorf-Gefäßes ersetzt. Die Platte wurde dann sofort zurück in den Brutschrank gestellt.

Die Herstellung der Verdünnungsreihe soll hier einmal exemplarisch für die anderen Virusverdünnungsreihen, die analog hierzu erfolgen, dargestellt werden:

ID 307 Fr.5 (HBV-Genotyp D) Konzentration: $3{,}8x10^{11}$GE/ml

1.) 3,5 µl Virusstock + 396,5 µl Tup.Med./1%DMSO = 400 µl

400 µl enthalten $1{,}3x10^{9}$GE

300 µl enthalten $1x10^{9}$ GE

2.) 40 µl von 1.) + 360 µl Tup.Med./1%DMSO — 300 µl enthalten $1x10^{8}$GE

3.) 40 µl von 2.) + 360 µl TupMed./1%DMSO — 300 µl enthalten $1x10^{7}$GE

4.) 40 µl von 3.) + 360 µl Tup.Med./1%DMSO — 300 µl enthalten $1x10^{6}$GE

5.) 40 µl von 4.) + 360 µl Tup.Med./1%DMSO — 300 µl enthalten $1x10^{5}$GE.

Für die zweite Platte wurde wie für die erste verfahren. Jedoch handelte es sich hier um das Zellkulturmedium HGM.

Für die dritte Platte wurden im Doppelansatz jeweils Antikörper-Virusgemische in Tup.Med./1%DMSO in Eppendorf-Gefäßen hergestellt. Bei dem Virus handelte es sich ebenfalls um HBV Genotyp D ID 307 Fr.5 (Konzentration: $3{,}8x10^{11}$GE/ml). Bei den monoklonalen Antikörpern handelte es sich um anti-PräS1: MA 18/07 (1 mg/ml); anti-PräS2: Q 19/10 (0,5 mg/ml) und anti-S: C 20/02 (1 mg/ml). Es wurden für die Versuche eine Virusmenge von $1x10^{8}$GE in 300 µl und eine jeweilige Antikörpermenge von 2 µg eingesetzt. Leer- bzw. Negativwerte bestanden jeweils aus 300 µl Tup.Med./1%DMSO.

Die Antikörper-Virusgemische wurden eine Stunde im Warmraum stehend inkubiert und anschließend Well by Well das Zellkulturmedium gegen das jeweilige Antikörper-Virusgemisch ersetzt. Für die dritte Platte wurde Tup.Med./1%DMSO als Zellkulturmedium verwendet, da dieses bis zu diesem Zeitpunkt das übliche in der Arbeitsgruppe verwendete Medium darstellte. Die Antikörper-Virusgemische wurden 12 Stunden auf den Zellen belassen.

Infektion: Infektiosität der verschiedenen Genotypen und deren Fraktionen

Es wurden die Genotypen A, C und D und ihre Virusfraktionen auf ihre Infektiosität getestet. Dafür wurden von jeder Fraktion im Doppelansatz jeweils folgende Konzentrationen in die Infektionsversuche eingesetzt:

$5x10^8$GE in 300 µl

$5x10^7$GE in 300 µl

$5x10^6$GE in 300 µl.

Diese wurden durch 1:10-Verdünnung aus der jeweils vorherigen Konzentrationsstufe erzielt. Nach jeder Verdünnungsstufe wurde die Probe gevortext und zentrifugiert.

Die Versuche wurden in HGM als Wachstumsmedium durchgeführt. Als Leerwerte wurden jeweils 300 µl HGM eingesetzt.

Die hergestellten Viruslösungen wurden schließlich eine Stunde im Warmraum stehend inkubiert und dann Well by Well gegen das sich vorher in den Wells befindende HGM ausgetauscht. Dann wurden die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert. Das Virus wurde 12 Stunden auf den Zellen belassen.

Infektionsinhibition der drei Genotypen A, C und D mit dem Hyperimmunserum 1066834 in mehreren Versuchen:

Folgende HBV-Präparate wurden verwendet:

Genotyp A: ID 253 A

Genotyp C: ID 158 Fr.5

Genotyp D: ID 304 Fr.6

Es wurde eine biologische Virusaktivität in Form der gemessenen HBeAg-Produktion von jeweils 10 S/Co-Einheiten HBeAg in die Versuche eingesetzt. Im Infektionsversuch mit den acht Virusfraktionen (siehe Ergebnisteil) konnte gesehen werden, daß bei Einsetzen von jeweils $5x10^8$ GE, d.h. 3,3 µl von ID 253 A, 4 µl von ID 158 Fr.5 und 2,5 µl von ID 304 Fr.6 gute Infektionserfolge (HBeAg-

Produktion) zu erzielen sind. Um die Viren vergleichbar zu machen, mußte eine Eichung stattfinden. Dieses geschah anhand der Einführung des Begriffes der biologischen Virusaktivität. Zum Berechnen der biologischen Aktivität wurde das HBeAg-Signal von Tag 12 (T12) von $5x10^8$ GE (siehe Tab. 6) durch die eingesetzte µl-Menge des Viruspräparats (siehe Tab. 7, 8 und 9) dividiert. Das Ergebnis waren die auf S. 67 genannten Werte der biologischen Virusaktivität. Für die weiteren Infektions-/Infektionsinhibitionsexperimente wurde dann die Virusmenge eingesetzt, die an Tag 12 post infectionem einen Wert von 10 S/Co-Einheiten HBeAg produziert.

Von dem Serum 1066834 wurden folgende anti-HBs-Mengen in Form von Verdünnungsreihen (1:10-Verdünnungen) im Doppelansatz in die Inhibitionsversuche eingesetzt:

1000 IU
100 IU
10 IU
1 IU
0,1IU
0 IU.

Um unterschiedliche Protein-Mengen an IgG, die durch unterschiedliche Aktivitätsgrade des Serums während den Verdünnungsreihen zwangsläufig entstehen, auszugleichen, wurden die fehlenden µg-Mengen durch das entsprechende IgG eines Negativserums (ID 287; 7,9 mg/ml) ausgeglichen. Die fehlenden Volumenmengen wurden durch entsprechende Volumina von HGM ausgeglichen.

Die Antikörper-Virus-Gemische wurden nach dem Pipettieren eine Stunde im Warmraum stehend inkubiert und dann Well by Well gegen das sich vorher in den Wells befindende HGM ausgetauscht. Dann wurden die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert. Die Antikörper-Virusgemische wurden 12 Stunden auf den Zellen belassen.

Infektionsinhibition der drei Genotypen A, C und D mit dem monoklonalen Antikörper MA 18/07 gegen PräS1:

Im Falle der Viren wurde wie oben verfahren, d.h. eine HBeAg-Produktivität von jeweils 10 S/Co-Einheiten HBeAg eingesetzt. Von MA 18/07 (1 mg/ml) wurden im Doppelansatz jeweils

2 µg
0,2 µg
0,02 µg
0,002 µg
0,0002 µg
0,00002 µg
in 300 µl eingesetzt.
Die fehlenden Protein-Mengen an IgG wurden durch IgG eines Negativserums (ID 287; 7,9 mg/ml) ausgeglichen. Die fehlenden Volumenmengen wurden durch entsprechende Volumina von HGM ausgeglichen.
Die Antikörper-Virus-Gemische wurden nach dem Pipettieren eine Stunde im Warmraum stehend inkubiert und dann Well by Well gegen das sich vorher in den Wells befindende HGM ausgetauscht. Dann wurden die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert. Als Inhibitions-/Kultivierungsmedium wurde auch hier HGM verwendet.

Infektionsinhibition der drei Genotypen A, C und D mit dem monoklonalen Antikörper C 20/02 gegen S:

Im Falle der Viren wurde wie oben verfahren, d.h. eine HBeAg-Produktivität von jeweils 10 S/Co-Einheiten HBeAg eingesetzt. Von C 20/02 (1 mg/ml) wurden im Doppelansatz jeweils
0,2 µg
0,02 µg
0,002 µg
0,0002 µg
0,00002 µg
0,000002 µg
in 300 µl eingesetzt.
Die fehlenden Protein-Mengen wurden durch IgG eines Negativserums (ID 287; 7,9 mg/ml) ausgeglichen. Die fehlenden Volumenmengen wurden durch entsprechende Volumina von HGM ausgeglichen.
Die Antikörper-Virus-Gemische wurden nach dem Pipettieren eine Stunde im Warmraum stehend inkubiert und dann Well by Well gegen das sich vorher in den Wells befindende HGM ausgetauscht. Dann wurden die Zellen im Brutschrank

weiter kultiviert. Als Inhibitions-/Kultivierungsmedium diente HGM. Die Antikörper-Virusgemische wurden 12 Stunden auf den Zellen belassen.

3.6 ELISA

3.6.1 SHBs-ELISA von den Zellüberständen der Infektions- bzw. Infektionsinhibitionsversuche

HBsAg-ELISA wurden von den während der Infektions- bzw. Inhibitionsversuche abgenommenen Zellüberständen durchgeführt, um die im Rahmen des Versuchs stattgefundene Neuproduktion von HBsAg zu quantifizieren. Als sensitive Methode ist der ELISA hier besonders geeignet, wie schon für die acht entsprechenden Virusfraktionen vorher bewiesen wurde.

Einen Tag vor Beginn des ELISA wurden die Nunc-MaxiSorp-Platten mit jeweils 50 µl/Well des anti-SHBs-Antikörpers C 20/02 (Ausgangskonzentration 1 mg/ml; Verdünnung in Beschichtungs-Puffer hier 1:1000) beschichtet und über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Platte mittels ELISA-Washer (Fa. Tecan) zweimal mit PBS/0,1% Tween 20 und zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluß daran ebenfalls mittels ELISA-Washer mit 50 µl/Well 10% FKS in TNE beschichtet. Letzteres verhindert ein unspezifisches Bindungsverhalten. Die beschichtete Platte wurde dann für zwei Stunden im Warmraum (37°C) im Plattenrüttler inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschritt am ELISA-Washer, jetzt zweimal mit PBS.

Jetzt wurden die Zellüberstände auf der ELISA-Platte mit jeweils 50 µl/Well einpipettiert. Dann folgte das Pipettieren der Standardreihe und der negativen Kontrollen. Das in die Platte einpipettierte Volumen betrug hierbei ebenfalls jeweils 50 µl/Well. Die Standardreihe bestand aus Verdünnungsstufen von gereinigtem HBsAg aus Serum, wobei die Ausgangskonzentration von 0,4 ng/50µl in insgesamt 8 Verdünnungsstufen jeweils 1:2 in 0,1 % Casein verdünnt wurde. Die Platte wurde dann über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert.

Am darauffolgenden Morgen erfolgte das Waschen der Platte mittels ELISA-Washer zweimal mit PBS/0,1% Tween 20 und zweimal mit PBS. Dann wurden jeweils 50 µl des zweiten Antikörpers, anti-HBs/POD (Ausgangskonzentration 1 mg/ml; Verdünnung in PBS und 1% Casein hier: 1:1000), in jedes Well gegeben,

die Platte eine Stunde im Warmraum auf dem Plattenrüttler inkubiert und anschließend zweimal mit PBS/0,1% Tween 20 und zweimal mit PBS mittels ELISA-Washer gewaschen. Dann folgte die Beschichtung der Platte mit OPD-Substrat (Inhaltsstoffe und Mischungsverhältnis siehe „Material“), um die Farbreaktion sichtbar zu machen. Die Platte wurde daraufhin unter Lichtabschluss im Warmraum auf dem Plattenrüttler 20 Minuten inkubiert. Dann wurde die Farbreaktion mit 1 N Schwefelsäure 50 µl/Well unter dem Abzug abgestoppt, die Platte im Microtiter-Photometer (Typ Sunrise, Fa.Tecan, ID: 2008805) gemessen (Measurement-Filter: 492 nm; Reference-Filter: 620 nm) und die Werte ausgedruckt.

3.6.2 SHBs-ELISA: Austestung verschiedener Peroxidase-Substrate

Ziel war es, die Sensitivität eben beschriebener ELISA zu erhöhen. Dazu wurden drei unterschiedliche Peroxidase-Substrate gegeneinander getestet, und zwar die bereits verwendeten OPD Tabletten (Fa. DakoCytomation) gegen ABTS Tabletten (Fa. Roche) und BM Blue POD (Fa. Roche).

Als Proben dienten Verdünnungsreihen mit 1:2-Verdünnungsschritten von HBsAg (Ausgangs-Konzentration: 8 ng/ml). Es ergaben sich so jeweils HBsAg-Konzentrationen von 4 ng/ml bis 0,00005 ng/ml. Desweiteren wurden jeweils 16 Leerwerte pipettiert.

Der HBsAg-ELISA wurde bis zur Hinzugabe des Peroxidase-Substrats wie oben beschrieben durchgeführt. Gewaschen wurde jedoch mit PBS/0,5% Tween 20, anstatt mit PBS/0,1% Tween 20, um einen Sicherheitsabstand zu haben und damit zu gewährleisten, daß beim Waschen mit PBS/0,1% Tween 20 auf jeden Fall ein sicheres Signal erzeugt wird.

Die Herstellung und Meßparameter des OPD-Substrats wurden oben bereits erläutert.

Für die Herstellung des ABTS-Substrats wurden 5 ml 10 x ABTS Puffer auf 50 ml mit Bidest aufgefüllt. Von der Lösung wurden 5 ml pipettiert und hierin eine ABTS Tablette gelöst. Es wurden jeweils 50 µl in die Wells der ELISA-Platte gegeben und diese eine halbe Stunde auf dem Plattenrüttler inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend nicht abgestoppt (hier nicht notwendig). Die Messung erfolgte am

Photometer mit folgenden Parametern: Measurement-Filter: 405 nm gegen Reference-Filter: 492 nm.

Von BM blue wurden jeweils 50 µl/Well pipettiert, die Platte 10-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und die Reaktion anschließend mit 1 N H_2SO_4 (50 µl/Well) abgestoppt. Die Messung erfolgte mit folgenden Parametern: Measurement-Filter: 450 nm; Reference-Filter: 690 nm.

3.7 HBeAg-Bestimmung

Die HBeAg-Bestimmung als Marker für die Infektiosität der verschiedenen in die Infektions- und Inhibitionsversuche eingesetzten HBV-Genotypen, wurde durch das diagnostische Labor des Virologischen Instituts der JLU Gießen mit dem Testsystem AxSym der Fa. Abbott Diagnostics, Wiesbaden, durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der verwendeten Viruspräparate und Antikörper

Im ersten Teil der Ergebnisse wurden die nachher in die Infektions- und Inhibitionsversuche einzusetzenden Viren, Seren und Antikörper qualitativ und quantitativ charakterisiert. Tabelle 1 zeigt die wesentlichen Daten.

Tab.1: Durch LightCycler-PCR bestimmte Anzahl an Genomäquivalenten GE/ml sowie die in Tab. 2 bestimmte HBsAg-Konzentration einschließlich der Mittelwerte der HBsAg-Konzentration der Präparate.

Genotyp A

Virusfraktion	HBV-DNA-Konzentration (GE/ml)	Mittelwert HBsAg (ng/ml) x 43,3		ng HBsAg/ 10^{11} GE
ID 253 A	$2,03x10^{11}$	488	21130	10400
ID 253 B	$1,34x10^{11}$	194	8400	6270
ID 254	$6,26x10^{10}$	103	4460	7124

Genotyp C

Virusfraktion	HBV-DNA-Konzentration (GE/ml)	Mittelwert HBsAg (ng/ml) x 43,3		ng HBsAg/ 10^{11} GE
ID 158 Fr.5	$1,70x10^{11}$	2,7	117	68,8
ID 158 Fr.6	$6,00x10^{11}$	123	5330	888

Genotyp D

Virusfraktion	HBV-DNA-Konzentration (GE/ml)	Mittelwert HBsAg (ng/ml) x 43,3		ng HBsAg/ 10^{11} GE
ID 304 Fr.6	$2,70x10^{11}$	22,4	970	359
ID 304 Fr.7	$1,10x10^{11}$	664	28750	26100
ID 307 Fr.5	$3,8x10^{11}$	370	16020	4220

SHBs-ELISA der Virusfraktionen

Der S-ELISA von den acht Virusfraktionen wurde angefertigt, um zu untersuchen wie hoch die Menge an HBsAg in den Viruspräparationen (Virusaufreinigungen) ist. Dieses geschah im Hinblick auf den späteren Einsatz der Viruspräparationen in die Infektionsversuche. Das Ergebnis war stark von der Verdünnung abhängig. Für die Bestimmung der Mittelwerte wurden nur Werte aus dem annähernd linearen Meßbereich verwendet.

Tab. 2: Gehalt an HBsAg in ng/ml in den verschiedenen HBV-Präparationen. Es wurden jeweils 3 µl Viruslösung in 127 µl 1% Casein in den Versuch eingesetzt und dann in Zweierstufen weiterverdünnt. Zur Auswertung des HBsAg der acht Virusfraktionen wurde der 2-fache Wert des höchsten Negativwertes als Cut-off-Wert festgelegt. Bei den Feldern, in die kein Zahlenwert eingetragen wurde, liegt der Zahlenwert außerhalb des Meßbereichs. Die zweite Zahl pro Feld gibt den Wert nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor an.

HBsAg	**Verdünnung**	**ID 253 A Genotyp A**	**ID 253 B Genotyp A**	**ID 254 Genotyp A**	**ID 158 Fr.5 Genotyp C**
	1:2			15,46 (30,9)	1,1 2,2
	1:4	28,86 (113,6)	23,45 (93,8)	18,49 (73,9)	0,79 3,2
	1:8	32,54 (260)	14,32 (114,6)	13,55 108,4	0,34 2,7
	1:16	22,30 (356)	13,99 224	7,51 120,2	0,20 (3,2)
	1:32	12,9 412	4,07 130,2	3,08 98,6	0,15 Ø
	1:64	7,01 448	2,94 188,2	1,49 95,4	0,14 Ø
	1:128	4,46 570	1,3 166	0,74 94,7	0,15 Ø
	1:256	2,05 524	1,03 263,7	0,29 (74,2)	0,11 Ø
	Mittelwert (MW)	- 488	- 194	- 103	- 2,7
	MW x 43,3	21130,4	8400,2	4459,9	116,9
HBsAg	**Verdünnung**	**ID 158 Fr.6 Genotyp C**	**ID 304 Fr.6 Genotyp D**	**ID 304 Fr.7 Genotyp D**	**ID 307 Fr.5 Genotyp D**
	1:2	18,49 (37)	6,82 (13,6)	31,98 (63,9)	17,84 (35,7)
	1:4	22,22 (88,9)	5,76 23,0	0 entfällt	30,27 (122)
	1:8	15,99 127,9	3,39 27,1	28,33 (226)	24,48 (196)
	1.16	6,8 108,8	1,18 18,9	19,95 (319)	16,46 (263)
	1:32	3,98 127,4	0,73 23,4	14,2 (454)	9,08 290
	1:64	2,40 153,6	0,31 19,8	10,42 667	6,94 444
	1:128	0,87 111,4	0,16 Ø	5,09 651,5	2,25 288
	1:256	0,42 107,52	0,20 Ø	2,64 675	1,80 461
	Mittelwert (MW)	- 123	- 22,4	- 664	- 370
	MW x 43,3	5325,9	969,9	28751,2	16021

Fußnote zu Tab. 2: Für den Mittelwert wurden nur Werte ohne Klammern verwendet. Der Mittelwert wurde anschließend noch mit dem Faktor 43,3 multipliziert, da die eingesetzte Virusmenge von 3 µl in 127 µl Casein gegeben wurde und damit sich eine Verdünnung von 3 µl: 130 µl= 1: 43,3 ergibt.

