

**Die Transkriptionsregulation des Hepatitis-B-Virus in vitro, in vivo und unter dem  
Einfluss fremdviraler Proteine**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus Liebig Universität Gießen

vorgelegt von: Daniel Günter Bock aus Limburg/Lahn

Gießen 2008

Aus dem Institut für Medizinische Virologie des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-  
Liebig-Universität Gießen

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

1. Gutachter: PD Dr. Glebe

2. Gutachter: Prof. Dr. Niepmann

3. Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Deinzer

4. Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Böker

Tag der Disputation: 29.09.2008

Beschränkt ist das Wissen des einzelnen, aber unbeschränkt die Vernunft, unbeschränkt die Wissenschaft, denn sie ist ein gemeinschaftlicher Akt der Menschheit, und zwar nicht nur deswegen, weil unzählig viele in dem Bau der Wissenschaft mitarbeiten, sondern auch in dem innerlichen Sinne, dass das wissenschaftliche Genie einer bestimmten Zeit die Gedankenkräfte der vorangegangenen Genies in sich vereinigt, wenn auch selbst wieder auf eine bestimmte individuelle Weise, seine Kraft also keine vereinzelte Kraft ist.

Ludwig Feuerbach, 1841

Meinen Eltern  
gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

1. Ziel der Dissertation	11
2. Einleitung	12
3. Das Hepatitis-B-Virus	14
3.1 Taxonomie	14
3.2 Morphologie	15
3.3 Lebenszyklus und Genomorganisation	16
3.4 Klinik	21
3.5 Pathologie und Immunpathologie	23
4. Das Hepatitis-C-Virus	25
4.1 Einführung	25
4.2 Taxonomie	25
4.3 Morphologie	26
4.4 Genomorganisation und Molekularbiologie	26
4.5 Funktion der einzelnen HCV-Proteine und deren Wirtszellinteraktion	27
4.5.1 Core-Protein	
4.5.2 E1- und E2-Protein	
4.5.3 NS2-Protein	
4.5.4 NS3-Protein	
4.5.5 NS4A- und NS4B-Protein	
4.5.6 NS5A- und NS5B-Protein	
4.6 Replikation	29
4.7 Klinik und Therapie	30
5. HBV-HCV Koinfektion	30
6. Materialien	32
6.1 Chemikalien	32
6.2 Puffer	33
6.3 Nähr- und Zellmedien	34
6.4 Längenstandards	34
6.5 Kits	36
6.6 Bakterienstämme	36
6.7 Animale Zellkultur	36

---

6.8 Zelllinien	37
6.9 Vektoren	39
6.10 Primer und Hybridisierungsproben	42
6.11 Geräte	43
7. Methoden	44
7.1 Zelltransformation	44
7.2 DNA-Präparation	44
7.3 Restriktionsverdau	45
7.4 Agarose-Gelelektrophorese	47
7.5 in vitro-Transkription	47
7.5.1 DNA-Restriktionsverdau	
7.5.2 DNA-Isolation aus Agarosegel	
7.5.3 in vitro-Transkripton i.e.S.	
7.5.4 DNase-Verdau	
7.5.5 RNA-Reinigung	
7.5.6 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	
7.5.7 Quantifizierung am Typhoon und Berechnung	
7.6 Kultivierung von Hepatozyten	50
7.6.1 HepG2- und HepG2.2.15-Zelllinie	
7.6.2 Huh7- und 1b-BB-Zelllinie	
7.7 Einfrieren von Zellen	51
7.8 Aufreinigung chromosomaler DNA	51
7.9 DNA-Transfektion	51
7.9.1 Metafectene®	
7.9.2 Superfect®	
7.10 RNA-Isolierung aus Zellen	53
7.11 RT-PCR	53
7.11.1 X RT-PCR	
7.11.2 PG RT-PCR	
7.12 Luciferase Assay	56
7.12.1 Renilla Luciferase Assay	
7.12.2 Dual Luciferase Assay	