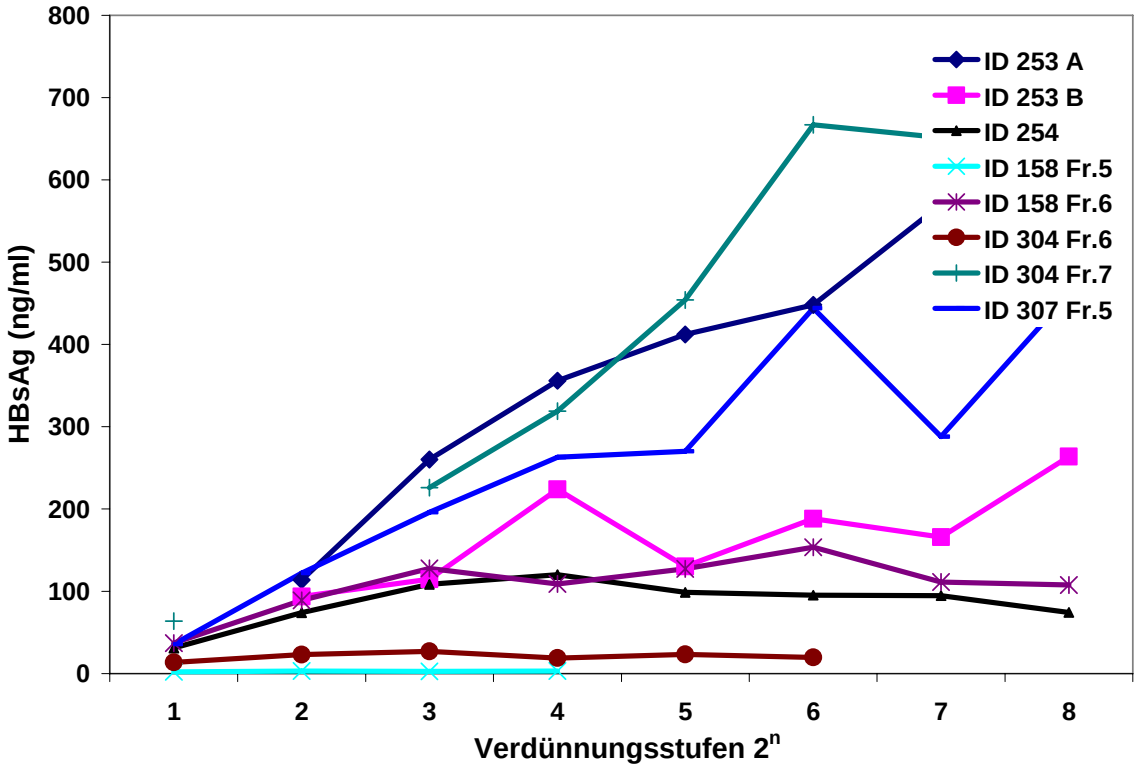

Abb. 8: HBsAg-Meßwerte in Abhängigkeit von der Verdünnung der acht Virusfraktionen. Die Farben stehen jeweils für eine bestimmte Virusfraktion (siehe Legende). Es zeigt sich bei geringer Verdünnung eine deutlich zu geringe Reaktivität.

Da jedoch die verschiedenen Genotypen unterschiedliche Konzentrationen besitzen (siehe Tab. 1), muß das detektierbare HBsAg jetzt noch in Bezug zur jeweiligen HBV-DNA-Konzentration gesetzt werden, um zu ersehen wieviel HBsAg die Viruspräparationen in Bezug zur Viruskonzentration enthalten, wie in Tab. 1 angegeben.

Die Viruspräparationen enthalten eine unterschiedliche Menge an HBsAg im Verhältnis zur Viruskonzentration. Dieses wird bei den Rechnungen zu den Ergebnissen in den nachfolgenden Infektions- und Infektionsinhibitionsversuchen berücksichtigt (siehe Tabellen Nr. 7, 8 und 9), so daß die Ergebnisse mit den einzelnen Viruspräparationen in den Versuchen vergleichbar sind.

Fällung von polyklonalen Antikörpern aus Seren

Gefällt wurden mit der Natriumsulfatmethode polyklonale Antikörper aus Patientenserum (siehe Methodenteil). Diese können mit der Methode von den übrigen Serumproteinen weitgehend abgetrennt werden.

Anschließend wurden zur Konzentrationsbestimmung der gefällten Immunglobuline von diesen 1:10 bzw. 1:100- Verdünnungen photometrisch mit einer OD von 280 gemessen. Eine OD_{280} von 1,35 entspricht einer IgG-Konzentration von 1 mg/ml. Nach der Konzentrationsbestimmmung erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese der Fällungen mit anschließender Coomassie-Färbung, um den Erfolg der Fällungen zu demonstrieren. Hierbei stellen sich die verschiedenen Proteine entsprechend ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes in verschiedenen Banden dar.

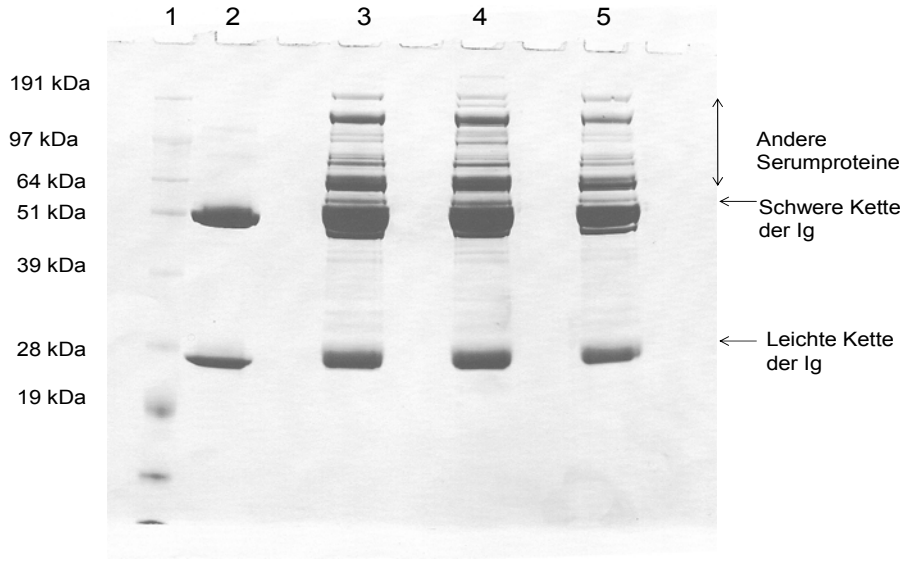

Abb. 8: SDS-Gelelektrophorese. Exemplarisch wird hier das mit Coomassie-Blau gefärbte Gel mit den gefällten IgG aus dem Humanserum ID 356 (anti-HBs) und dem monoklonalen Maus-Antikörper MA 18/07 (anti-PräS1) dargestellt. Tasche 1: Marker (Proteinstandard) SeaBlue (Fa. Invitrogen); Tasche 2: 20 µg MA 18/07; Tasche 3-5: jeweils 20 µg IgG-Fällung.

Tab. 3: Konzentration der gefällten in die Infektions- und Infektionsinhibitionsversuche eingesetzten Immunglobuline.

Serum (Nr.)	Domäne	Spender	Proteinkonz. (µg/µl)	Anti-HBs (IU/l)
1066757	S	1120381	11,39	237300
1061908	S	1118894	11,4	153300
1066834	S	1109569	12,1	211000
1061781	S	1105874	4,32	95600
1061783	S	1075536	5,08	58000
1061798	S	1113447	5,74	36100
1066594	S	1099510	5,0	29100

Tab. 4: Konzentration der gefällten in die Infektions- und Infektionsinhibitionsversuche eingesetzten Immunglobuline.

Serum (ID)	Domäne	Proteinkonz. (µg/µl)	Anti-HBs (IU/l)
155	S und Prä-S1	7,7	8900
MA 18/09	PräS1	1	
Q 19/10	PräS2	0,5	
C 20/02	S	1	
ID 287	Negativserum	7,9	

Anmerkung:
Die Fällung der polyklonalen Antikörper aus den Seren Nummer 1066757, 1061908, 1066834, aus dem Serum ID 155 und die meisten Serumfällungen aus dem Serum ID 287 wurden von Ch. Prinz, Doktorand am Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen ausgeführt. MA 18/07, C 20/02 und Q 19/10 wurden bereits gereinigt durch W. Gerlich zur Verfügung gestellt.

Bestimmung von Proteinkonzentration und anti-HBs-Aktivität:
Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte im Photometer , wobei 1,35 OD_{280} einer Antikörper (IgG)-Konzentration von 1 mg/ml entspricht. Der gemessene Zahlenwert der z.B. 1:10-Verdünnung wurde mit dem Faktor 10 multipliziert und durch 1,35 dividiert. Damit erhält man die Protein-Konzentration in mg/ml bzw. µg/µl.

Die anti-HBs-Aktivität erhält man, indem der anti-HBs-Gehalt der IgG-Lösungen im diagnostischen Labor der Medizinischen Virologie der JLU Gießen analog zum HBeAg bestimmt wird. Der ermittelte Zahlenwert wird anschließend im Falle z.B. der 1:1000-Verdünnungen mit dem Faktor 1000 multipliziert. Damit erhält man die anti-HBs-Aktivität in IU/l.

Die Charakterisierung der polyklonalen Antikörper aus den Seren Nummer 1066757, 1061908, 1066834, aus dem Serum ID 155 und den meisten Serumfällungen aus dem Serum ID 287 wurden von Ch. Prinz, Doktorand am Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen ausgeführt. MA 18/07, C 20/02 und Q 19/10 wurden bereits charakterisiert durch W. Gerlich zur Verfügung gestellt.

4.2 SHBs-ELISA: Austestung verschiedener Peroxidase-Substrate

Ziel war es, die Sensitivität des im Methodenteil beschriebenen ELISA zu erhöhen. Dazu wurden drei unterschiedliche Peroxidase-Substrate gegeneinander getestet, und zwar die bereits verwendeten OPD Tabletten (Fa. DakoCytomation) gegen ABTS Tabletten (Fa. Roche) und BM Blue POD (Fa. Roche).

Als Proben dienten Verdünnungsreihen mit 1:2-Verdünnungsschritten von HBsAg. Es ergaben sich so jeweils HBsAg-Konzentrationen von 4 ng/ml bis 0,00005 ng/ml. Desweiteren wurden jeweils 16 negative Kontrollen pipettiert.

Tab. 5: Darstellung der Extinktionswerte des HBsAg in verschiedenen Verdünnungsstufen unter Einsatz der jeweiligen Substrate. OD: die entsprechende Wellenlänge am Photometer.

Verdünnung	**BM Blue (OD_{450})**	**OPD (OD_{492})**	**ABTS (OD_{405})**
4 ng/ml	1.893	0.871	0.37
2 ng/ml	1.189	0.507	0.215
1 ng/ml	0.449	0.148	0.088
0,5 ng/ml	0.222	0.047	0.043
0,2 ng/ml	0.111	0.020	0.033
0,1 ng/ml	0.078	0.008	0.027
0,05 ng/ml	0.080	0.006	0.022
0,02 ng/ml	0.072	0.003	0.022
0,01 ng/ml	0.055	0.002	0.022
0,005 ng/ml	0.062	0.003	0.023
0,002 ng/ml	0.033	-0.001	0.029
0,001 ng/ml	0.048	0.008	0.026
0,0005 ng/ml	0.034	0.005	0.027
0,0002 ng/ml	0.060	0.004	0.024
0,0001 ng/ml	0.076	0.007	0.021
0,00005 ng/ml	0.049	0.002	0.018
Mittelwert und Standardabweichung der Leerwerte	0,052 +/- 0,016	0,0043 +/- 0,0026	0,024+/-0,0085

Ergebnis: Signifikant positiv ist jeweils der Zahlenwert, der über dem 2-fachen Wert des Leerwert-Mittelwertes liegt (in der Tabelle grün). Die Sensitivität von ABTS ist somit am geringsten. Die Sensitivität von BM blue scheint zunächst höher zu sein als die von OPD; jedoch ist auch der Hintergrund (siehe Leerwert) von BM blue höher. Die Sensitivität von BM blue ist letztendlich nicht höher als die von OPD (siehe Lage des grün markierten Wertes), sondern gleich hoch, weshalb die im Anschluß an die Infektions- und Inhibitionsversuche durchgeführten S-ELISA weiterhin mit OPD-Substrat durchgeführt wurden.

4.3 Infektions- und Inhibitionsversuche

Die Versuche wurden jeweils im Doppelansatz durchgeführt.

Vergleich zweier Kultivierungsmedien im Hinblick auf die Infektionsfähigkeit von HBV Genotyp D und Infektionsinhibition durch drei verschiedene monoklonale Antikörper

Fragestellung:

In diesem Versuch sollte zunächst gezeigt werden, daß eine *in-vitro*-Infektion von primären Hepatozyten mit HBV möglich ist und in welcher Viruskonzentration dieses am besten gelingt. Dieses sollte zunächst mit HBV Genotyp D getestet werden, der schon bei anderen Versuchen der Arbeitsgruppe verwendet worden war.

Desweiteren sollte mit diesem Versuch geklärt werden, ob es im Hinblick auf den Infektionserfolg Unterschiede bei der Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien gibt.

Ein weiteres Anliegen war es zu klären, ob eine Neutralisation mit monoklonalen Antikörpern gegen die drei Hauptdomänen des HBsAg (S, PräS1 und PräS2) möglich ist.

Plattenaufteilung:

In der Versuchsreihe 1 (Wells 1-12) wurden im Doppelansatz Verdünnungsreihen von HBV Genotyp D ID 307 Fr.5 von $1x10^9$GE bis $1x10^5$GE und eine Negativkontrolle in Tup.Med/1%DMSO pipettiert.

In der Versuchsreihe 2 (Wells 13-24) wurden im Doppelansatz Verdünnungsreihen von HBV Genotyp D Fr.5 von $1x10^9$GE bis $1x10^5$GE und eine Negativkontrolle in HGM pipettiert.

In der Versuchsreihe 3 (Wells 25-36) wurden jeweils 2 µg der monoklonalen Antikörper MA 18/07, Q 19/10 und C 20/02 mit Viruslösung von HBV Genotyp D Fr.5 ($1x10^8$ GE/300µl) in Tup.Med/1%DMSO einpipettiert. MA 18/07 ist ein anti-PräS1-, Q 19/10 ein anti-PräS2- und C 20/02 ein anti-S-Antikörper.

An Tag 0, 3, 6, 9 und 12 nach der Infektion/Infektionsinhibition wurden die Zellüberstände abgenommen und gegen 600 µl neues Medium ausgetauscht.

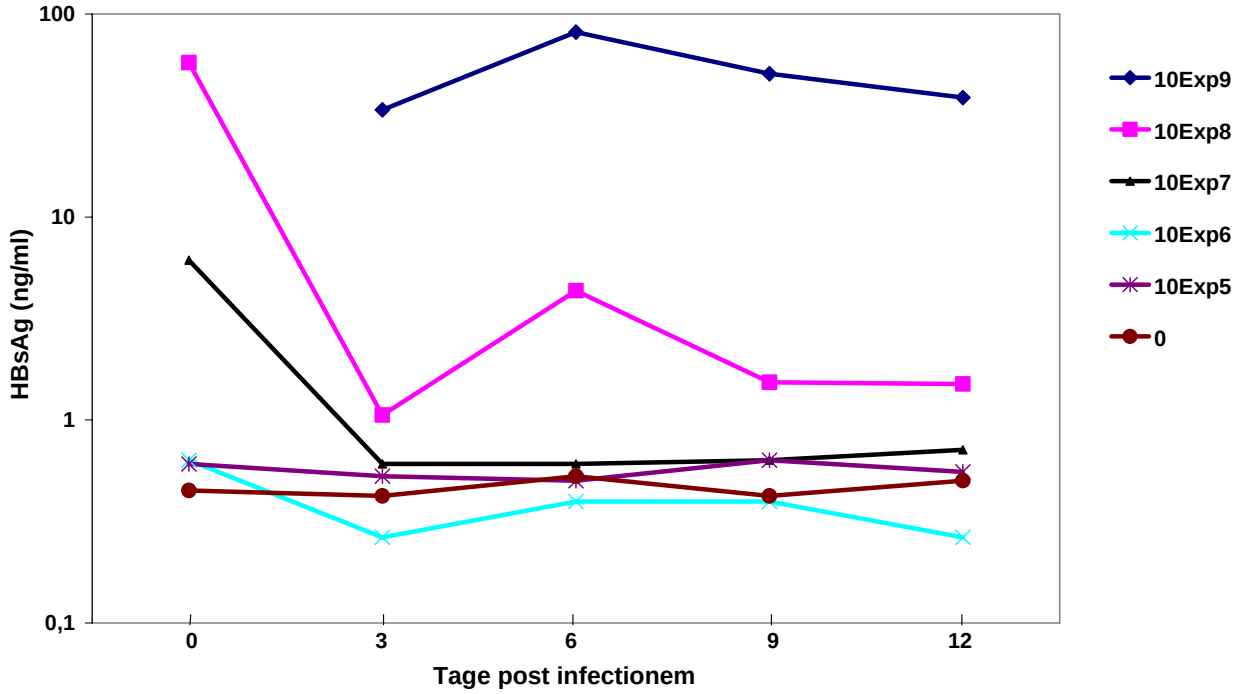

Abb. 9: Darstellung des Infektionserfolges anhand der Höhe der HBsAg-Detektion mit HBV-Genotyp D: ID 307 Fr.5 im Zellkulturmedium Tup.Med./1% DMSO im Liniendiagramm. An Tag null post infectionem (Ino=Inokulat) entfällt der Meßwert in der Abbildung für $1x10^9$GE, da hier ein nicht meßbar hohes Signal durch das Photometer detektiert wurde („overflow“). 0: Tag 0 post infectionem (= Inokulat). 3: Tag 3 post infectionem. 6: Tag 6 post infectionem. 9: Tag 9 post infectionem. 12: Tag 12 post infectionem.

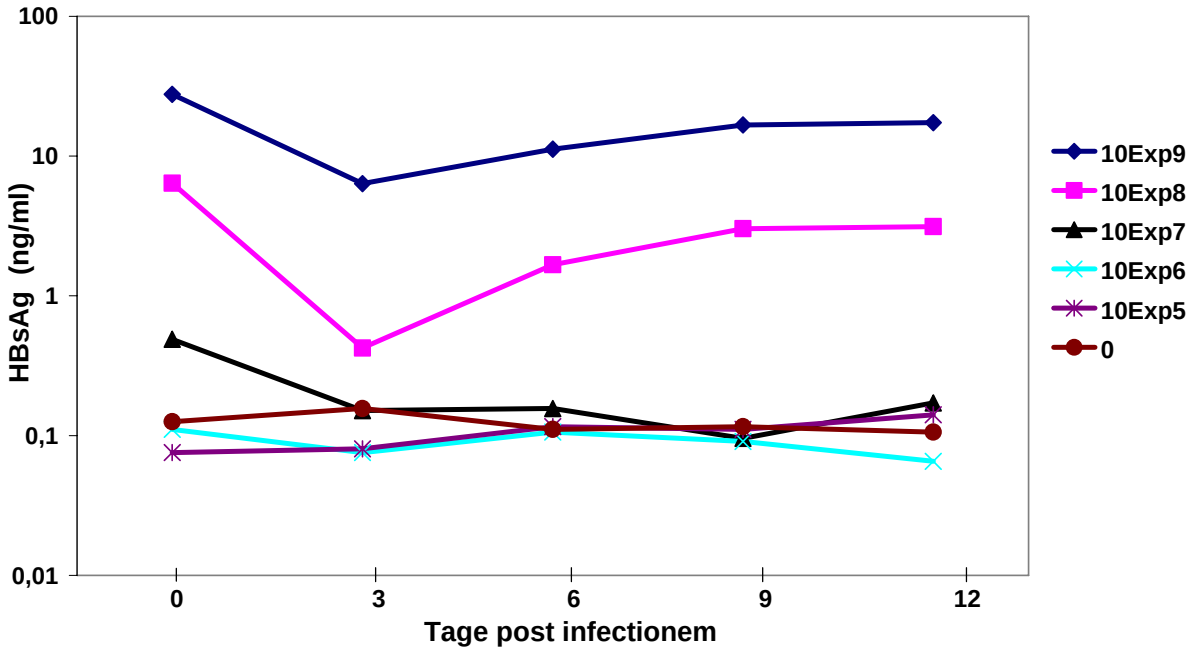

Abb. 10: Darstellung des Infektionserfolges anhand der Höhe der HBsAg-Detektion mit HBV-Genotyp D: ID 307 Fr.5 im Zellkulturmedium HGM im Liniendiagramm. 0: Tag 0 post infectionem (= Inokulat). 3: Tag 3 post infectionem. 6: Tag 6 post infectionem. 9: Tag 9 post infectionem. 12: Tag 12 post infectionem.

Ergebnis HBsAg Versuchsreihe 1 und 2:

Die HBsAg-Produktion beginnt an Tag 6 post infectionem (Anstiege) und erreicht an Tag 9 bis 12 post infectionem ein Plateau. Da HBsAg ein Teil des Virus selbst ist, ist es bereits an Tag 0 post infectionem nachweisbar, jedoch fällt an Tag 3 post infectionem die Virus-assoziierte HBsAg-Detektion auf ein Minimum ab. HBsAg-Anstiege an Tag 6 post infectionem sind also sehr wahrscheinlich auf eine Neusynthese von HBsAg durch die infizierten Hepatozyten zurückzuführen.