---

7.13 ELISA	58
8. Ergebnisse	59
8.1 Herstellung von in vitro transkribierter HBV-RNA für Eichzwecke	59
8.2 Quantitative RT-PCR zum Nachweis von HBV-RNA	62
8.3 Quantifizierung von HBV-Oberflächenproteinen aus Zellüberständen	66
8.4 Vergleich von HBV-mRNA-Konzentration in stabil bzw. in transient transfizierten Zellen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen	67
8.5 Vergleich der HBsAg-Konzentration aus Zellüberständen zwischen stabil und transient transfizierten Zelllinien unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen	74
8.6 HBV-mRNA-Produktion in humaner Leber	76
8.7 Einfluss der HCV-Struktur und Nicht-Struktur Proteine auf die HBV-Enhancer-Aktivität	78
8.8 Einfluss der HCV-Struktur und Nicht-Struktur Proteine auf die HBV-mRNA-Produktion	82
8.9 Einfluss der HCV-Struktur und Nicht-Struktur Proteine auf die HBV-Oberflächenproteinproduktion	89
9. Diskussion	92
9.1 Einflussnahme von Transfektionsart und verschiedenen Zellkulturparametern auf die mRNA- und Oberflächenproteinproduktion des HBV	92
9.2 HBV-mRNA Produktion in infizierten Leber-Biopsien	97
9.3 HBV-Enhanceraktivität unter dem Einfluss von HCV-Proteinen	98
9.4 HBV-mRNA-Produktion unter dem Einfluss von HCV-Proteinen	102
9.5 HBsAg-Produktion unter dem Einfluss von HCV-Proteinen	102
10. Zusammenfassung	105
11. Literaturverzeichnis	106
12. Erklärung	128
13. Danksagung	129
14. Lebenslauf	131

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMV	Avian myoblastosis virus
APC	antigen presenting cell
ASC	asymptomatischer Carrier
ATP	Adenosintriphosphat
BCP	basal core promotor
Bp	Basenpaar
BVDV	Bovine Virusdiarrhoe virus
bzw.	beziehungsweise
CAH	chronisch active Hepatitis
cccDNA	covalently closed circular DNA
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
Cl	Chlorid
CURS	core upstream regulatory sequences
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DR1 und 2	Direct Repeat 1 und 2
DTT	Dithiotreithiol
E1	Enhancer 1des HBV
E2	sEnhancer 2des HBV
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMCV	Encephalomyocarditisvirus



---

ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FKS	fötales Kälberserum
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase entspricht AST
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase entspricht ALT
GRE	glucocorticoid response element
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HGV	Hepatitis G Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IE	internationale Einheit
IRES	internal ribosomal entry site
ITS	Insulin/Transferrin/Selen
kDa	Kilodalton
Koll	Kollagen
LB	Luria Broth
LHBs	Large Hepatitis B surface protein
LTR	long terminal repeats
m	milli
M	Molar
Mg	Magnesium
MHBs	Middle Hepatitis B surface protein
MHC	major histocompatibility complex
MPS	monozytäres phagozytierendes System
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na	Natrium

---

n	nano
NLS	nuclear localisation site
NRE	negative regulatory element
NS	Nicht-Struktur Protein des HCV
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame/ offener Leserahmen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pdsDNA	partially double stranded DNA
PG RT-PCR	supergenomische-mRNA RT-PCR
POD	Meerrettich-Peroxidase
PRE	posttranskriptionelles Regulationselement
RdRP	RNA dependent RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
rt-RT-PCR	real time Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	sodium dodecyl sulfat
SHBs	Small Hepatitis B surface Protein
ss	single strand
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBP	Tata box binding protein
TLM	Translokationsmotif
U	Enzymeinheit
UTR	untranslated region
X RT-PCR	Gesamt-mRNA RT-PCR
μ	mikro
z.B.	zum Beispiel