Für die Infektion mit HBV Genotyp D Fr. 5 erreicht man mit einem Inokulum von $1x10^8$GE/300 µl noch eine messbare Infektion.

Versuchsreihe 3:

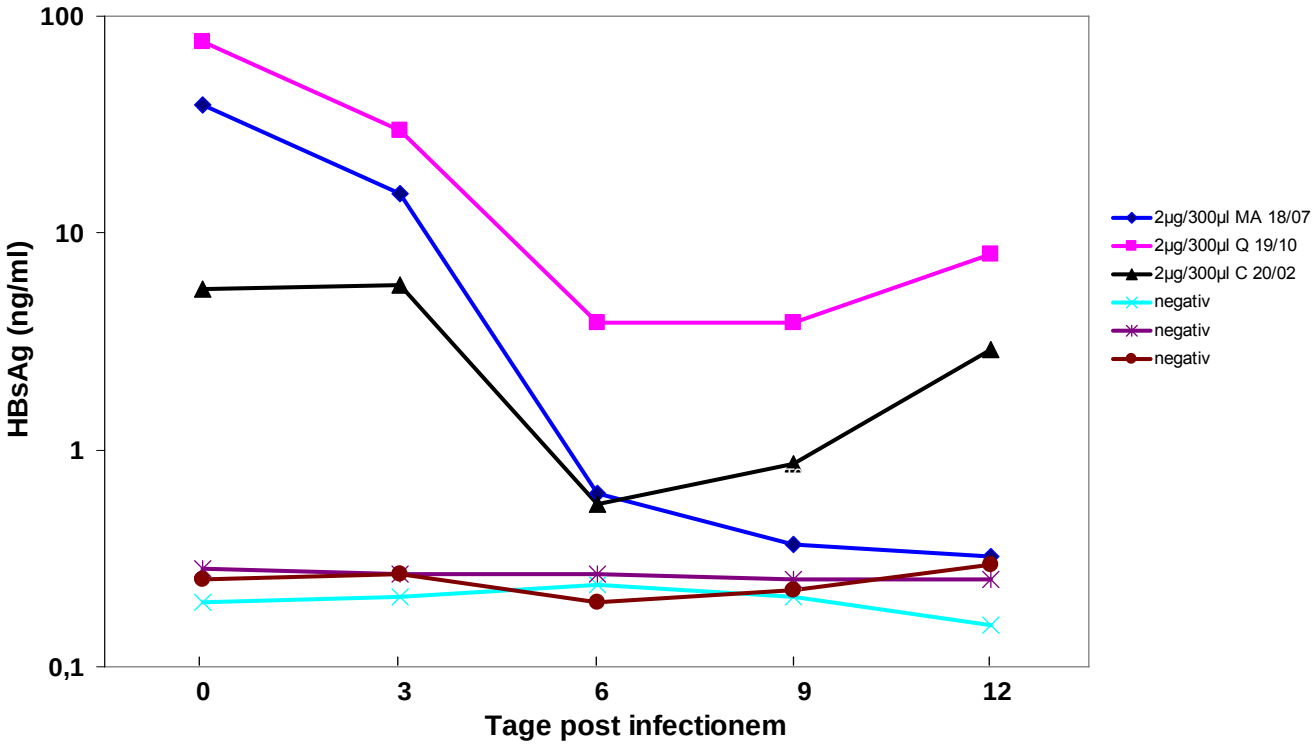

Abb. 11: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp D: ID 307 Fr.5 ($1x10^8$ GE/300µl) in Tup.Med./1% DMSO durch verschiedene monoklonale Antikörper in der Konzentration 2 µg/300 µl im Liniendiagramm anhand der Höhe der HBsAg-Detektion. Ino: Inokulat (= Tag 0 post infectionem). T3: Tag 3 post infectionem. T6: Tag 6 post infectionem. T9: Tag 9 post infectionem. T12: Tag 12 post infectionem.

Ergebnis HBsAg Versuchsreihe 3 (Neutralisationsversuch):

Bei allen drei Antikörpern MA 18/07, Q 19/10 und C 20/02 handelt es sich um HBV-hemmende Antikörper, wobei die Virusinfektion durch 2 µg/300 µl Antikörper vor allem durch MA 18/07 und C 20/02 gehemmt wird. Bei der Hemmung durch 2 µg/300 µl C 20/02 ist allerdings im Gegensatz zu der Hemmung durch 2 µg/300 µl MA 18/07 noch die Infektionskinetik des Virus (Anstieg von HBsAg bis zu Tag 12 post infectionem) zu erkennen und keine vollständige Infektionsinhibition zu erzeugen. Bei Q 19/10 gelingt die Virusinhibition am schlechtesten.

Ergebnisse bei der HBeAg-Bestimmung:
Das HBeAg wurde durch das diagnostische Labor der Medizinischen Virologie der JLU Gießen bestimmt. Da durch Glebe et al. 2003 gezeigt wurde, daß die Infektionskinetik bei der HBeAg-Detektion (-Produktion) derjenigen bei der HBsAg-Detektion (-Produktion) gleicht, wurde aus Kostengründen bei allen Versuchen das HBeAg nur von den Tag 12-Werten post infectionem bestimmt.

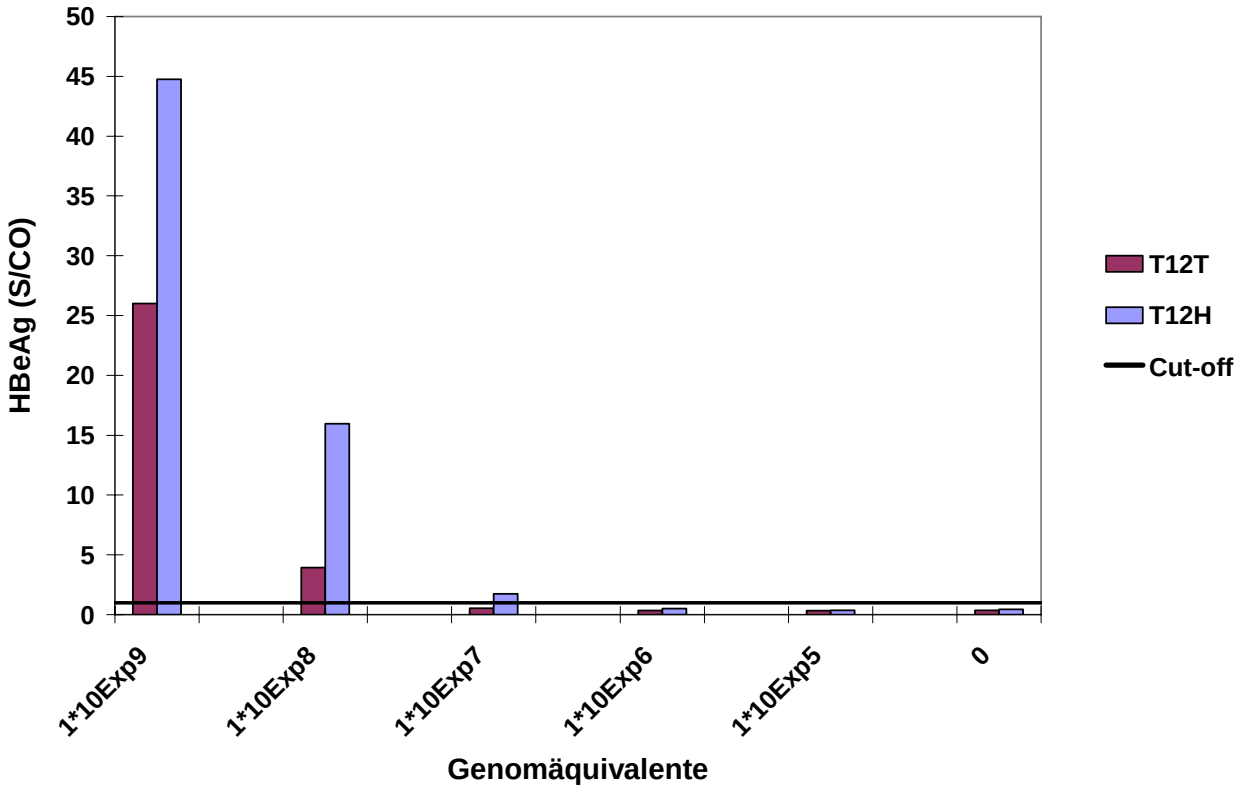

Abb. 12: Darstellung des Infektionserfolges anhand der Höhe der HBeAg-Detektion an Tag 12 post infectionem mit HBV-Genotyp D: ID 307 Fr. 5 in Tup.Med./1%DMSO (T12T) und HGM (T12H).

Ergebnis HBeAg Versuchsreihe 1 und 2:

Das HBeAg ist im Gegensatz zum HBsAg nicht Teil des Virus selbst. Es beweist daher die Neuinfektion mit HBV in dem Versuch.

$1x10^8$ GE von HBV Genotyp D ID 307 Fr.5 sind für eine Infektion im in vitro-System ausreichend, um eine zuverlässige Infektion zu erzeugen. Auch hier ist das Zellkulturmedium HGM dem Zellkulturmedium Tup.Med./1% DMSO bezogen auf die Infektionspotenz derselben Virusmenge überlegen.

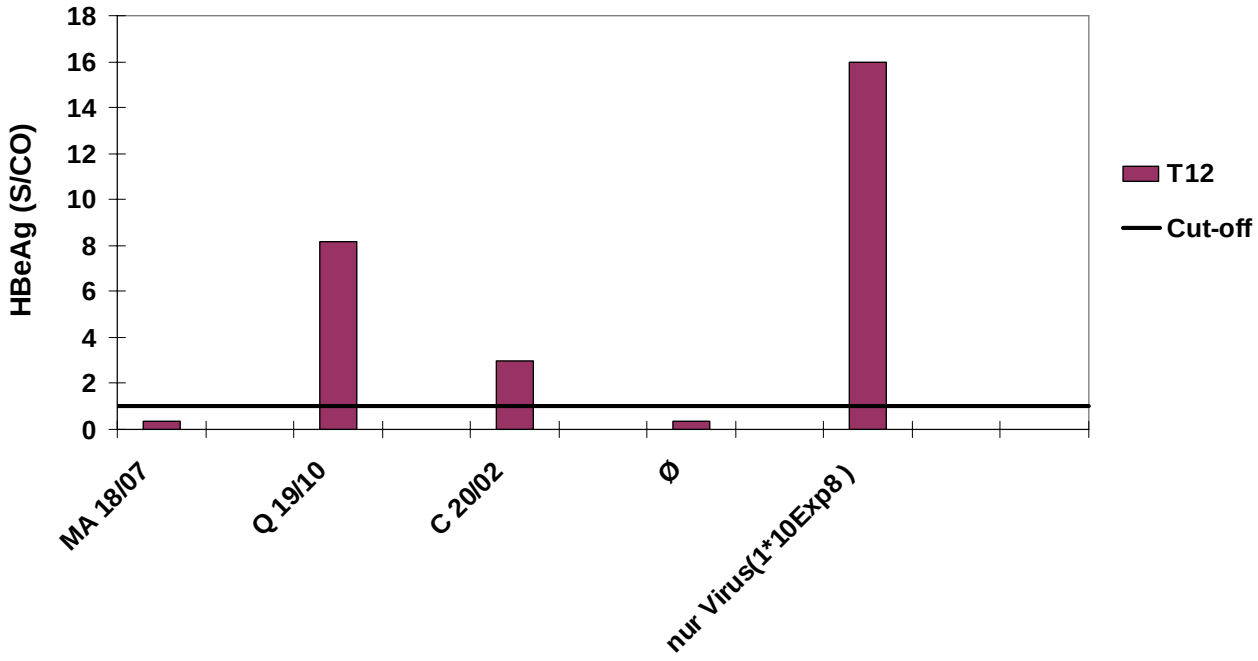

Abb. 13: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp D: ID 307 Fr.5 ($1x10^8$ GE/300µl) in Tup.Med./1% DMSO durch verschiedene monoklonale Antikörper in der Konzentration 2 µg/300 µl im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. MA 18/07 gegen LHBs. Q 19/10 gegen MHBs. C 20/02 gegen SHBs.
Ø= kein Virus

Ergebnis HBeAg Versuchsreihe 3:

Alle drei Antikörper hemmen die Infektiosität des Virus. In einer Menge von 2 µg/300 µl verhindert jedoch nur MA 18/07 die Infektion.

Infektionsmedium für die folgenden Versuche:

Als Infektionsmedium wird im folgenden HGM verwendet, da hier die besseren Infektionserfolge (Anstieg von HBsAg bis zu Tag 12 bei HGM (Abb. 10), hingegen Abfall von HBsAg von Tag 6 bis Tag 12 bei Tup.Med./1% DMSO (Abb. 9); (außerdem Abb. 12)) zu verzeichnen waren.

Infektiosität verschiedener HBV-Genotypen und Fraktionen

Es wurden im folgenden Versuch verschiedene Fraktionen gereinigter HBV-Virionen der Genotypen A, C und D auf ihre Infektionsfähigkeit im in vitro-Zellkultursystem der primären Tupaia belangeri-Hepatozyten getestet.

Fragestellung:
Daß eine Infektion in diesem System gelingt, konnte in den vorherigen Versuchen an HBV-Genotyp D: ID 307 Fr.5 gezeigt werden. Nun galt es zu zeigen, ob vorherige Aussagen auch für andere Präparate des HBV-Genotyps D und für die HBV-Genotypen A und C gelten. Falls das so sein sollte, mußte weiterhin geklärt werden, wieviele Genomäquivalente (Viren) der jeweiligen Virusfraktion für einen optimalen Infektionserfolg erforderlich sind und ob zwischen den Genotypen und Fraktionen Unterschiede in der Infektiosität bestehen. Dabei wurde das Zellkulturmedium HGM verwendet.
Von den Fraktionen wurden jeweils $5x10^8$, $5x10^7$ und $5x10^6$ GE in den Versuch eingesetzt. Durchführung siehe Methodenteil.

HBsAg:
Hier soll geklärt werden, ob die Infektionskinetik, die bei den vorherigen Versuchen bei Genotyp D: ID 307 Fr.5 dargestellt wurde, auch auf die anderen Genotypen übertragbar ist.

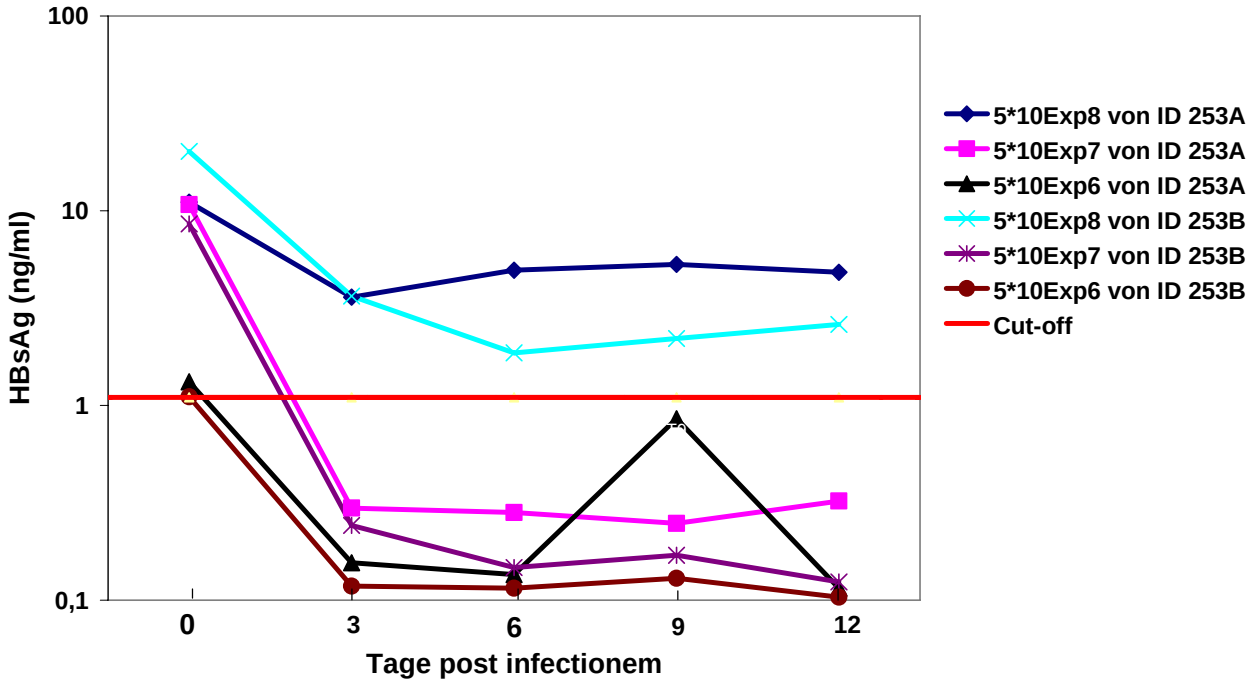

Abb. 14: Darstellung der Infektionskinetik des HBV-Genotyps A: ID 253A und ID 253 B anhand der Höhe der HBsAg-Detektion im Liniendiagramm. 0: Tag 0 post infectionem (= Inokulat). 3: Tag 3 post infectionem. 6: Tag 6 post infectionem. 9: Tag 9 post infectionem. 12: Tag 12 post infectionem.

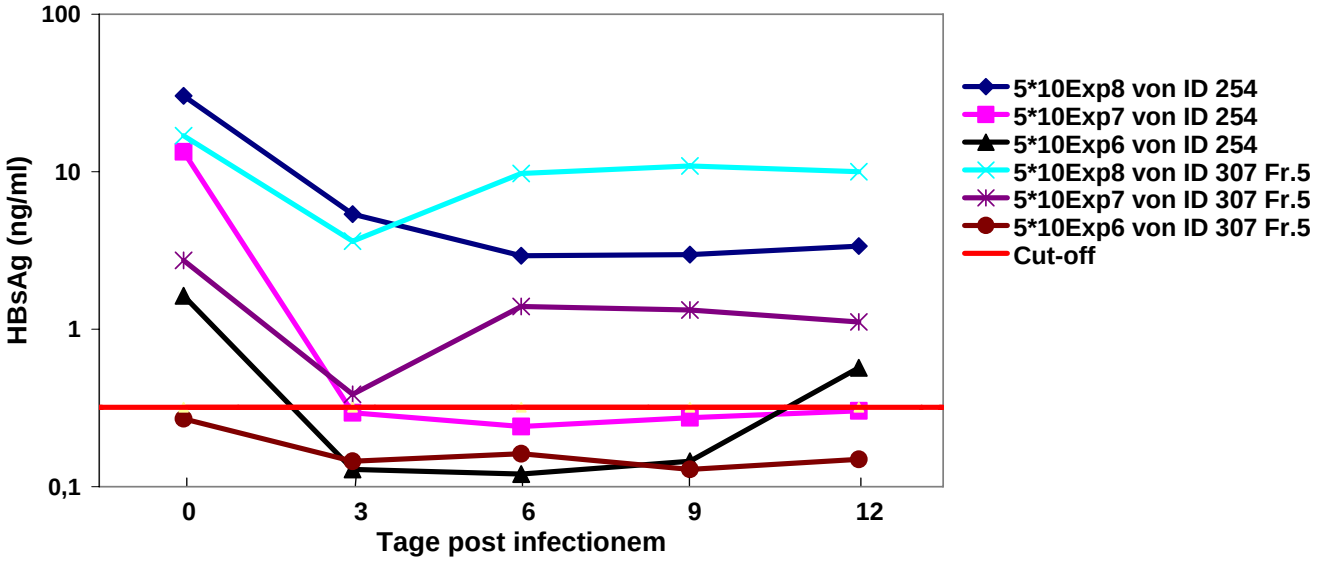

Abb. 15: Darstellung der Infektionskinetik des HBV-Genotyps A: ID 254 und D: ID 307 Fr.5 anhand der Höhe der HBsAg-Detektion im Liniendiagramm. 0: Tag 0 post infectionem (= Inokulat). 3: Tag 3 post infectionem. 6: Tag 6 post infectionem. 9: Tag 9 post infectionem. 12: Tag 12 post infectionem.