## 1. Ziel der Dissertation

Zu Beginn der Arbeit bestand am Institut für Medizinische Virologie ein großes Interesse, die Expression des Hepatitis-B-Virus (HBV) auf mRNA-Ebene möglichst empfindlich und zugleich quantitativ darzustellen. Früher verwendete Methoden zum Nachweis der HBV mRNAs wie Northern Blot oder Primer Extension sind umständlich, noch zu unempfindlich und schwierig zu standardisieren. Eine bis dato verwendete Methode der comparativen PCR für HBV-mRNA war empfindlich, konnte aber nur vergleichende, jedoch keine absoluten Mengenangaben machen (Stoll-Becker et al., 1997). Mit der Einführung der real time PCR (rtPCR) mittels des LightCycler-Systems am Institut (Jursch et al., 2002, Chulanov et al., 2003, Schaefer et al., 2003) ergab sich die Möglichkeit, diese Technik zur Messung der HBV mRNA-Mengen in infizierten (Glebe et al., 2003) und transfizierten Leberzellkulturen (Glebe et al., 2001, Schüttler et al., 2002) sowie in HBV-infizierten Leberbiopsien anzuwenden.

Hierzu sollten HBV RNA-Referenzpräparate mittels in vitro-Transkription erzeugt werden, die Primer und Probes für die RT-PCR ausgewählt und die Reaktionsbedingungen optimiert werden. Es sollten Methoden zur Bestimmung der gesamten HBV mRNA aus der X-Region sowie der prägenomischen (pg) mRNA etabliert und validiert werden. Die Menge der exprimierten HBV mRNA sollte mit der Menge des von den Zellen sezernierten HBsAg verglichen werden.

Von Interesse war weiterhin die Analyse der Enhancer 1- und 2-Elemente in unterschiedlichen Zelllinien mittels HBV-Plasmid-Konstrukten, die von den Doktorandinnen des Instituts N.Fiedler, S.Fischer und K.Schmidt hergestellt wurden. Diese Konstrukte sind später in zwei Publikationen (Fischer et al., 2007 und Fiedler et al., 2007) beschrieben worden. Hier war es auch das Ziel, die Messung von HBV RNA-Mengen in den transfizierten Zellen in Bezugnahme auf die Expression der Luciferase zu normieren. Mit Hilfe der erarbeiteten Techniken sollte dann der Effekt von ko-transfizierten Hepatitis-C-Virus-Genen (HCV) auf die HBV-Expression untersucht werden. Hier konnte auf Vorarbeiten von C.G.Schüttler et al. (2002) zurückgegriffen werden. Schließlich sollte die Technik zur quantitativen Messung der beiden HBV mRNAs auch auf Leberbiopsien angewendet werden und mit den sonstigen HBV-Parametern der Patienten verglichen werden. Die Ergebnisse sollten das Verständnis der Transkriptionsregulation von HBV vertiefen.

## 2. Einleitung

Im Mittelalter fand eine Pflanze namens „*Hepatica nobilis*“ medizinische Anwendung. Wegen der leberartigen Form der Laubblätter, wurde das Leberblümchen, das auch im 1600 gegründeten Botanischen Garten in Gießen zu finden ist, in der Signaturenlehre zur Leberheilpflanze erklärt (Hieronymus Bock, Paracelsus). Der Aberglaube behauptet, dass man ein Jahr nicht erkrankt, wenn man die ersten drei Blüten dieser Pflanze isst.

Nicht nur im Mittelalter, sondern schon in den frühen Hochkulturen waren Lebererkrankungen aufgrund ihrer augenfälligen Symptomatik bekannt. Hierbei spielt wohl das fäkal-oral übertragbare Hepatitis-A-Virus, möglicherweise auch das Hepatitis-E-Virus die größte Rolle. Das Hepatitis-A-Virus ist in den entwickelten Ländern meist nur noch als typische Tourismuserkrankung von Bedeutung. Welchen Anteil an den viralen Lebererkrankungen des Altertums das HBV und das HCV hatten, lässt sich wohl kaum noch nachvollziehen. Die beiden letztgenannten Viren, vor allem aber das HCV, werden parenteral übertragen, so dass insbesondere seit der Einführung von Blutprodukten und invasiven Eingriffen deren Inzidenz bzw. Prävalenz vorübergehend stark zugenommen hat.