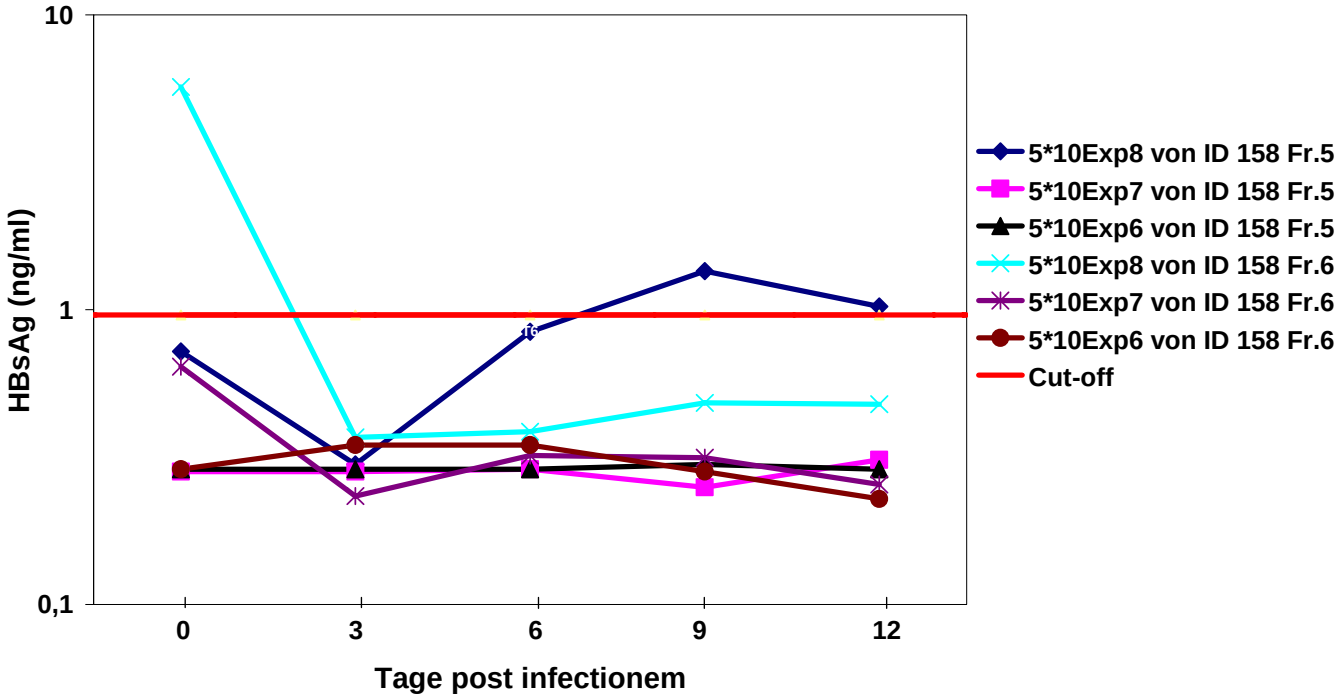

Abb. 16: Darstellung der Infektionskinetik des HBV-Genotyps C: ID 158 Fr.5 und ID 158 Fr.6 anhand der Höhe der HBsAg-Detektion im Liniendiagramm. 0: Tag 0 post infectionem (= Inokulat). 3: Tag 3 post infectionem. 6: Tag 6 post infectionem. 9: Tag 9 post infectionem. 12: Tag 12 post infectionem.

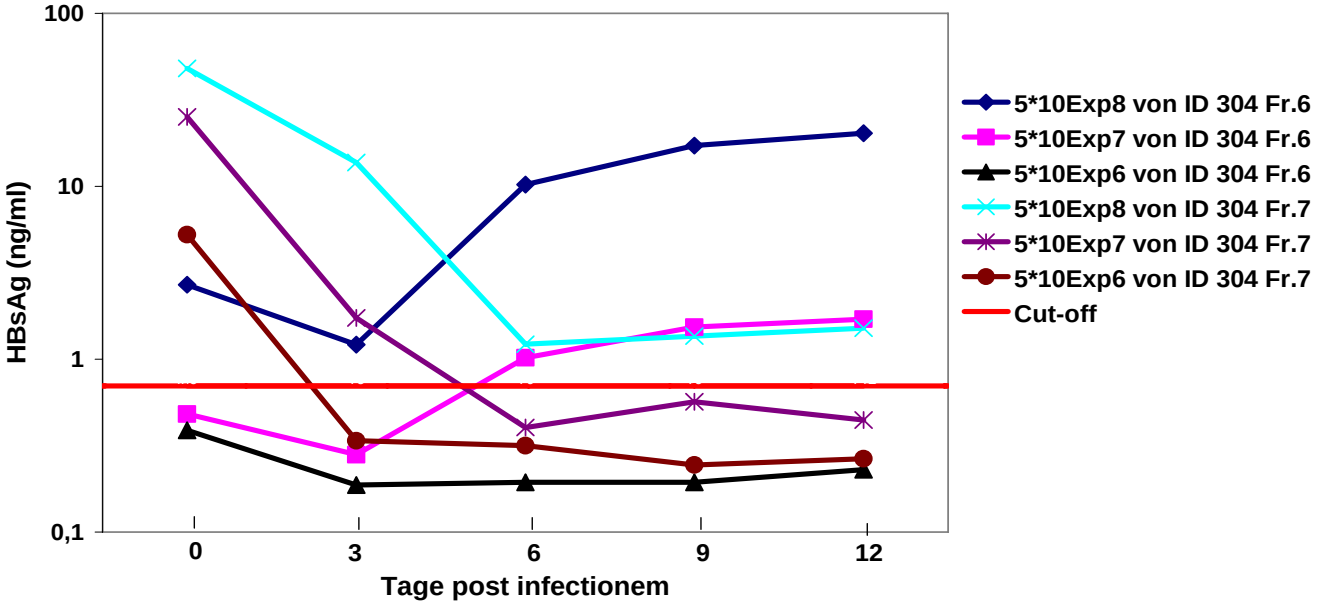

Abb. 17: Darstellung der Infektionskinetik des HBV-Genotyps D: ID 304 Fr.6 und ID 304 Fr.7 anhand der Höhe der HBsAg-Detektion im Liniendiagramm. 0: Tag 0 post infectionem (= Inokulat). 3: Tag 3 post infectionem. 6: Tag 6 post infectionem. 9: Tag 9 post infectionem. 12: Tag 12 post infectionem.

Ergebnis Infektionskinetik:

Der für Genotyp D ID 307 Fr.5 beschriebene Verlauf des HBsAg mit Minimum an Tag 3 post infectionem, Anstieg an Tag 6 und Plateau an Tag 9 bis Tag 12 post infectionem, in Ausnahmefällen auch Anstieg bis Tag 12 post infectionem, ist so bei HBV Genotyp D ID 304 Fr.6, aber nicht bei allen Genotypen zu beobachten.

Genotyp A ID 253 A verhält sich in der Infektionskinetik ähnlich wie die Genotypen D ID 307 Fr.5 und ID 304 Fr.6. Die Genotyp A HBV-Viren ID 253 B und ID 254 weisen ihr Minimum jedoch erst an Tag 6 post infectionem auf, verhalten sich aber in ihrer Infektionskinetik ansonsten ähnlich. Es handelt sich also um dieselbe Infektionskinetik mit leichter Verschiebung der Minima und Maxima. Dasselbe gilt für HBV Genotyp D ID 304 Fr.7.

Genotyp C jedoch weicht von oben beschriebener Kinetik ab. Sein Minimum der HBsAg-Detektion liegt ebenfalls an Tag 3 post infectionem. Dann kommt es jedoch zu einem Maximum an Tag 9 post infectionem mit nachfolgendem Abfall an Tag 12 post infectionem.

Ergebnisse HBeAg:

Hier soll geklärt werden, bei welcher Fraktion des jeweiligen Genotyps der Infektionserfolg am größten ist, und ob es hier zwischen den Genotypen Unterschiede in der Infektiosität gibt.

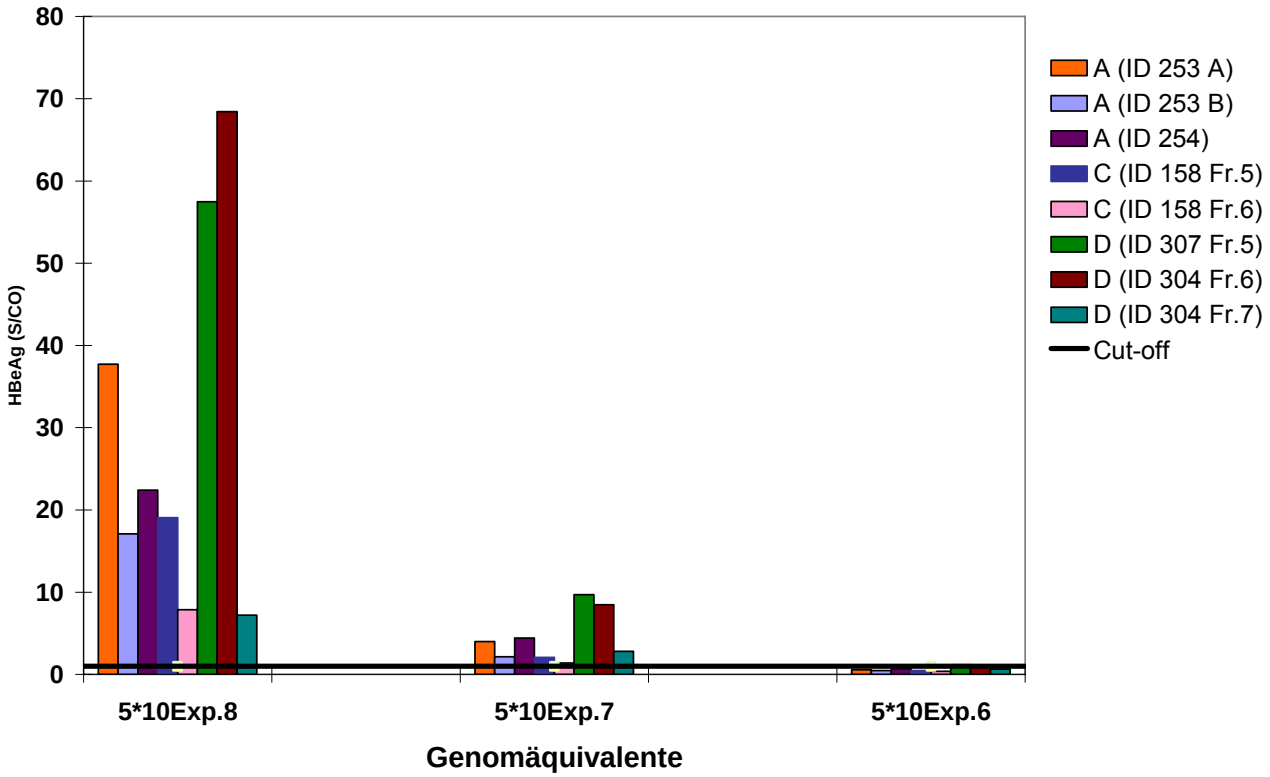

Abb. 18: Darstellung des Infektionserfolges der acht HBV-Genotyp-Fraktionen anhand der Höhe des HBeAg-Detektionssignals im Balkendiagramm an Tag 12 post infectionem. Die Buchstaben A-D in der Legende bezeichnen den jeweiligen HBV-Genotyp.

Ergebnisse HBeAg der acht HBV-Genotyp-Fraktionen:

Ein zuverlässiger Infektionserfolg läßt sich bei allen Fraktionen mit $5x10^8$GE erzielen.

Die besten Infektionserfolge (am meisten HBeAg-Produktion) wurden bei Genotyp A mit ID 253 A, bei Genotyp C mit ID 158 Fr.5 und bei Genotyp D mit ID 304 Fr.6 erzielt. Diese wurden daher in die anschließenden Versuche eingesetzt. Bei $5x10^7$GE gab es ein mehr oder weniger gutes Signal bei der HBeAg-Detektion; $5x10^6$GE waren bei ID 307 Fr.5 grenzwertig, ansonsten in keinem Fall ausreichend.

Desweiteren ergaben die Versuche, daß zwischen den Genotypen folgende Unterschiede bestehen: Genotyp D produzierte insgesamt am meisten HBeAg, gefolgt von Genotyp A, und Genotyp C bildete das Schlusslicht in der HBeAg-Produktion.

Allerdings produzierte Genotyp D: ID 304 Fr.7, im Gegensatz zu den anderen untersuchten HBV-Genotyp D-Proben, nur eine geringe Menge an HBeAg in den Versuchen.

Tab. 6: Übersicht Versuch 3. Zur Berechnung des HBsAg in der Viruspräparation wurde jeweils X4= die 1:8 -Verdünnung verwendet.

Virus	Genotyp	%-Sucrose	GE/ml	Mittelwert HBsAg (ng/ml)		HBsAg (ng/ml) für jeweils $5x10^8$GE an T12	HBeAg (S/Co) für jeweils $5x10^8$GE (Infektions-erfolg) an T12
ID 253A Fr.6	A	44%	$2,03x10^{11}$	21130		4,83	37,71
ID 253B Fr.5	A	44%	$1,34x10^{11}$	8400		2,61	17,11
ID 254 Fr.5	A	44%	$6,26x10^{10}$	4460		3,37	22,4
ID 158 Fr.5	C	44,5%	$1,70x10^{11}$	117		1,03	19,08
ID 158 Fr.6	C	42,5%	$6,00x10^{11}$	5326		0,48	7,88
ID 304 Fr.6	D	43,5%	$2,70x10^{11}$	970		20,25	68,42
ID 304 Fr.7	D	40,5%	$1,10x10^{11}$	28751		1,51	7,21
ID 307 Fr.5	D	45,5%	$3,8x10^{11}$	16021		9,99	57,47

Infektionsinhibition der drei Genotypen A, C und D mit dem monoklonalen Antikörper MA 18/07 gegen PräS1

Im vorherigen Infektionsversuch mit den acht Virusfraktionen konnte gesehen werden, daß bei Einsetzen von jeweils $5x10^8$ GE, d.h. 3,3 µl von ID 253 A, 4 µl von ID 158 Fr.5 und 2,5 µl von ID 304 Fr.6 gute Infektionserfolge (HBeAg-Produktion) zu erzielen sind. Um die Viren vergleichbar zu machen, mußte eine Eichung stattfinden. Dieses geschah anhand der Einführung des Begriffes der biologischen Virusaktivität. Zum Berechnen der biologischen Aktivität wurde das

HBeAg-Signal von Tag 12 (T12) von $5x10^8$ GE (siehe Tab. 6) durch die eingesetzte µl-Menge des Viruspräparats (siehe Tab. 7, 8 und 9) dividiert. Das Ergebnis waren die unten genannten Werte der biologischen Virusaktivität. Für die weiteren Infektions-/Infektionsinhibitionsexperimente wurde dann die Virusmenge eingesetzt, die voraussichtlich an Tag 12 post infectionem einen Wert von 10 S/Co HBeAg produzieren würde.

Eingesetzt wurde jeweils eine HBeAg-Produktion von 10 [S/Co] HBeAg folgender Viren:

Genotyp A: ID 253 A	HBeAg-Produktion: 11,34 /µl
Genotyp C: ID 158 Fr.5	HBeAg-Produktion: 4,77 /µl
Genotyp D: ID 304 Fr.6	HBeAg-Produktion: 27,37 /µl

Zur Infektionsinhibition diente der murine Antikörper MA 18/07 (anti-PräS1-Antikörper) in verschiedenen µg-Mengen/300 µl.

Fragestellung:
Lassen sich die verschiedenen Genotypen allsamt durch MA 18/07 hemmen? Die Beantwortung dieser Frage ist interessant, weil PräS1 zur Aufnahme von HBV in die Zelle essentiell ist. Beantwortet werden soll, ob anti-PräS1, welches die Infektion von HBV Genotyp D ID 307 Fr.5 (möglicherweise durch Hemmung der Aufnahme von HBV Genotyp D ID 307 Fr.5 in die Zelle) hemmt (siehe vorherige Versuche), auch die Infektion (Aufnahme?) der anderen Genotypen hemmt.

Ergebnisse HBeAg:

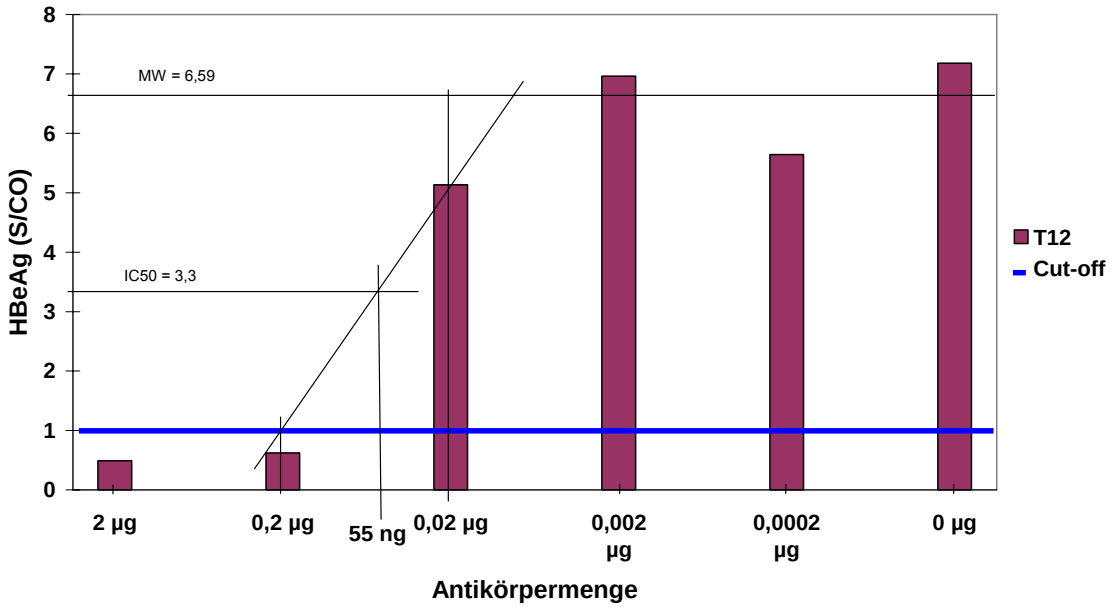

Abb. 19: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp A: ID 253A durch verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers MA 18/07 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. Die µg-Mengen beziehen sich jeweils auf 300 µl. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

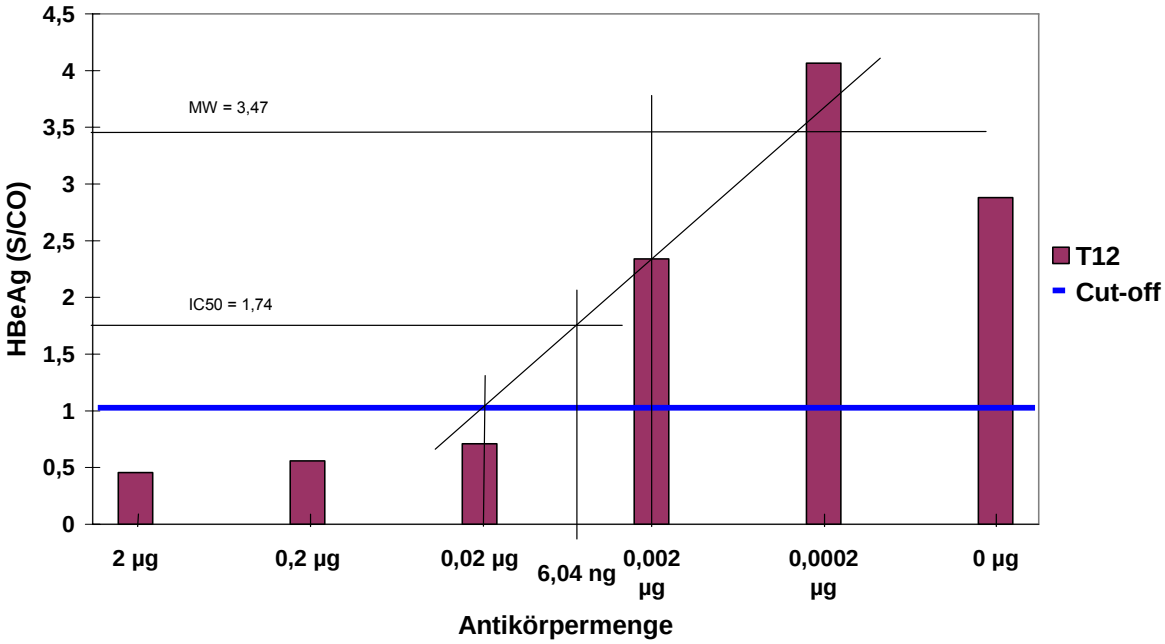

Abb. 20: : Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp C: ID 158 Fr.5 durch verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers MA 18/07 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. Die µg-Mengen beziehen sich jeweils auf 300 µl. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

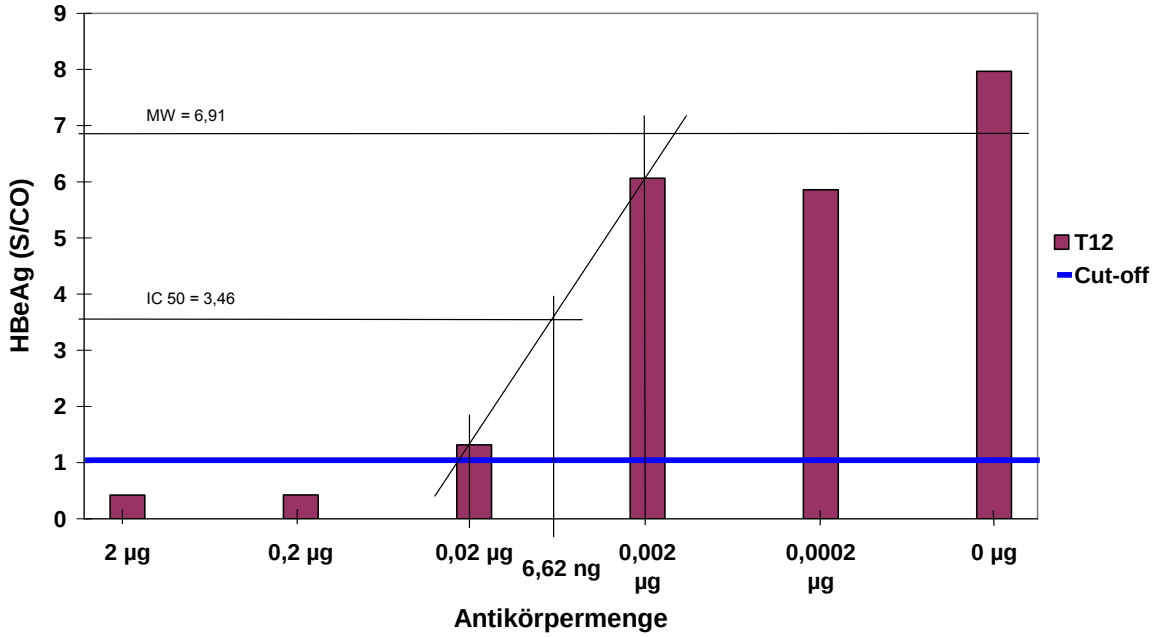

Abb. 21: : Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp D: ID 304 Fr.6 durch verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers MA 18/07 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. Die µg-Mengen beziehen sich jeweils auf 300 µl. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

Anmerkung IC50: Die IC50 wurde logarithmisch aus dem jeweiligen Diagramm abgemessen.