Serologisch nachweisbar haben bzw. hatten derzeit rund zwei Milliarden Menschen Kontakt mit dem HBV, was ungefähr einem Drittel der Weltbevölkerung entspricht. Davon wiederum sind mit rund 400 Millionen Menschen chronisch infiziert (Fattovich et al., 2003). Jährlich sterben rund eine Millionen Menschen an den Folgen einer chronischen HBV-Infektion (Alter et al. 2003). Die Prävalenz der chronischen HBV-Infektion ist regional unterschiedlich. In den westlichen Industrienationen liegt sie bei weniger als zwei Prozent, in Teilen von Afrika, China und Südostasien über 8% (Abb. 1).

Die Prävalenz des HCV ist geringer und liegt bei etwa 3% der Weltbevölkerung. Schätzungsweise 170 Millionen Menschen sind chronisch mit dem HCV infiziert (The Global Burden of Hepatitis C Working Group, 2004 und CDC Yellow Book, 2008, Abb. 2).

Aufgrund der teilweise ähnlichen Übertragungswege der beiden Viren (parenteral, sexuell und perinatal) gibt es in den westlichen Industrienationen bestimmte Personengruppen, bei denen mit einem erhöhten Übertragungsrisiko zu rechnen ist. Hierzu zählen unter anderem:

- i.v. Drogenabhängige
- Dialysepatienten
- Angehörige medizinischer Berufe

-promiskuitive Personen

-Homosexuelle

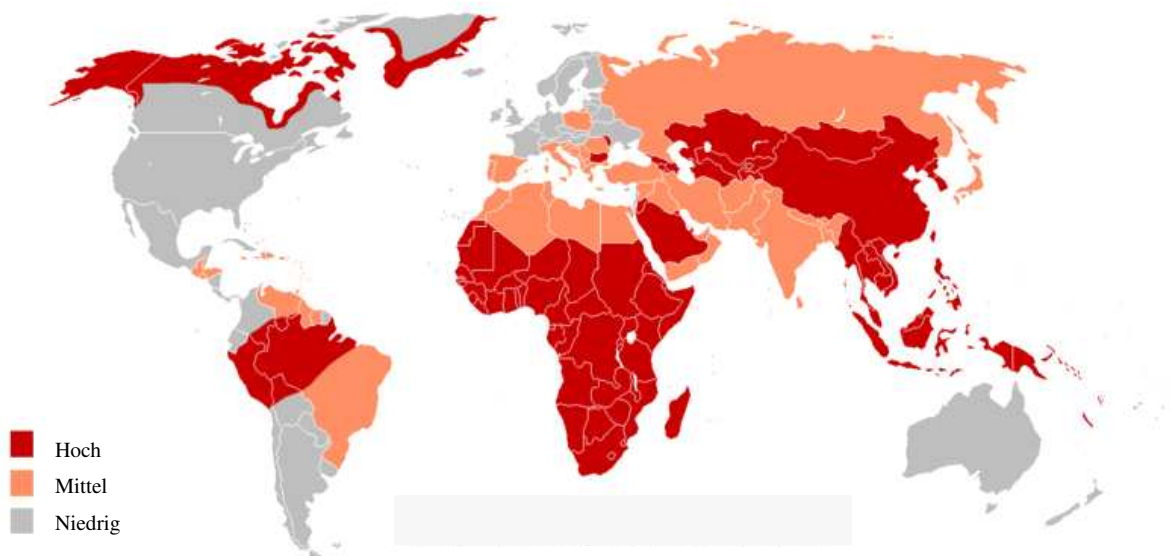


Abb. 1 Weltweite Hepatitis B Prävalenz (CDC, 2005), Hoch: Prävalenz des Hepatitis B Surface-Antigens (HBs) > 8%, Mittel: 2-7%, Niedrig: <2%