Zur vollständigen Infektionsinhibition mit MA 18/07 reichen bei allen Genotypen 0,2 µg/300 µl des Antikörpers aus. Bei HBV-Genotyp C, der sich hier am besten hemmen läßt, ist auch eine MA 18/07-Menge von 0,02 µg/300 µl zur Infektionsinhibition noch ausreichend. Genotyp D liegt bei 0,02 µg/300 µl MA 18/07 bereits knapp über dem Cut-off.

Die Infektionsinhibition durch MA 18/07 gelingt, betrachtet man die IC50 (siehe auch Tab. 7), bei HBV-Genotyp A am schlechtesten, bei HBV-Genotyp C: ID 158 Fr.5 am besten. Es enthalten alle Genotypen eine unterschiedliche Menge an HBsAg in der Probe, so daß es einleuchtet, daß sich schon alleine aus diesem Grund die Virusgenotyp-Lösungen unterschiedlich gut hemmen lassen müssen, ausgedrückt in einer unterschiedlichen IC50. Bezieht man jedoch die jeweilige IC50 auf die HBsAg-Menge in der Probe, so wird deutlich, daß sich durch MA

18/07 Genotyp A: ID 253A am besten, Genotyp C: ID 158 Fr.5 am schlechtesten hemmen läßt (siehe Tab. 7).

Infektionsinhibition der drei Genotypen A, C und D mit dem monoklonalen Antikörper C 20/02 gegen S

Eingesetzt wurde jeweils eine HBeAg-Produktion von 10 [S/Co] HBeAg folgender Viren:
HBV-Genotyp A: ID 253A (HBeAg-Produktion: 11,34 /µl)
HBV-Genotyp C: ID 158 Fr.5 (HBeAg-Produktion: 4,77 /µl)
HBV-Genotyp D: ID 304 Fr.6 (HBeAg-Produktion: 27,37 /µl)

Zur Infektionsinhibition diente der murine Antikörper C 20/02 (anti-HBs-Antikörper) in verschiedenen µg-Mengen/300 µl.

Fragestellung:
Lassen sich die verschiedenen Genotypen allesamt durch C 20/02 hemmen? Die Beantwortung dieser Frage ist interessant, weil C 20/02 ein Antikörper ist, der gegen die S-Domäne des SHBs gerichtet ist, in der sich die immunogene „a“-Determinante des HBV befindet, die sich bei den verschiedenen Genotypen unterscheidet.
Es wurden hier C 20/02-Mengen von 0,2 µg/300 µl abwärts eingesetzt.

Ergebnisse HBeAg:

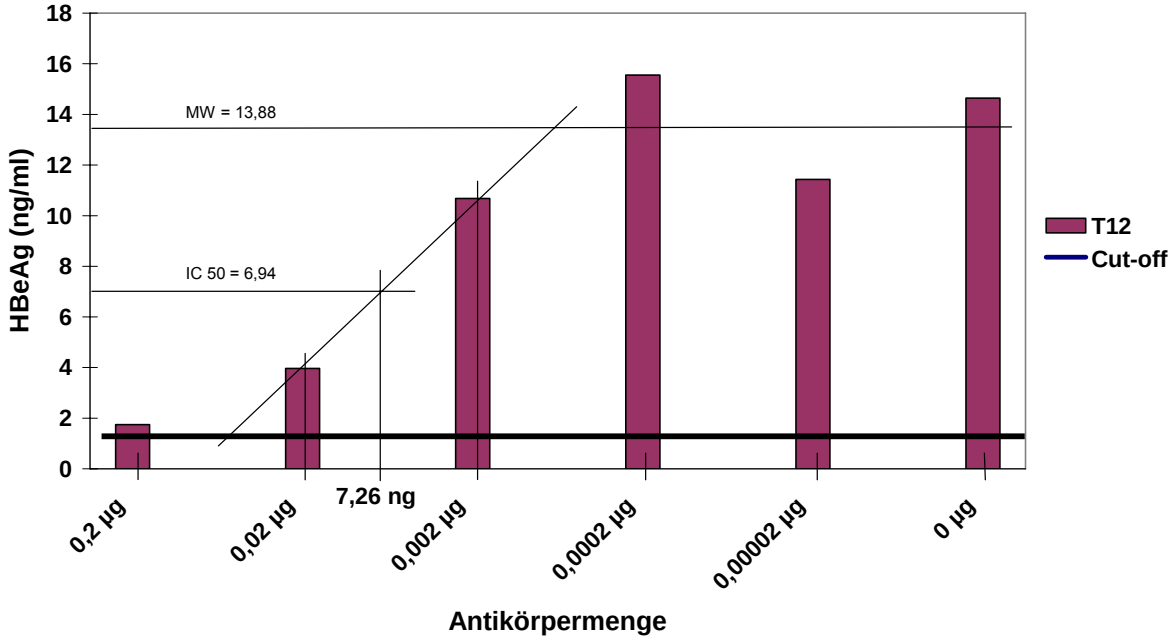

Abb. 22: : Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp A: ID 253A durch verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers C 20/02 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. Die µg-Mengen beziehen sich jeweils auf 300 µl. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

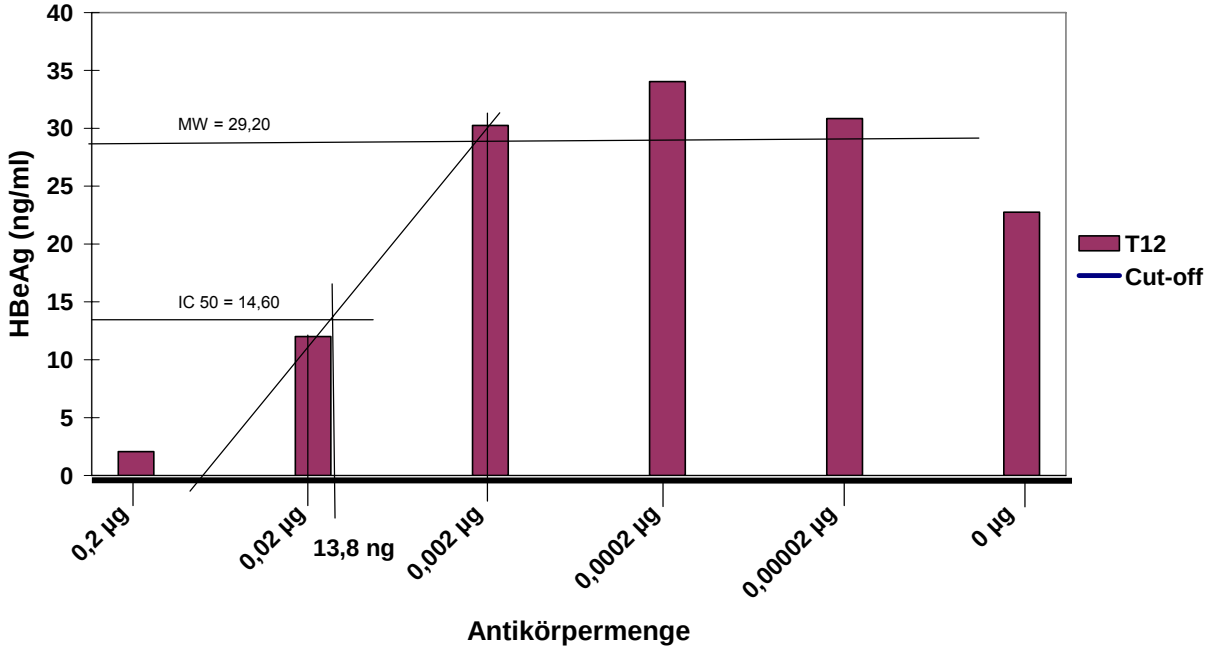

Abb. 23: : Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp C: ID 158 Fr.5 durch verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers C 20/02 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. Die µg-Mengen beziehen sich jeweils auf 300 µl. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

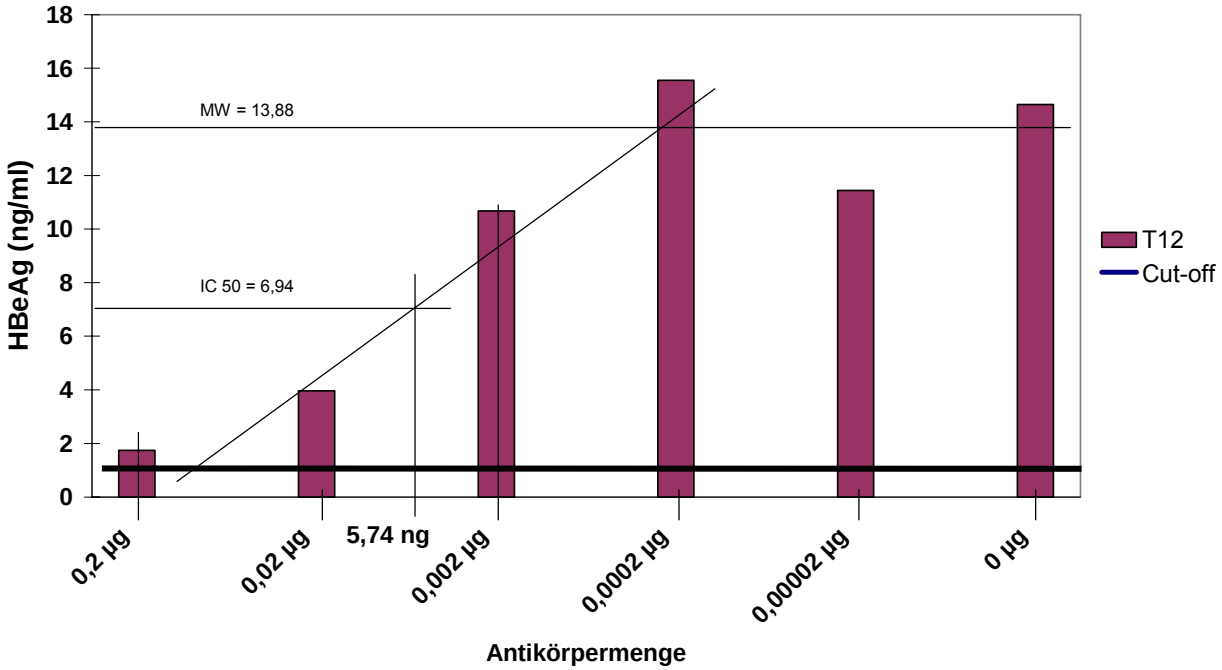

Abb. 24: : Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp D: ID 304 Fr.6 durch verschiedene Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers C 20/02 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. Die µg-Mengen beziehen sich jeweils auf 300 µl. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

Durch 0,2 µg/300 µl C 20/02 ließ sich bei keinem Genotyp eine vollständige Hemmung erzielen. Dieses steht im Gegensatz zu 0,2 µg/300 µl MA 18/07, bei dem in dieser Menge alle Genotypen gehemmt wurden.

C 20/02 ist also ein inhibierender Antikörper, wenn auch schwächer als MA 18/07, da größere Mengen C 20/02 als MA 18/07 erforderlich sind. Die Inhibition ist wie bei MA 18/07 je nach Genotyp unterschiedlich stark.

Betrachtet man alleine die IC50 (siehe auch Tab. 7), so ließ sich Genotyp C: ID 158 Fr.5 am schlechtesten und Genotyp D: ID 304 Fr.6 am besten hemmen. Bezieht man jedoch die jeweilige IC50 auf den HBsAg-Gehalt in der Probe (denn alle HBV-Genotypen enthalten eine unterschiedliche Menge an HBsAg in der Probe), so wird deutlich, daß wie bei MA 18/07 sich Genotyp A: ID 253A am besten und Genotyp C: ID 158 Fr.5 am schlechtesten durch C 20/02 hemmen läßt.

Tab. 7: Zusammenfassung Inhibition der verschiedenen HBV-Genotypen durch unterschiedliche Konzentrationen an MA 18/07 und C 20/02.

Antikörper	Virusgenotyp	GE/µl	HBsAg in der Probe (ng)	IC50 (ng)	IC 50 (ng) in Bezug zum HBsAg in der Probe (ng)
MA 18/07	**A:** ID 253 A (0,88 µl/Well)	$2{,}03 \times 10^8$	18,6	55	2,96
	C: ID 158 Fr.5 (2,1 µl/Well)	$1{,}70 \times 10^8$	0,25	6,04	24,16
	D: ID 304 Fr.6 (0,37 µl/Well)	$2{,}70 \times 10^8$	0,35	6,62	18,9
C 20/02	**A**: ID 253 A (0,88 µl/Well)	$2{,}03 \times 10^8$	18,6	7,26	0,39
	C: ID 158 Fr.5 (2,1 µl/Well)	$1{,}70 \times 10^8$	0,25	13,8	55,2
	D: ID 304 Fr.6 (0,37 µl/Well)	$2{,}70 \times 10^8$	0,35	5,74	16,4

Infektionsinhibition der drei Genotypen A, C und D mit dem Hyperimmunserum 1066834 in mehreren Versuchen

Eingesetzt wurde jeweils eine HBeAg-Produktion von 10 [S/Co] HBeAg folgender Viren:
HBV-Genotyp A: ID 253A (HBeAg-Produktion: 11,34 /µl)
HBV-Genotyp C: ID 158 Fr.5 (HBeAg-Produktion: 4,77 /µl)
HBV-Genotyp D: ID 304 Fr.6 (HBeAg-Produktion: 27,37 /µl)

Zur Infektionsinhibition diente das Hyperimmunserum 1066834 (anti-HBs-Antikörper) in verschiedenen IU-Mengen. Der Spender des Serums war zuvor mit dem Impfstoff Engerix® geimpft worden.

Fragestellung:

Lassen sich die verschiedenen Genotypen gleich gut durch das anti-HBs-haltige Hyperimmunserum hemmen? Die Beantwortung dieser Frage ist interessant im Hinblick auf die derzeitige HBV-Impfung (Engerix® oder Twinrix®), durch die anti-HBs-Antikörper generiert werden. Die Impfung wurde nämlich ausschließlich gegen HBV-Genotyp A entwickelt. Anti-HBs-Antikörper sind gegen die S-Domäne des SHBs gerichtet, in der sich unter anderem die immunogene „a“-Determinante des HBV befindet, die sich bei den verschiedenen Genotypen unterscheidet.

Ergebnisse HBeAg:

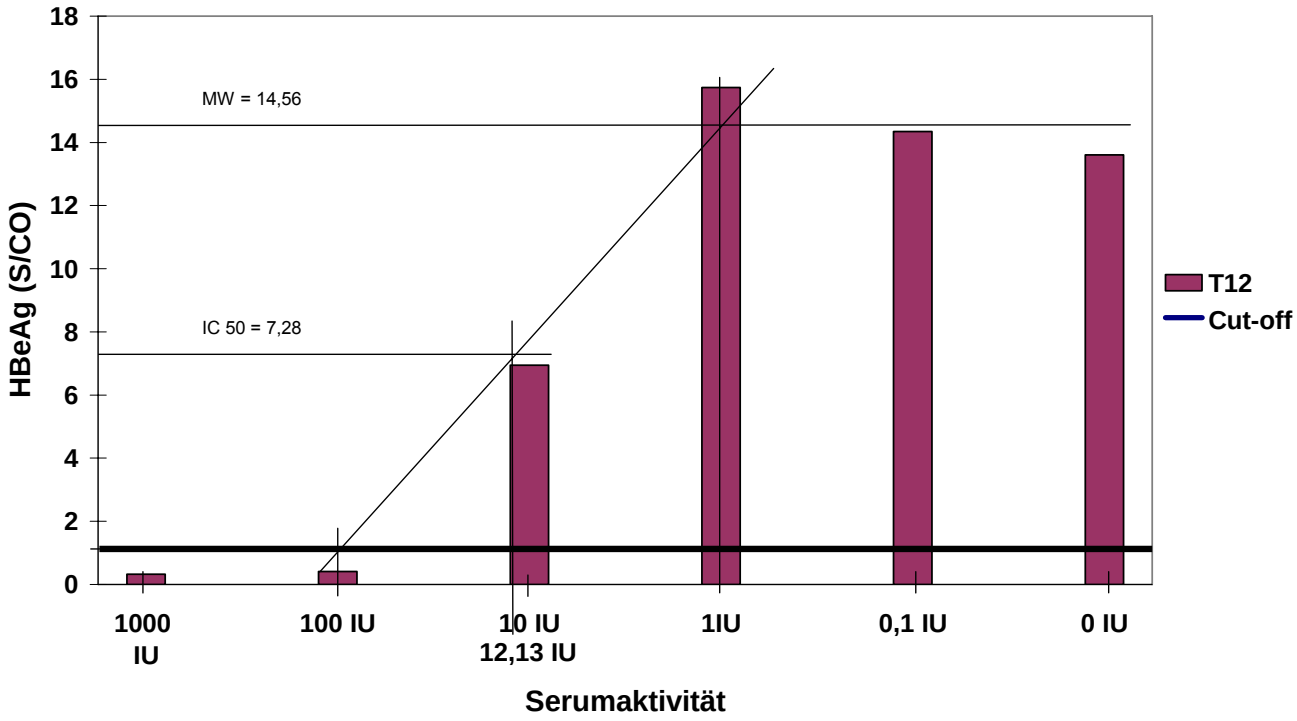

Abb. 25: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp A: ID 253A durch verschiedene Aktivitäten des Hyperimmunserums 1066834 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