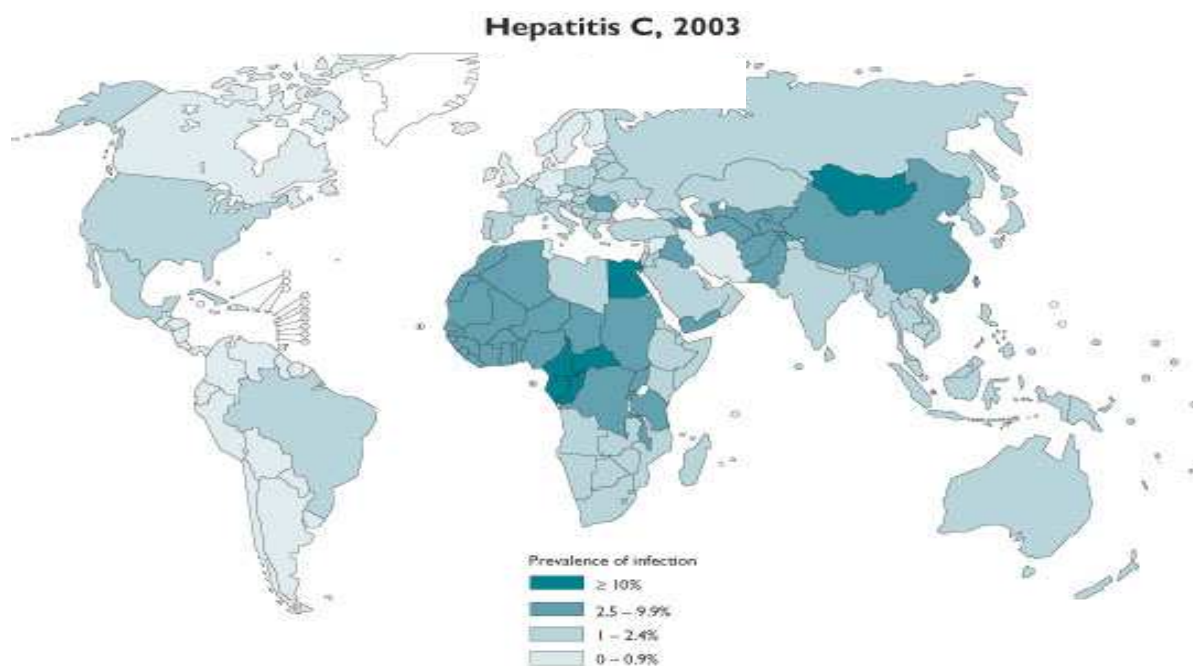


Abb. 2 Weltweite Prävalenz der Hepatitis C, WHO 2003

Durch serologische Tests (z.B. ELISA) sowie durch Einführung der PCR auf HBV und HCV konnte das Risiko einer iatrogenen Infektion deutlich gemindert werden. Das Restrisiko einer Infektion durch Bluttransfusionen betrug Anfang des Jahrtausends bei HBV 1:200.000 und bei HCV weit unter 1:1.000.000 (Offergeld et al., 2005). Das Risiko einer manifesten Infektion nach Nadelstichverletzungen bei virämischen Indexpatienten liegt bei 30% für HBV und 5-10% für HCV. Die Infektionsrate beim HIV beträgt lediglich 0,3% bei HIV-positivem Indexpatienten (Gerberding et al., 1994).

Neben der alleinigen Infektion mit dem HBV bzw. mit dem HCV finden sich auch Ko-infektionen mit beiden Viren. Dies lässt sich zum einen durch die ähnlichen Übertragungswege bzw. Risikogruppen, zum anderen durch die Möglichkeit der Chronifizierung beider Viren erklären.

### **3. Hepatitis B Virus**

Das epidemische Auftreten von Gelbsucht war, wie oben schon erwähnt seit längerem bekannt. Bis in das 20. Jahrhundert jedoch blieb die Suche nach dem vermuteten Erreger erfolglos. Erst 1963 fand Baruch S. Blumberg bei einer populationsgenetischen Untersuchung von Aborigines das sogenannte „Australia-Antigen“. Wenige Jahre später konnte gezeigt werden, dass das Australia-Antigen mit der Typ B Hepatitis assoziiert war (Prince et al., 1968). Elektronenmikroskopisch konnte dieses Antigen in 45nm großen Partikeln nachgewiesen werden (Dane et al., 1970). Später wurde dann das Australia-Antigen als HBsAg und die Dane-Partikel als HBV identifiziert. Die erste Klonierung des HBV-Genoms gelang Murray et al. 1978.

#### **3.1 Taxonomie**

Das HBV zählt zur Familie der Hepadnaviridae. Der Name leitet sich von deren DNA-Genom und vom lateinischen „hepar“ für Leber ab. Innerhalb dieser Familie finden sich zwei Genera: Orthohepadnavirus bei den Säugetieren sowie Avihepadnavirus, das verschiedene Vogel-spezies befällt. Innerhalb des Genus der Orthohepadnavirus bilden die Viren der Primates und der Rodentia je einen eigenen Zweig. Zu den Nager-Hepadnaviren zählen vor allem das Ground Squirrel Hepatitis Virus und das Woodchuck Hepatitis Virus. Letzteres zählt zusammen mit dem Duck Hepatitis Virus aus dem Genus Avihepadnavirus zu den wichtigsten

Modellsystemen für das HBV. Das HBV wird eingeteilt in insgesamt acht Genotypen A-H sowie mehrere Virusstämme von Menschenaffen. Das Virus des Wollaffen bildet eine eigene Art. Innerhalb der oben genannten Genotypen differiert die Genomsequenz um mindestens 8% bis maximal 15% (Abb. 3). Die Familie der Hepadnaviridae zeigt eine gewisse Ähnlichkeit zur Familie der Retroviridae. Beide Virusfamilien replizieren ihr Genom mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, das heißt durch reverse Transkription. Man bezeichnet daher die Hepadnaviridae auch als Pararetroviren im Gegensatz zu den Orthoretroviridae mit dem klassischen Vertreter, dem Rous-Sarkom-Virus.

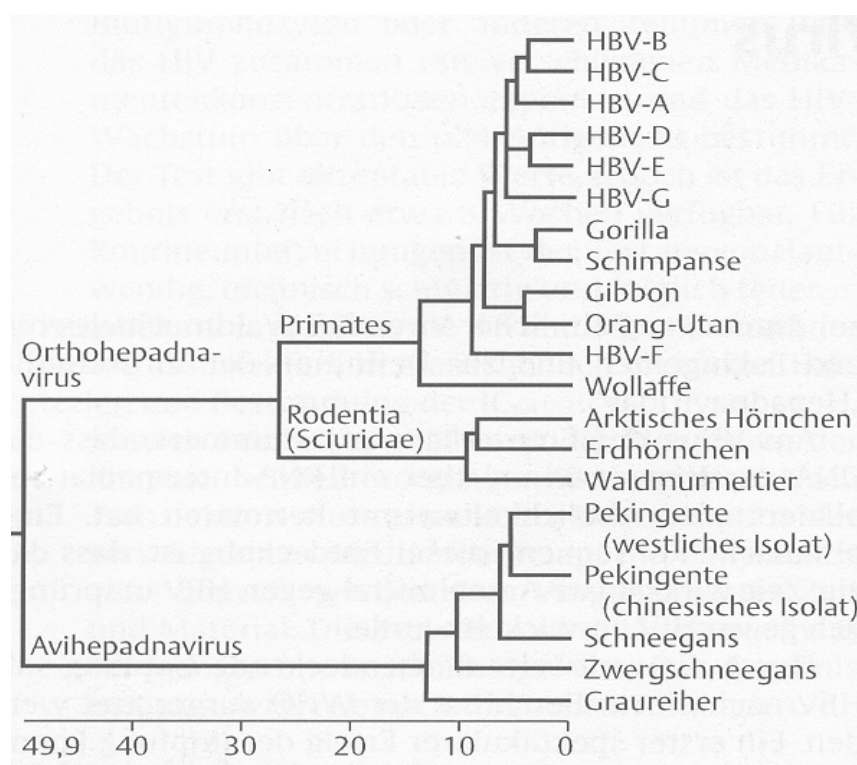


Abb.3 Phylogenetischer Stammbaum der HBV-Genotypen A-G des Menschen und der bekannten Hepadnaviren bei Tieren (Gerlich und Schaefer, 2002).