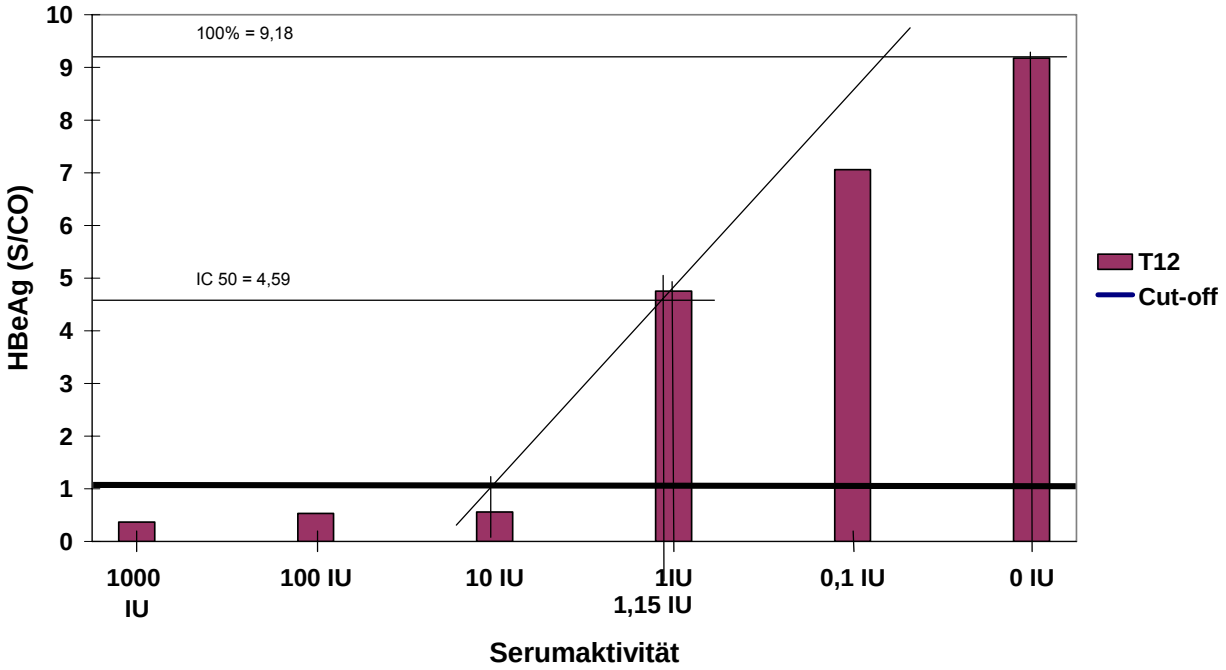

Abb. 26: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp C: 158 Fr.5 durch verschiedene Aktivitäten des Hyperimmunserums 1066834 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

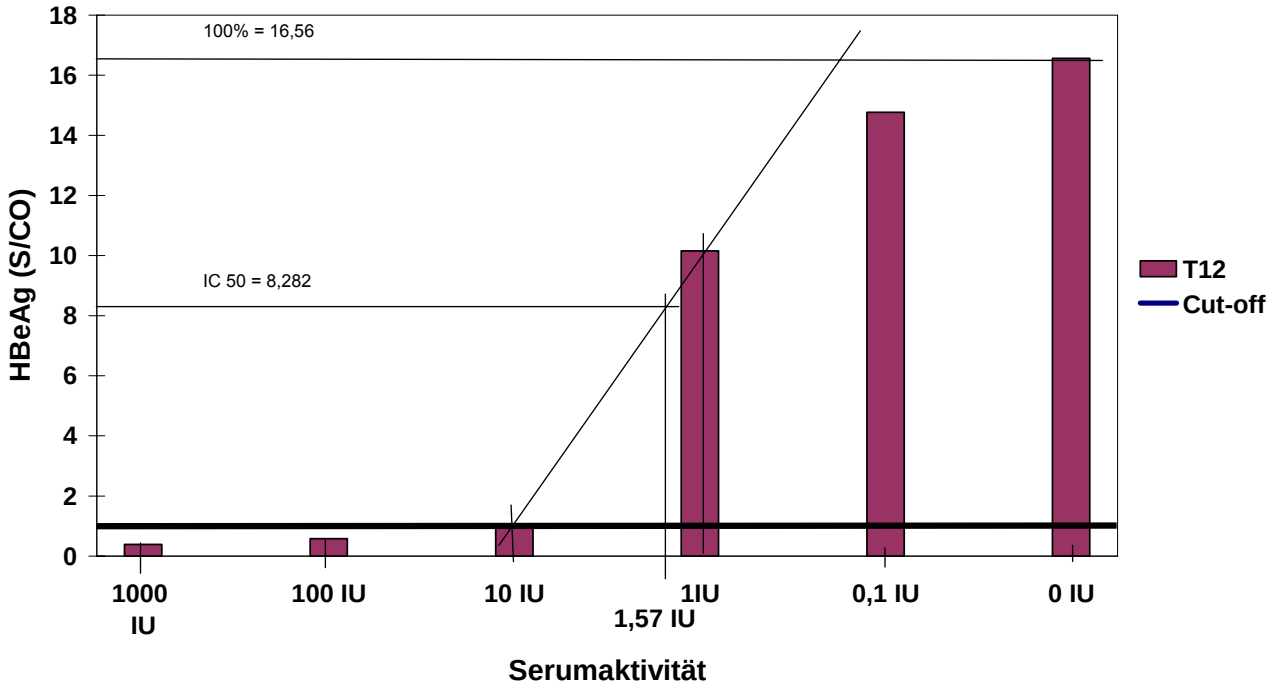

Abb. 27: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp D: 304 Fr.6 durch verschiedene Aktivitäten des Hyperimmunserums 1066834 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

1000 und 100 IU des Hyperimmunserums waren zum Schutz gegen alle untersuchten HBV-Genotypen ausreichend. Zum Schutz vor ID 158 Fr.5 Genotyp C reichten darüber hinaus auch 10 IU aus. Dieses war bei ID 304 Fr.6 Genotyp D grenzwertig und bei ID 253 A Genotyp A nicht ausreichend. Man könnte also aus der isolierten Betrachtung dieser Tatsache annehmen, daß sich der untersuchte Genotyp A auch hier am schlechtesten hemmen ließ, gefolgt vom untersuchten Genotyp D und daß die beste Infektionsinhibition auch hier bei HBV-Genotyp C zu erzielen war. Schaut man sich aber jeweils die unterschiedlichen IC50 in Bezug zum unterschiedlichen HBsAg-Gehalt in der Probe an (siehe Tab. 8), so wird deutlich, daß sich Genotyp A: ID 253 A am besten und Genotyp C: ID 158 Fr.5 und D: ID 304 F.6 am schlechtesten hemmen lassen.
Bei Wiederholungen desselben Versuchs waren 10 IU des Serums zur Hemmung des Genotyps D ausreichend und zur Infektionsinhibition von Genotyp C grenzwertig ausreichend. Das Ergebnis war dasselbe:

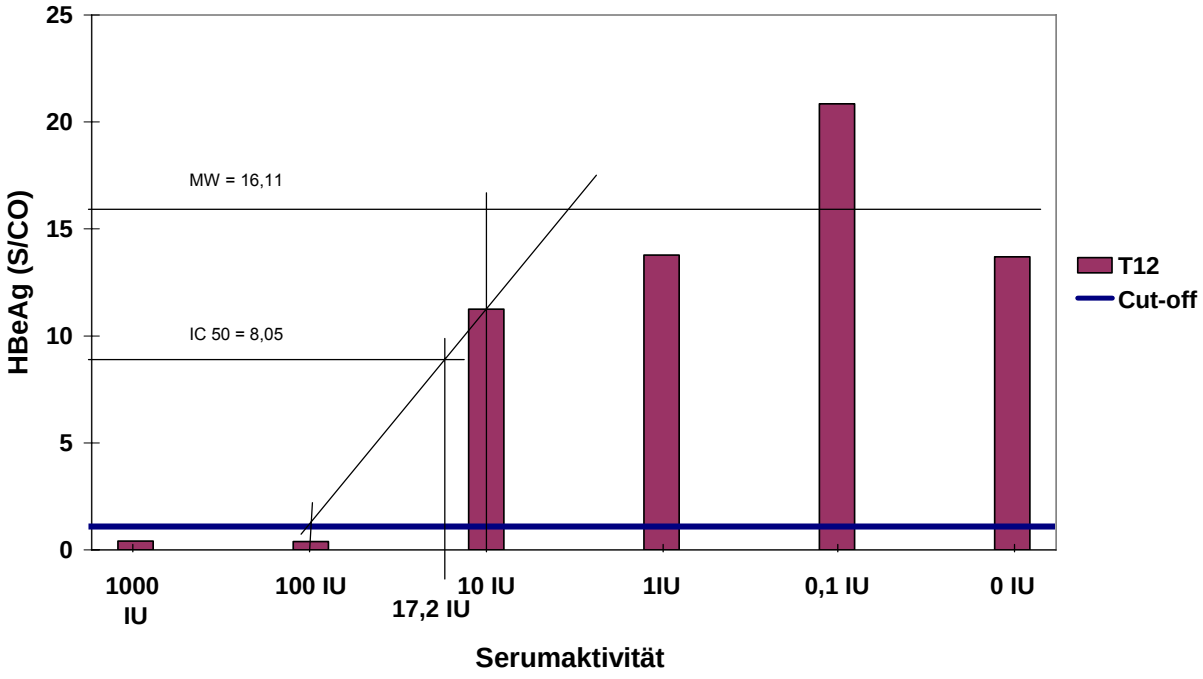

Abb. 28: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp A: ID 253A durch verschiedene Aktivitäten des Hyperimmunserums 1066834 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

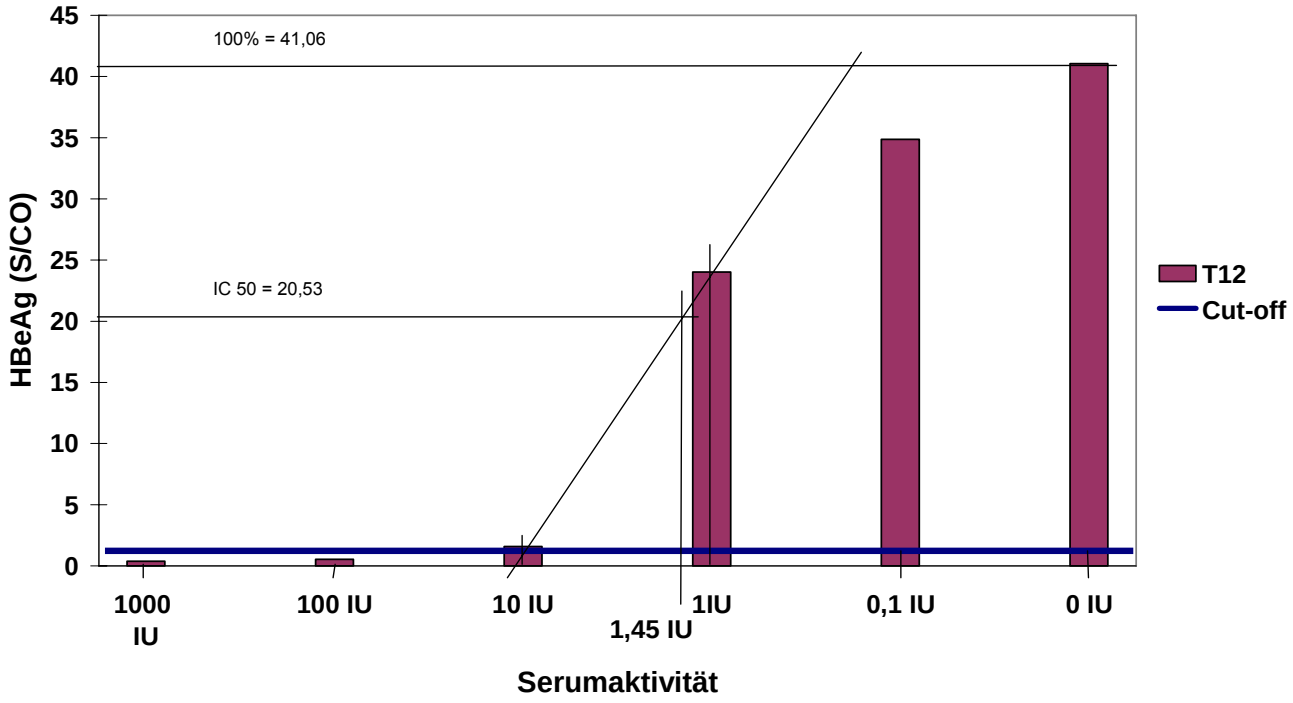

Abb. 29: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp C: 158 Fr.5 durch verschiedene Aktivitäten des Hyperimmunserums 1066834 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

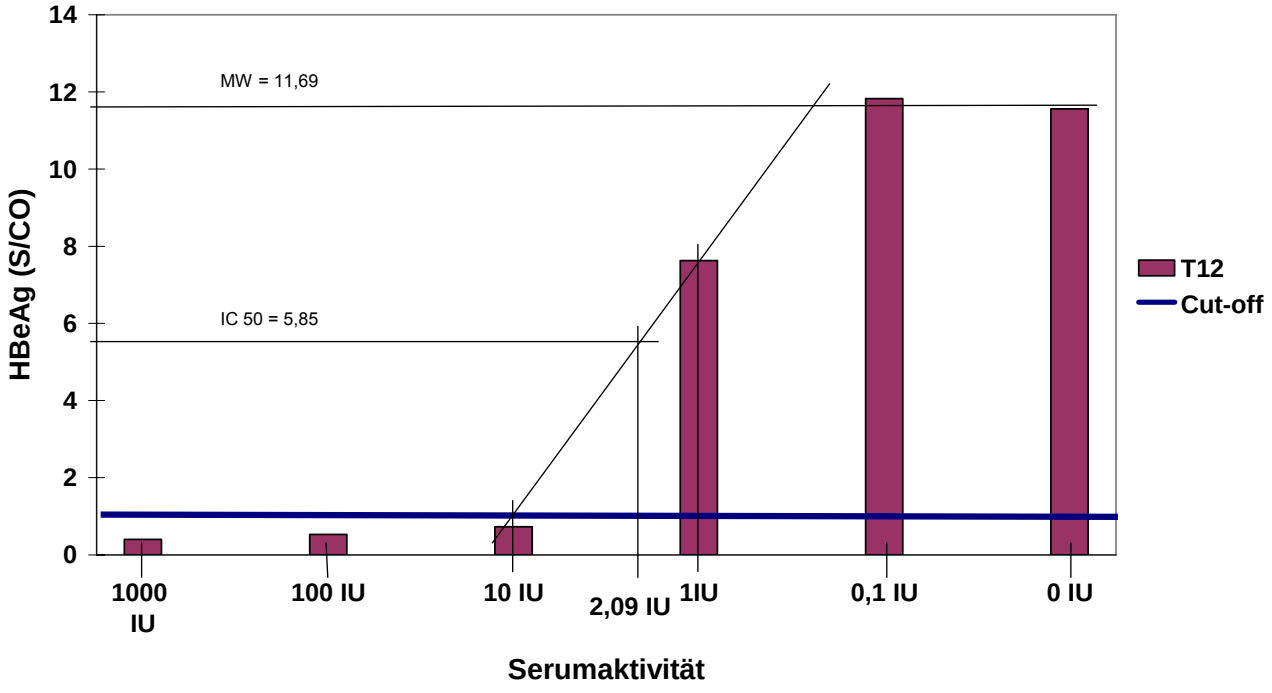

Abb. 30: Darstellung des Erfolges der Neutralisation von HBV-Genotyp D: 304 Fr.6 durch verschiedene Aktivitäten des Hyperimmunserums 1066834 im Balkendiagramm anhand der Höhe der HBeAg-Detektion. MW: Menge an Antikörpern, bei der im Mittel 100% des Virus gehemmt werden. IC50: Inhibitionskapazität von 50%.

10 IU sind also abhängig vom Genotyp inkonsistent infektionsinhibierend. 1000 und 100 IU inhibieren die Infektion bei allen Genotypen sicher. Genotyp A ließ sich in der isolierten Betrachtung der IC50 am schlechtesten, Genotyp C (siehe höhere HBeAg-Werte als Genotyp D) auch hier von allen drei Genotypen am besten inhibieren. Schaut man sich aber die unterschiedlichen IC50 in Bezug zum unterschiedlichen HBsAg-Gehalt in der Probe an, so wird auch hier deutlich, daß sich Genotyp A: ID 253A am besten und Genotyp C: ID 158 Fr.5 und D: ID 304 F.6 am schlechtesten hemmen lassen.

Tab. 8: Zusammenfassung Inhibition der verschiedenen HBV-Genotypen durch unterschiedliche Konzentrationen an Hyperimmunserum 1066834 in zwei Versuchsreihen.

Serum	Virusgenotyp	GE/µl	HBsAg in der Probe (ng)	IC50 (IU)	IC 50 (IU) in Bezug zum HBsAg in der Probe (ng)
1 **2**	**A:** ID 253 A (0,88µl/Well)	$2{,}03 \times 10^{11}$	18,6	12,13 17,2	0,65 0,92
1 **2**	**C:**ID 158 Fr.5 (2,1µl/Well)	$1{,}70 \times 10^{11}$	0,25	1,15 1,45	4,6 5,8
1 **2**	**D:**ID304 Fr.6(0,37µl/Well)	$2{,}70 \times 10^{11}$	0,35	1,57 2,09	4,49 6,0

Tab. 9: Zusammenfassung Inhibition der verschiedenen HBV-Genotypen durch unterschiedliche Konzentrationen an monoklonalen Antikörpern (MA 18/07 und C 20/02) und an polyklonalem Hyperimmunserum (1066834).

HBV-Genotyp	IC 50 MA 18/07		IC 50 C20/02		IC 50 Serum	
	pro 10 BE / pro ng HBsAg		pro 10 BE / pro ng HBsAg		pro 10 BE / pro ng HBsAg	
A:ID 253 A (0,88µl/Well)	55	2,96	7,26	0,39	14,67	0,79
C:ID 158 Fr. (2,1µl/Well)	6,04	24,16	13,8	55,2	1,3	5,2
D:ID304Fr.6(0,37µl/Well)	6,62	18,9	5,74	16,4	1,83	5,25

5. Diskussion

Die Arbeit

In dieser Arbeit wurden erstmals gezielt Infektionen und Infektionsinhibitionen mit verschiedenen HBV-Genotypen und verschiedenen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern in primären Tupaia-Hepatozyten durchgeführt.

Daß die HBV-Infektion primärer Tupaia belangeri-Hepatozyten spezifisch und vergleichbar mit der HBV-Infektion primärer menschlicher Hepatozyten ist, wurde 2003 von Glebe et al. gezeigt.

Der Vorteil von primären Tupaia-Hepatozyten gegenüber primären menschlichen Hepatozyten liegt in ihrer besseren Verfügbarkeit, ihrer häufig besseren Qualität und ihrer besseren in-vitro-Suszeptibilität für HBV.

Die in der Arbeit erstmals durchgeführten Infektionsversuche mit verschiedenen HBV-Genotypen und deren Infektionsinhibition durch verschiedene Antikörper im Tupaia-Modell sind deshalb von besonderem Interesse, da es neuerdings Hinweise darauf gibt, daß HBV-Genotypen keineswegs nur epidemiologische Bedeutung haben, sondern mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität, unterschiedlichem Krankheitsverlauf und unterschiedlichem Therapieansprechen assoziiert zu sein scheinen (Kao, Chen et al. 2004) (Kidd-Ljunggren, Myhre et al. 2004).

So sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob sich die Infektiosität und der Infektionsverlauf der verschiedenen HBV-Genotypen im Zellkultur-Modell unterscheidet. Desweiteren sollte geklärt werden, ob Schutz, zum Beispiel in Form einer HBV-Impfung, gegen einen bestimmten Genotyp auch Schutz gegen einen anderen gewährt; und falls dieses der Fall ist, wie gut dieses ausgeprägt ist.

Vorversuche

Zunächst wurde von den aus Serum aufgereinigten Viren (Genotyp A (ID 253A, ID 253B, ID 254), Genotyp C (ID 158 Fr.5, ID 158 Fr.6) und Genotyp D (ID 307 Fr.5, ID 304 Fr.6, ID 304 Fr.7) ein S-ELISA durchgeführt, um zu klären, ob alle Fraktionen in ihrem HBsAg-Anteil durch den ELISA, der neben der semiquantitativen HBeAg-Bestimmung zur Auswertung der Infektions- und Inhibitionsversuche dient, ähnlich sind. Die Menge an HBsAg wurde quantitativ bestimmt. Das Signal im Sandwich-ELISA wurde in Bezug zur Viruskonzentration gesetzt und dargestellt, so daß letztendlich die Menge an HBsAg im Verhältnis zur

jeweiligen Viruskonzentration berechnet und dargestellt werden konnte. In der Konzentration an HBsAg bestanden zwischen den Virusfraktionen wesentliche Unterschiede. Am meisten HBsAg pro Viruspartikel enthielt ID 304 Fr.7 mit 26100 ng/10^{11} Viruspartikeln, am wenigsten ID 158 Fr. 5 mit 68,8 ng/10^{11} Viruspartikeln (siehe Tab.1).

Infektionsversuche wurden zunächst mit gereinigten Viren von HBV Genotyp D (ID 307 Fr.5) durchgeführt, um den Infektionserfolg im Tupaia-System mit dem bereits vorher von anderen Personen der Arbeitsgruppe verwendeten Genotyp D zu demonstrieren und um das geeignete Versuchsmedium im Vergleich von Tup.Med./1%DMSO gegen HGM für die nachfolgenden Versuche zu finden. Der Infektionserfolg durch HBV-Genotyp D fiel in HGM besser aus als in Tup.Med./1%DMSO. Dieses könnte an dem Glucosezusatz in HGM, an der in HGM enthaltenen Pyrrolidincarbonsäure Prolin oder an besonderen Aminosäuren wie Ornithin liegen, die an der Regulation biologischer Prozesse beteiligt sind. Für die nachfolgenden Versuche wurde daher ausschließlich HGM verwendet.

Desweiteren wurden Inhibitionsversuche mit HBV Genotyp D und den drei monoklonalen Antikörpern C 20/02, Q 19/10 und MA 18/07 gegen die drei Hauptproteine des HBsAg: SHBs, MHBs und LHBs durchgeführt. Da diese Versuche zeitgleich zum Austesten des Zellkulturmediums stattfanden, wurde hierbei noch das Medium Tup.Med./1%DMSO verwendet. Gehemmt werden konnte HBV Genotyp D durch alle drei Antikörper, eine komplette Virusneutralisation wurde jedoch bei einer Menge von 2 µg Antikörper nur durch MA 18/07 erreicht. Grund hierfür könnte sein, daß MA 18/07, welches gegen das PräS1-Antigen im LHBs gerichtet ist, HBV bereits auf einer früheren Stufe als die anderen beiden Antikörper hemmt, weshalb von MA 18/07 geringere Mengen zur Virusneutralisation ausreichend sind. Da PräS1 für die Bindung an und die Aufnahme von HBV in die Zelle essentiell ist (Glebe 2005), hemmt MA 18/07 möglicherweise bereits diesen Schritt. Von C 20/02, einem Antikörper gegen die S-Domäne im SHBs, sind für eine Virusneutralisation größere Mengen erforderlich. Mit 2 µg/300 µl C 20/02 war, im Gegensatz zu MA 18/07, bei den Versuchen keine komplette Virusneutralisation zu erreichen. SHBs ist für die Infektivität und Morphogenese von HBV essentiell. Gründe warum größere Mengen an C 20/02 als an MA 18/07 notwendig sind, könnte der andere Angriffspunkt von C 20/02 sein. Dieser Antikörper ist gegen die Antigenschleife von Aminosäure 100-160 im SHBs gerichtet, führt möglicherweise nach Bindung

zu einer Konformationsänderung in HBV und verhindert so den Viruseintritt, greift also an einem späteren Infektionsschritt an. Außerdem, und dieses scheint die Ursache für die bessere Hemmbarkeit von ID 307 Fr.5 durch MA 18/07 zu sein, ist die Viruspräparation von ID 307 Fr.5 stark mit subviralem HBsAg verunreinigt (siehe Tab. 1), und die Viren und insbesondere die subviralen HBsAg-Partikel, die noch in der Viruspräparation vorhanden sind, enthalten mehr SHBs als LHBs, so daß durch die subviralen Partikel mehr C 20/02 als MA 18/07 abgefangen wird, und somit weniger Antikörper zur Virusinhibition zur Verfügung steht. Mit Q 19/10 gegen PräS2 im MHBs ist eine Virusneutralisation noch schwieriger zu erreichen. Bei den Versuchen gelang die Virusabschwächung mit 2 µg/300 µl Q 19/10 noch weniger als mit 2 µg/300 µl C 20/02. Ursächlich hierfür könnte sein, daß MHBs für die Infektivität von HBV im Gegensatz zu LHBs und SHBs, wenn auch infektionsfördernd, so doch nicht essentiell ist.
Es schlossen sich die Versuche an den verschiedenen Hepatitis B Virus-Genotypen an.

Infektion durch verschiedene HBV-Genotypen

In den ersten Infektionsversuchen mit den HBV-Genotypen wurde geklärt, ob alle Fraktionen im Tupaia-System eine Infektion generieren können und ob dieses bei allen Genotypen mit ähnlichem Erfolg geschieht. Die Infektiosität der Genotypen wurde anhand des HBeAg an Tag 12 analysiert: Ein zuverlässiger Infektionserfolg ließ sich bei allen Fraktionen mit $5x10^8$GE erzielen. Die besten Infektionserfolge wurden bei Genotyp A mit ID 253 A (produziertes HBeAg im Mittel 37,71 S/Co), bei Genotyp C mit ID 158 Fr.5 (produziertes HBeAg im Mittel 19,1 S/Co), und bei Genotyp D mit ID 304 Fr.6 (produziertes HBeAg im Mittel 68,4 S/Co) erzielt. Diese Fraktionen wurden daher in die anschließenden Versuche eingesetzt. Bei $5x10^7$GE gab es ein mehr oder weniger gutes Signal bei der HBeAg-Detektion; $5x10^6$GE waren bei ID 307 Fr.5 grenzwertig, ansonsten in keinem Fall ausreichend. Um die Viren und Genotypen untereinander vergleichbar zu machen, wurde der Begriff der biologischen Virusaktivität eingeführt und wie folgt definiert: Zum Berechnen der biologischen Aktivität wurde das HBeAg-Signal von Tag 12 (T12) von $5x10^8$ GE (siehe Tab. 6) durch die eingesetzte µl-Menge des Viruspräparats (siehe Tab. 7, 8 und 9) dividiert. Das Ergebnis waren die oben genannten Werte der biologischen Virusaktivität. Für die weiteren Infektions-/Infektionsinhibitionsexperimente wurde dann die Virusmenge eingesetzt, die an

Tag 12 post infectionem einen Wert von 10 [S/Co] HBeAg produziert, und die HBV-Präparationen sind damit in den Versuchen bezüglich der HBeAg-Produktion (Infektiosität) vergleichbar. Die Versuche ergaben, daß zwischen den Genotypen folgende Unterschiede bestehen: Genotyp D produzierte insgesamt am meisten HBeAg, gefolgt von Genotyp A, und Genotyp C bildete das Schlusslicht in der HBeAg-Produktion. Allerdings zeigte Genotyp D ID 304 Fr.7, im Gegensatz zu den anderen untersuchten HBV-Genotypen D, nur eine geringe HBeAg-Produktion in den Versuchen (produziertes HBeAg im Mittel 7,21 S/Co), was mutmaßlich an der Verunreinigung mit den subviralen HBsAg-Partikeln lag.

Die geringe Infektiosität von Genotyp C in den Infektionsversuchen läßt sich gut mit der Beobachtung bestimmter Autoren vereinbaren, daß Infektionen durch Genotyp C (auch wenn die Titer bei Genotyp C-infizierten Menschen in der Regel höher sind als bei durch andere Genotypen Infizierten) akut weniger dramatisch, sondern protrahierter verlaufen (Kidd-Ljunggren et al. 2004), öfter mit Komplikatonen wie z.B. HCC (Iizuka et al. 2006) oder Leberzirrhose (Kao et al. 2000) und schlechterem Therapieansprechen auf Interferon (Weber B. 2004) assoziiert sind und eher vertikal als horizontal übertragen werden. Desweiteren ist die Inzidenz von Core-Gen-Mutationen bei Genotyp C höher, welche die Virusreplikation beeinflussen und den Leberschaden verstärken können. Bei Genotyp D hingegen wurde beobachtet, daß die Krankheitsdauer kürzer ist (Kiss-Ljunggren et al. 2004), also akuter verläuft, mit höheren ALT-Leveln assoziiert ist und eher horizontal (v.a. durch i.v.-Drogengebrauch und Bluttransfusionen) übertragen wird; vermutlich weil es infektiöser ist. Auch Genotyp A wird eher horizontal übertragen (v.a. durch Sexualkontakte) (Halfon et al. 2006), vermutlich aus demselben Grund wie für Genotyp D vermutet. Desweiteren sprechen die Genotypen A und D besser auf antivirale Therapien an, vermutlich durch ihren akuteren Verlauf. Auch die Ergebnisse meiner Infektionsversuche zu Genotyp D und A sprechen für diese Beobachtungen. Allerdings muß in den vorangehenden Ausführungen dieses Absatzes beachtet werden, daß es sich um ein in-vitro-System und um Zellen außerhalb von einem Gesamtorganismus, und damit außerhalb von einem Immunsystem, handelt.

Desweiteren wurde in den Versuchen die Infektionskinetik jeder Fraktion anhand des HBsAg analysiert. Auch hier wurden Unterschiede festgestellt: Für Genotyp D ID 307 Fr.5 war durch die ersten Versuche bereits folgende Infektionskinetik bekannt: Im Input und somit im Inokulat an Tag 0 war HBsAg enthalten. Dieses

erreichte an Tag 3 post infectionem sein Minimum, stieg bis Tag 6 an und erreichte von Tag 9 bis Tag 12 post infectionem ein Plateau oder stieg zum Teil bis Tag 12 post infectionem noch leicht an. Die Nachweisbarkeit von HBsAg im Inokulat liegt an der Tatsache, daß HBsAg Teil des Virus selbst ist. Daß nach Zugabe des Virus anschließend eine Infektion der Hepatozyten erfolgt mit Neuproduktion von HBsAg wird deutlich, indem HBsAg an Tag 3 ein Minimum aufweist, später jedoch wieder ansteigt. HBsAg-Anstiege an Tag 6 post infectionem sind also sehr wahrscheinlich auf eine Neusynthese von HBsAg durch die infizierten Hepatozyten anzusehen.

Die Infektionskinetik von HBV-Genotyp D ID 307 Fr.5 wurde in diesen Versuchen nochmals bestätigt. Sie fand sich so auch bei HBV Genotyp D ID 304 Fr.6. Genotyp A: ID 253 A verhielt sich in der Infektionskinetik ähnlich wie die Genotypen D ID 307 Fr.5 und ID 304 Fr.6. Die Genotyp A-HBV-Viren ID 253 B und ID 254 wiesen ihr Minimum zwar erst an Tag 6 auf, verhielten sich aber in ihrer Infektionskinetik ansonsten ähnlich. Es handelt sich also um dieselbe Infektionskinetik mit leichter Verschiebung der Minima und Maxima. Dasselbe gilt für HBV Genotyp D ID 304 Fr.7.

Genotyp C, und zwar beide Genotyp C-Fraktionen, jedoch wich von oben beschriebener Kinetik ab. Das Minimum der HBsAg-Detektion lag ebenfalls an Tag 3 post infectionem. Dann kam es jedoch zu einem Maximum an Tag 9 mit nachfolgendem Abfall an Tag 12. Die Infektionskinetik von Genotyp C unterscheidet sich also von der Infektionskinetik der Genotypen A und D.

Die unterschiedliche Infektiosität der Genotypen und die unterschiedliche Infektionskinetik könnte folgende Gründe haben: HBV-Genotypen unterscheiden sich um mehr als 8 % in ihrem Gesamtgenom, unter anderem im HBsAg, in der Core-promoter- und Präcore-Region. Unterschiede im PräS1 des HBsAg bewirken wie bereits oben erwähnt ein unterschiedliches Bindungsvermögen von HBV an die Leberzelle und beeinflussen unter anderem die Nukleokapsidbildung. Unterschiede in der S-Domäne , v.a. in der „a“-Determinante (AS 124-147), bewirken eine unterschiedliche Viruskonformation und beeinflussen damit die Antigenität des Virus. Darüber hinaus scheint sich die Transkriptionsregulation des HBV-Genoms bei den verschiedenen HBV-Genotypen zu unterscheiden, was ebenfalls Unterschiede in der Klinik der unterschiedlichen HBV-Genotypen erklären könnte (Fischer et al. 2006).

Neutralisation der verschiedenen HBV-Genotypen

Zur Infektionsinhibition der verschiedenen HBV-Genotypen dienten die murinen monoklonalen Antikörper C 20/02 gegen S und MA 18/07 gegen PräS1 und außerdem gefällte polyklonale Antikörper aus dem anti-HBs-enthaltenden Hyperimmunserum 1066834. Diese Versuche sollten zeigen, welche HBV-Domänen für eine Infektion wichtig sind, und ob ein Schutz gegen den einen Genotyp auch gegen einen anderen, in diesem Bereich gering abweichenden Genotyp, schützt. Auf weitere Inhibitionsversuche mit dem anti-PräS2-Antikörper Q 19/10 wurde verzichtet, da dessen Neutralisationsfähigkeit in den ersten Versuchen gegen HBV Genotyp D: ID 307 Fr.5 gering war.

Es ließen sich alle Genotypen durch C 20/02 abschwächen, wobei dieses, betrachtet man die IC50, bei allen Genotypen verschieden gut gelang. Genotyp C: ID 158 Fr.5 ließ sich am schlechtesten (IC50: 13,8 ng) , Genotyp D: ID 304 Fr.6 (IC50: 5,74), gefolgt von Genotyp A: ID 253A (IC50: 7,26 ng) am besten hemmen. Jedoch enthalten alle HBV-Genotyp-Präparationen eine unterschiedliche Menge an HBsAg. Je mehr HBsAg in der Lösung enthalten ist, desto mehr C 20/02 ist für die Hemmung des jeweiligen Virus erforderlich. Betrachtet man nun die IC50 in Bezug zur Menge an HBsAg (in ng) in der jeweiligen Viruslösung, so wird folgendes deutlich: Genotyp C: ID 158 Fr.5 ließ sich am schlechtesten (IC50/ng HBsAg in der Probe: 55,2), Genotyp A: ID 253A (IC50/ng HBsAg in der Probe: 0,39) am besten hemmen (siehe Tab.10), Genotyp D: ID 304 Fr.6 nahm eine Mittelstellung (IC50/ng HBsAg in der Probe: 16,4) ein. Die Unterschiede in der Inhibitionsfähigkeit der verschiedenen HBV-Genotypen durch C 20/02 könnte an den Unterschieden von ca. 4 % in der „a“-Determinante, und damit im hauptneutralisierenden Epitop des HBV liegen, gegen die C 20/02 gerichtet ist.

Über die Neutralisationsfähigkeit in vivo läßt sich jedoch, da es zu keiner vollständigen Neutralisation in vitro kam, nichts sagen. Um einen sicheren Schutz zu bewirken muß wahrscheinlich eine sehr hohe Dosis aufgewendet werden.

Inhibitionsfähigkeit eines anderen monoklonalen Antikörpers (anti-PräS1):

Bei der Infektionsinhibition mit MA 18/07 fanden sich ebenfalls Unterschiede in der Neutralisationsfähigkeit der verschiedenen HBV-Genotypen. Im MA 18/07-Epitop der AS 20-23 unterscheiden sich die HBV-Genotypen aber nicht. Es könnte jedoch durch Antikörperbindung hier zu einer Konformationsänderung kommen, welche sich auch auf andere Epitope, z.B. die „a“-Determinante, auswirkt und damit die

Gesamtpathogenität/-infektiosität des Virus beeinflusst und zwar durch die Unterschiede in den Epitopen jeweils anders.
Bei Genotyp C war selbst eine MA 18/07-Menge von 0,02 µg zur Infektionsinhibition noch ausreichend. Genotyp D lag bei 0,02 µg MA 18/07 bereits knapp über dem Cut-off. Die Infektionsinhibition durch MA 18/07 gelang bei HBV-Genotyp A auf den ersten Blick am schlechtesten. Betrachtet man jedoch die IC50 in Bezug zu der jeweiligen HBsAg-Menge in der Probe, so wird folgendes deutlich: HBV-Genotyp C ließ sich auch hier am schlechtesten hemmen (IC50/ng HBsAg in der Probe: 24,16). Genotyp D (IC50/ng HBsAg in der Probe: 18,9) nahm eine Mittelstellung ein. Die Infektionsinhibition durch MA 18/07 gelang auch hier bei HBV-Genotyp A am schlechtesten (IC50/ng HBsAg in der Probe: 2,96).
Die Verhältnisse waren also bei MA 18/07 und C 20/02 in Bezug auf die Hemmbarkeit der verschiedenen HBV-Genotypen ähnlich.

Inhibitionsfähigkeit C 20/02 und MA 18/07 im Vergleich:
Gegenüber C 20/02 besaß der monoklonale anti-PräS1-Antikörper MA 18/07, läßt man die IC50 außer Betracht, auf den ersten Blick die stärkere Neutralisationsfähigkeit gegenüber den eingesetzten HBV-Genotypen. Dieses war insofern überraschend, weil anti-HBs gegen die „a“-Determinante, das hauptneutralisierende Epitop des HBV gerichtet ist, und man vermuten könnte, daß C 20/02 daher überlegen ist. Grund für die Überlegenheit von MA 18/07 könnte jedoch wie bereits oben bei ID 307 Fr.5 erwähnt wurde, sein, daß MA 18/07 bereits die durch PräS1-vermittelte Virusbindung an die Leberzellen verhindert, die Infektionsinhibition also in einem früheren Stadium als bei C 20/02 stattfindet und damit effektiver ist. Ein weiterer ebenfalls bereits erwähnter Grund könnte sein, daß die Viruspräparationen mehr SHBs als LHBs enthalten, und somit mehr C 20/02 als MA 18/07 abgefangen wird und damit zur Virusneutralisation nicht mehr zur Verfügung steht. 0,2 µg von MA 18/07 reichten im Gegensatz zu 0,2 µg C 20/02 bei allen Genotypen zur Infektionsinhibition aus. Betrachtet man jedoch die IC50, und weil die HBV-Genotyp-Präparationen jeweils eine unterschiedliche Menge an HBsAg enthalten besser die IC50 pro ng HBsAg in der Probe, wird deutlich, daß MA 18/07 die HBV-Genotypen schlechter als C 20/02 hemmt. Dieses war wie oben bereits ausgeführt zu erwarten, weil anti-HBs gegen die „a“-Determinante, das hauptneutralisierende Epitop des HBV, gerichtet ist. HBV-Genotyp C: ID 158 Fr.5, wurde jedoch überraschender Weise auch bei

Berücksichtigung der IC50 pro ng HBsAg in der Probe durch MA 18/07 (IC50/ng HBsAg in der Probe: 24,16) besser als durch C 20/02 (IC50/ng HBsAg in der Probe: 55,2) gehemmt. Dieses könnte daran liegen, daß sich dieser Genotyp von den anderen, sich ebenfalls unterscheidenden HBV-Genotypen, insbesondere von Genotyp A, im SHBs unterscheidet. Allerdings wurde der Antikörper durch Immunisierung mit HBsAg des Genotyps A und D, nicht aber C erzeugt, was der gewichtigere Grund sein könnte.

Inhibitionsfähigkeit des Hyperimmunserums 1066834:

Das Hyperimmunserum 1066834 stammt von einem Spender, der zuvor mit dem Impfstoff Engerix® geimpft wurde. Es enthielt also anti-HBs-Antikörper. Anti-HBs-Antikörper sind gegen die S-Domäne des SHBs gerichtet, in der sich unter anderem die immunogene „a“-Determinante des HBV befindet (AS 124-147), die wie bereits oben erwähnt wurde, das hauptneutralisierende Epitop von HBV darstellt, an der Oberfläche des Virions lokalisiert ist und sich bei den verschiedenen Genotypen unterscheidet. Interessant sind diese Neutralisationsversuche mit durch HBV-Vakzinierung generierten Serum-Antikörpern im Hinblick auf die schützende Wirkung der derzeitigen HBV-Impfung (Engerix® oder Twinrix®) in Bezug auf die verschiedenen Genotypen. Die Impfung wurde nämlich ausschließlich gegen HBV-Genotyp A2 oder Subtyp HBsAg adw2 entwickelt. Es war also zu klären, ob dieser Schutz auch die anderen Genotypen mit einschließt. Außerdem sollte getestet werden, wieviele Internationale Units des Serums hierfür notwendig sind. 1000 und 100 IU des Hyperimmunserums waren zum Schutz gegen alle untersuchten HBV-Genotypen ausreichend. Zum Schutz vor ID 158 Fr.5 Genotyp C reichten darüber hinaus auch 10 IU aus. Dieses war bei ID 304 Fr.6 Genotyp D fraglich und bei ID 253 A Genotyp A nicht ausreichend. Auch hier könnte man daher auf den ersten Blick annehmen, daß sich HBV-Genotyp A am schlechtesten und HBV-Genotyp C am besten hemmen läßt. Betrachtet man jedoch die IC50 pro ng HBsAg in der Probe, so stellt sich folgendes dar: Die IC 50/ng HBsAg in der Probe war bei Genotyp A: ID 253 A am niedrigsten (im Mittel 0,79) und bei Genotyp C: ID 158 Fr.5 (im Mittel 5,2) und Genotyp D (im Mittel 5,25) viel höher. Betrachtet man die IC50 in Bezug zum HBsAg-Gehalt in der Probe, so wird also deutlich, daß sich auch hier, im Falle der Impfstoff-induzierten SHBs-Antikörper, HBV-Genotyp C und D schlechter und Genotyp A viel besser hemmen läßt. Auch hier sind die Unterschiede im HBV-

SHBs der verschiedenen HBV-Genotypen von über 4 % ausschlaggebend, wenn es um die Inhibition der Genotypen geht.

Die Befunde zeigen, daß dem Genotyp des Impfstoffs eine große Bedeutung für die Schutzwirkung zukommt. Man kann annehmen, daß scheinbar gleiche anti-HBs-Mengen, die durch den Engerix®-Impfstoff induziert wurden, deutlich schlechter gegen alle anderen Genotypen als A schützen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Methodisch konnte in der Arbeit gezeigt werden, daß zur Kultivierung, Infektion und Infektionsinhibition im Zellkulturmodell der Tupaia belangeri-Hepatozyten das Hepatocyte Growth Medium besser als das Tup.Med./1% DMSO ist. Desweiteren wurde gezeigt, daß im ELISA das OPD-Substrat im Gegensatz zu ABTS einen empfindlicheren Nachweis erlaubte, und daß auch BM blue dem OPD-Substrat bezüglich der Sensitivität nicht überlegen ist.

Inhaltlich konnte gezeigt werden, daß im hier verwendeten in-vitro-Infektionssystem die untersuchten HBV-Virionen Genotyp D gefolgt von A die höchste und Genotyp C die geringste Infektiosität besaßen, jeweils gemessen an der HBeAg-Produktion. Desweiteren wurde gezeigt, daß sich alle HBV-Genotypen durch C 20/02 abschwächen ließen, wobei dieses unterschiedlich gut geschah. Über die abschließende Neutralisationsfähigkeit von C 20/02 in vivo läßt sich jedoch, da es zu keiner vollständigen Neutralisation kam, nichts sagen. Die Arbeit zeigte, daß sich alle HBV-Genotypen durch MA 18/07 vollständig neutralisieren ließen, aber unterschiedliche Mengen an MA 18/07 nötig waren. In allen Inhibitionsversuchen mit monoklonalen Antikörpern (C 20/02 und MA 18/07) ließ sich Genotyp C am schlechtesten neutralisieren. Die besten Inhibitionsresultate waren bei Genotyp A, gefolgt von Genotyp D zu erzielen.

Wie ebenfalls in den Versuchen gezeigt wurde, ließ sich Genotyp A auch durch die Antikörper, die nach der HBV-Impfung mit Genotyp A im Immunsystem generiert wurden, am besten hemmen, was zu erwarten war. Auch durch die polyklonalen Antikörper wurden HBV-Genotyp C und D am schlechtesten inhibiert. Dieses zeigt, daß Genotyp A2 als Grundlage der derzeitigen HBV-Impfung nicht ausreichend ist. Die Probleme der derzeitigen Impfung, die ausschließlich gegen Genotyp A2 entwickelt wurde und deren einzige Grundlage das SHBs ist, liegen also

- in ihrer unterschiedlich guten Neutralisationsfähigkeit gegenüber den verschiedenen HBV-Genotypen.

Desweiteren gibt es folgende in der Literatur beschriebene negative Aspekte der derzeitigen Impfung:

- Es kann zum Non-Respondertum, v.a. bei Männern, immunkompromittierten Individuen, Adipositas, Niereninsuffizienz oder genetischer Resistenz (assoziiert mit DRB 1*3, DRB 1*7 und DRB1*14) kommen (Shouval 2003).

- Nach Impfung und Behandlung mit HBV-Immunglobulin kam es zum vermehrten Auftreten von Escape-Mutanten im S-Gen (Shouval 2003).

Die Arbeit liefert schließlich Ideen/mögliche Auswege für die Zukunft zur Umgehung dieser drei Probleme: Ein Ausweg für die Zukunft zum Umgehen beider letzten Probleme wäre möglicherweise der Zusatz von gentechnisch hergestelltem PräS1-Antigen zum Impfstoff. Es sind, wie in der Arbeit gezeigt werden konnte, durch anti-PräS1-Antikörper gleichsinnige wie bei C 20/02 und darüber hinaus mit weniger Menge an Antikörpern vollständige Inhibitionsergebnisse zu erzielen. Durch Zusatz von gentechnisch hergestelltem PräS1-Antigen zum Impfstoff würde außerdem ein weiterer Angriffspunkt zur Infektionsinhibition avisiert, die Bildung von Escape-Mutanten würde damit erschwert und die Immunogenität der derzeitigen Impfung mutmaßlich verbessert. Da die PräS-Domänen die Haupt-T-Zellaktivatoren darstellen, würde es neben der besseren Infektionsinhibition möglicher Weise zu einer potenteren T-Zellaktivierung und damit zu einer besseren Immunreaktion kommen. Ein unterschiedlich guter Schutz gegenüber den verschiedenen HBV-Genotypen würde aber bestehen bleiben. Ein Ausweg für die Zukunft zur Umgehung aller drei genannten Probleme wäre die Impfung gegen mehrere HBV-Genotypen. So würde die Selektion von Escape-Mutanten im S-Gen vermindert, da sich die Genotypen hier unterscheiden. Desweiteren würde Schutz gegen verschiedene Genotypen (u.a. auch gegen die schlecht hemmbaren Genotyen C und D) generiert und durch Antikörper gegen verschiedene sich z.T. unterscheidende Epitope in der S-Domäne (insbesondere in den sich hier mutmaßlich am meisten unterscheidenden HBV-Genotypen C und A) die Immunogenität der derzeitigen Impfung gegen HBV-Genotyp A möglicher Weise erhöht.

7. Literaturverzeichnis

Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ, 1971, *New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis*, Lancet 2: 1225-1227

Berting A, Fischer C et al., 2000, *Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus*, Virus Res, 68: 35-49

Berting A, Hahnen J et al., 1995, *Computer-aided studies on the spatial structure of the small hepatitis B surface protein*, Intervirlogy, 38: 8-15

Block TM, Lu X et al., 1994, *Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxynojirimycin*, Proc Natl Acad Sci USA, 91: 2235-2239

Blumberg BS, Gerstley BJS, Hungerford DA et al., 1967, *A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis*, Ann Intern Med 66: 924-931

Bruss V, Hagelstein J et al., 1996, *Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity*, Virologie, 218: 396-9

Bruss V, 1997, *A short linear sequence in the Prä-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation*, J Virol 71: 9350-7

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, Mc Garvey MJ, Makris A, Thomas HC, 1989, *Mutation Preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection*, Lancet ii: 588-591

Chan HLY, Hussain M, Lok ASF, 2003, *Different hepatitis b virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and Präcore regions during hepatitis B e antigen seroconversion*, Hepatology Vol. 29 Issue 3: 976-984

Chen HS, Kew MC et al., 1992, *The Precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host*, J Virol, 66(9): 5682-84

Crowther RA, Kiselev NA et al., 1994, *Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy*, Cell, 77: 943-950

Dandri M, Burda MR et al., 2002, *Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation*, Hepatology 35: 217-23

Dane DS, Cameron CH, Briggs M, 1970, *virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis*, Lancet 1: 695-698

Dusheiko GM, Bowyer SM et al., 1985, *Replication of hepatitis B virus in adult carriers in an endemic area*, J Infect Dis, 152: 566-71

Fischer SF, Schmidt K, Fiedler N, Glebe D, Schuttler C, Sun J, Gerlich WH, Repp R, Schaefer S, 2006, *Genotype-dependent activation or repression of HBV enhancer II by transcription factor COUP-TF1*, World J of Gastroenterology, 12(37): 6054-6058

Gallina A, Gazina E, Milanese G, 1995, *A C-terminal PräS1-sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells*, Virology, 213: 57-69

Gazina EV, Fielding JE et al., 2000, *Core protein phosphorylation modulates Prägenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses*, J Virol 74: 4721-8

Gerlich WH et Kann M, 2005, *Structure and Molecular Virology*, Viral Hepatitis, Zuckerman AJ et Thomas HC (eds), Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo: Churchill Livingston, 149-180

Gerlich WH et Kann M, 2005, *Hepatitis B*, Topley & Wilson´s Microbiology and Microbial Infections, 9th edition, Collier L, Balows A, Sussman M (eds), Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, U.K.: 1226-1268

Gerlich WH, Schaefer S, 2002, *Hepadnaviren: Hepatitis-B-Virus*, Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Erkrankungen, Hrsg. Doerr HW und Gerlich WH, Thieme-Verlag Stuttgart 2002, 191-210

Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop E, Valerius KP und Gerlich WH, 2003, *Prä-S1 Antigen-Dependent Infection of Tupaia Hepatocyte Cultures with Human Hepatitis B Virus*, J of Virology 77: 9511-9521

Glebe D et Gerlich WH, 2004, *Study of the endocytosis and intracellular lokalization of subviral particles of hepatitis B virus in primary hepatocytes*, Robert K Hamataka, Johnson YN, Lau (Hrsg.), Hepatitis B and D Protocols, Methods in molecular medicine, 96: 143-151, Humana Press

Glebe D, Urban S, 2007, *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry,* World Journal of Gastroenterology 13(1): 22-38

Hafner A, Brandenburg B, Hildt E, 2003, *Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein*, EMBO Rep, 4: 767-773

Hagiwara S, Kudo M, Minami Y, Chung H, Nakatani T, Fukunaga T, Osaki Y, Yashita Y, Kajimura K, 2006, *Clinical Significance of the Genotype and Core Promoter/Prä-Core Mutations in Hepatitis B Virus Carriers*, Intervirology 49(4): 200-206

Halfon P, Bourlière M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Pénaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier M-H, Poynard T und Cacoub P, 2006, *Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status*, Journal of Viral Hepatitis, 13: 329

Huang J, Liang TJ, 1993, *A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products*, Mol Cell Biol 13:7476-86

Hussain M, Chu C-J, Sablon E, Lok ASF, 2003, *Rapid and Sensitive Assays for Determination of Hepatitis B Virus (HBV) Genotypes and detection of HBV Präcore and Core Promoter Variants*, J of Clin Microbiol, Vol. 41 No 8: 3699-3705

Iizuka N, Tsunedomi R, Tamesa T, Okada T, Sakamoto K, Hamaguchi T, Yamada-Okabe H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Oka M, 2006, *Involvement of c-myc-regulated genes in hepatocellular carcinoma related to genotype-C hepatitis B virus*, J Cancer Res Clin Oncol, 132 (7): 473-81

Kann M, Sodeik B et al., 1999, *Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex*, J Cell Biol 145: 45-55

Kao JH, Chen PJ, Lai MY et al., 2000, *Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B*, Gastroenterology 2000, 118: 554-559

Kao JH, Chen PJ et al., 2004, *Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers*, J Med Virol, 72: 363-9

Kenney JM, von Bonsdorff CH et al., 1995, *Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores*, Structure, 3: 1009-1019

Kidd-Ljunggren K, Myhre E and Bläckberg J, 2004, *Clinical and Serological Variation between Patients Infected with different Hepatitis B Virus Genotypes*, J Clin Microbiol 42(12): 5837-5841

Köck J, Schlicht HJ, 1993, *Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity*, J Virol, 67: 4867-74

Krone B, Gerlich WH et al., 1990, *Significance of preS antigens for hepatitis B vaccines, Progress in hepatitis B immunisation*. P. Coursaget, MJTong eds 21- 34 John Libbey London, Paris

Lambert C, Prange R, 2003, *Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of hepatitis B virus large envelope protein: Implication for translocational regulation*, Proc Natl Acad Sci USA, 100: 5199-5204

Lim CK, Tan JT, Khoo JB, Ravichandran A, Low HM, Chan YC, Ton SH, 2006, *Correlations of HBV Genotypes, Mutations Affecting HBeAg Expression and HBeAg/ anti-HBe Status in HBV Carriers*, 2006, Int J Med Sci 3(1): 14-20

Liu N, Ji L et al., 2004, *Cis-Acting sequences that contribute to the synthesis of relaxed-circular DNA of human hepatitis B virus*, J Virol 78: 642-9

Luber B, Arnold N et al., 1996, *Hepatoma-derived integrated HBV DNA causes multi-stage transformation in vitro*, Oncogene 12: 1597-608

Lürmann A, 1885, *Eine Icterusepidemie*, Berliner Klein Wochenschr, 22: 20-23

Miller RH, Robinson WS, 1986, *Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses*, Proc Natl Acad Sci USA, 83 (8): 2531-5

Milich D, Liang TJ, 2003, *Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection*, Hepatology, 38: 1075-86

Neurath AR, Kent SB et al., 1986, *Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus*, Cell, 46: 429-36

Ocama P, Opio CK, Lee WM, 2005, *Hepatitis B virus infection: current status*, Am J Med., 118(12): 1413

Oess S, Hildt E, 2000, *Novel cell permeable motif derived from the PräS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens*, Gene Ther, 7: 750-758

Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshiba M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M, 1994, *Hepatitis B Virus with Mutations in the Core Promoter for an e Antigen-Negative Phenotype in Carriers with Antibody to e Antigen*, Journal of Virology 8102-8110

Panté N, Kann M, 2002, *Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm*, Mol Biol Cell 13: 425-34

Pontisso P, Ruvoletto MG et al., 1989, *Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles*, Virology, 173: 522-30

Prince AM, 1968, *An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis*, Proc. Nat. Acad. Sci. US 60: 814-21

Pumpens P, Grens E, 2001, *HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes*, Intervirology, 44: 98-114

Repp R, Keller C et al., 1992, *Detection of a hepatitis B Virus variant with a truncated X gene and enhancer II*, Arch Virol 125: 299-304

Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR, 1996, *Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the Präcore promoter and Präcore open reading frame*, Virology, 233: 374-381

Schaefer S, 2007, *Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes,* World J Gastroenterology; 13(1): 14-21

Schmitt S, Glebe D et al., 1999, *Analysis of the PräS2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus*, J Biol Chem, 274: 11945-11957

Schmitt S, Glebe D et al., 2004, *Structure of preS2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus*, J Gen Virol, 85: 2045-2053

Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S, 2000, *Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts*, Oncogene, 19: 1173-80

Seglen PO, 1976, *Präparation of isolated rat liver cells*, Methods Cell Biol., 13: 29-83

Shouval D, 2003, *Hepatitis B vaccines*, Journal of Hepatology, 39: 70-76

Simmonds P, Midgley S, 2005, *Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes*, J Virology, 79(24): 15467-76

Spandau DF, Lee CH, 1988, *Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein*, J Virol, 62: 427-34

Stockl L, Berting A et al., 2002, *Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression*, Oncogene 22: 2604-10

Su F, Schneider RJ, 1997, *Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha*, Proc Natl Acad Sci USA, 94: 8744-9

Tanaka Y, Mizokami M, 2006, *Clinical manifestations of hepatitis B virus genotype*, Rinsho Byori 54(4): 400-7

Tang H, Mc Lachlan A, 2001, *Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism*, Proc Natl Acad Sci USA 98: 1841-6

Terradillos O, Pollicino T et al., 1998, *p53-independant apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro*, Oncogene 17: 2115-23

Toellner R, 2000, *Illustrierte Geschichte der Medizin*, Bechtermünz-Verlag, 301-309 u.1506

Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J, 1986, *Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells*, Cell 47: 451-60

Weber B, 2004, *The diagnostic and clinical impact of the genetic variability of the S (surface) gene of hepatitis B virus*, J Lab Med 28(1): 56-69

Zhou S, Standring D, 1992, *Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer Präcursors*, Proc Natl Acad Sci USA, 89: 10046-10050

Zahm P, Hofschneider PH, Koshy R, 1988, *The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepatocarcinogenesis*, Oncogene, 3: 169-77

Zhang Z, Protzer U et al., 2004, *Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBx-dependent manner*, J Virol, 78: 4566-72

Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F und Gerlich WH, 1997, *Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients*, J Virol 71: 5399-407

8. Abkürzungen

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ac	Acetyl-Rest
Ak	Antikörper
al.	altera
anti-	Antikörper gegen
AS	Aminosäuren
BE	Biologische Einheiten
Bidest	bidestillata
bp	base pairs
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cccDNA	covalently closed circular DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	Tag
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	direct repeat
ds	double stranded
DTT	Dithiothreitol
ε	Enkapsidationssignal
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Exp=Exp.	x Exp y= x* 10^y
Fa.	Firma
FKS	Fötales Kälberserum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
g	Erdbeschleunigung

gr	Gramm
GE	Genomequivalents
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HB	Hepatitis B
HBcAg	Hepatitis B Virus Core Antigen
HBeAg	Hepatitis B Virus e Antigen
HBsAg	Hepatitis B Virus Surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatocelluläres Carcinom
HGM	Hepatocyte Growth Medium
IC50	Inhibitionskapazität 50= die Kapazität, bei der 50% des Virus gehemmt werden
ID	Identifizierungs-Nummer
IU	Internationale Units
JLU Gießen	Justus-Liebig-Universität Gießen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LHBs	Large Hepatitis B Virus Surface Protein
MHBs	Middle Hepatitis B Virus Surface Protein
Min.	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
myr	myristinyliert
N-glyc$_f$	fakultatives N-gebundenes Glykan
N-glyc$_0$	obligatorisches N-gebundenes Glykan
NPC	nuclear pore complex
o.	oben
OD	Optische Dichte
OPD	O-Phenylendiamine
ORF	Open Reading Frame(s)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PRE	posttranslationales regulatorisches Element
Pri	Primerdomäne

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase/Reverse Transkription
s.	siehe
SB	Sample Buffer
SDS-PAGE	Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHBs	Small Hepatitis B Virus Surface Protein
ss	single stranded
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNE	Tris-Natrium-EDTA
TupMed./1%DMSO	Tupaia Medium mit 1% DMSO
u.	unten
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung
v. Chr.	vor Christus
V.	Vena
Well	Probenvertiefung der ELISA-Platte
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

Alle hier nicht aufgeführten Einheiten sind SI-Einheiten.

9. Danksagung

Besonderes danke ich:

Meinen Eltern und meinem Bruder
meinen Großeltern und meiner Patentante
meinem Partner und meinen Freunden.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Wolfram H. Gerlich für die Themenstellung und die hervorragende Betreuung.

Herrn Dr. Dieter Glebe für die fachliche Betreuung der Dissertation.

Herrn Dr. Dr. Klaus P. Valerius für die Züchtung der Tupaias.

Frau Sigrun Broehl für ihre Tätigkeit als technische Assistentin.

Den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die gute Zusammenarbeit.

Der Georg-August-Universität Göttingen für die Bereitstellung des Serums ID 155.

Den Professoren, Privatdozenten und Doktoren der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Ludwig-Maximilians-Universität München für die hochqualifizierte theoretische und praktische Ausbildung im Fach Humanmedizin.

10. Eidesstattliche 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.“

_____
Isabel Voth

11. Lebenslauf

Stammdaten

Geburtsort	Langen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

Gymnasium	Humboldt-Gymnasium Bad Homburg
Abschluß	Abitur, Latinum

Hochschulstudium

Studium der Humanmedizin	an der Justus-Liebig-Universität Gießen und an der Ludwig-Maximilians- Universität München

Physikum
3 Staatsexamina

Approbation und Tätigkeit als Ärztin

Doktorarbeit

Institut für Medizinische Virologie	an der Justus-Liebig-Universität Gießen