### 3.2 Morphologie

Das HBV ist ein lipidumhülltes Virus mit einem Durchmesser von 45 nm (Abb. 4). Innerhalb der Lipidhülle findet sich das 34 nm große in zwei verschiedenen Formen vorkommende Kapsid in ikosaedrischer Anordnung bestehend aus 180 bzw. 240 identischen Core-Dimeren (Zhou et al., 1992, Koschel et al., 1999). Innerhalb des Kapsids befindet sich das circa 3200 Basen lange Genom und die daran kovalent gebundene DNA-Polymerase.

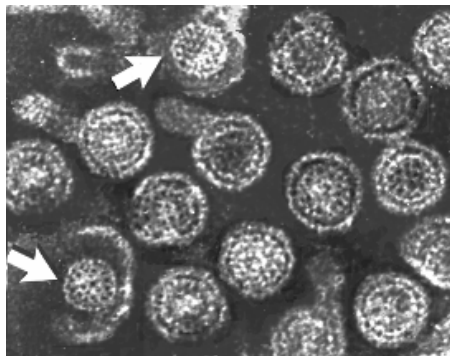


Abb.4 Struktur des HBV, elektronenmikroskopische Aufnahme (Stannard et al., 1995).

Eingelagert in die Lipidhülle sind die Oberflächenproteine des HBV, die in drei Größen vorliegen: L-(large), M-(middle) und S-(small) HBsAg. Die einzelnen Proteine sind unterschiedlich große Translationsprodukte des offenen Leserahmens für HBsAg. So enthält das SHBs nur die S-Domäne, das MHBs die S- und die PräS2-Domäne und das LHBs-Protein enthält zusätzlich noch die PräS1-Domäne. Letztere weist die hepatozytenbindende Region von Aminosäure 9-18 auf (Glebe und Urban, 2007). Die spezifischen HBV-Rezeptoren auf der Hepatozytenoberfläche konnten bisher noch nicht identifiziert werden.

### 3.3 Lebenszyklus und Genomorganisation

Nachdem das HBV rezeptorvermittelt an die Hepatozytenoberfläche im Disse-Raum gebunden hat, wird es per Endozytose in die Zellen aufgenommen. Im Endosom soll es zur Demaskierung von Translokationsmotiven (TLM) durch Spaltung der HBV-Oberflächenproteine mittels endosomaler Proteasen kommen. Diese TLMs sollen den Durchtritt des Kapsids durch die endosomale Membran in das Cytosol bewirken (Stoeckl et al., 2006). Möglicherweise bewirkt aber ein Fusionspeptid im LHBs diesen Prozess (Chojnacki et al 2005 und Berting et al 2000). Das freigesetzte Kapsid wird nun entlang des Mikrotubulitransportsystems zu den Kernporen transportiert (Rabe et al., 2006). Dort bindet es über das phosphorylierte Core-Protein an den Kernporenkomplex und entlässt die partiell doppelsträngige (pds) DNA in den Zellkern (Kann et al. 1999). Im Nukleus kommt es zur Bildung der cccDNA (circular covalently closed DNA) aus der partiell doppelsträngigen DNA des Viruspartikels. Hierzu wird der Plus-Strang vervollständigt, die beiden Primer entfernt und die 5'Enden mit den 3'Enden im Plus-Strang und Minus-Strang ligiert. Die Ausbildung der



cccDNA wird als Marker für eine erfolgreiche Infektion angesehen (Beck und Nassal, 2007).

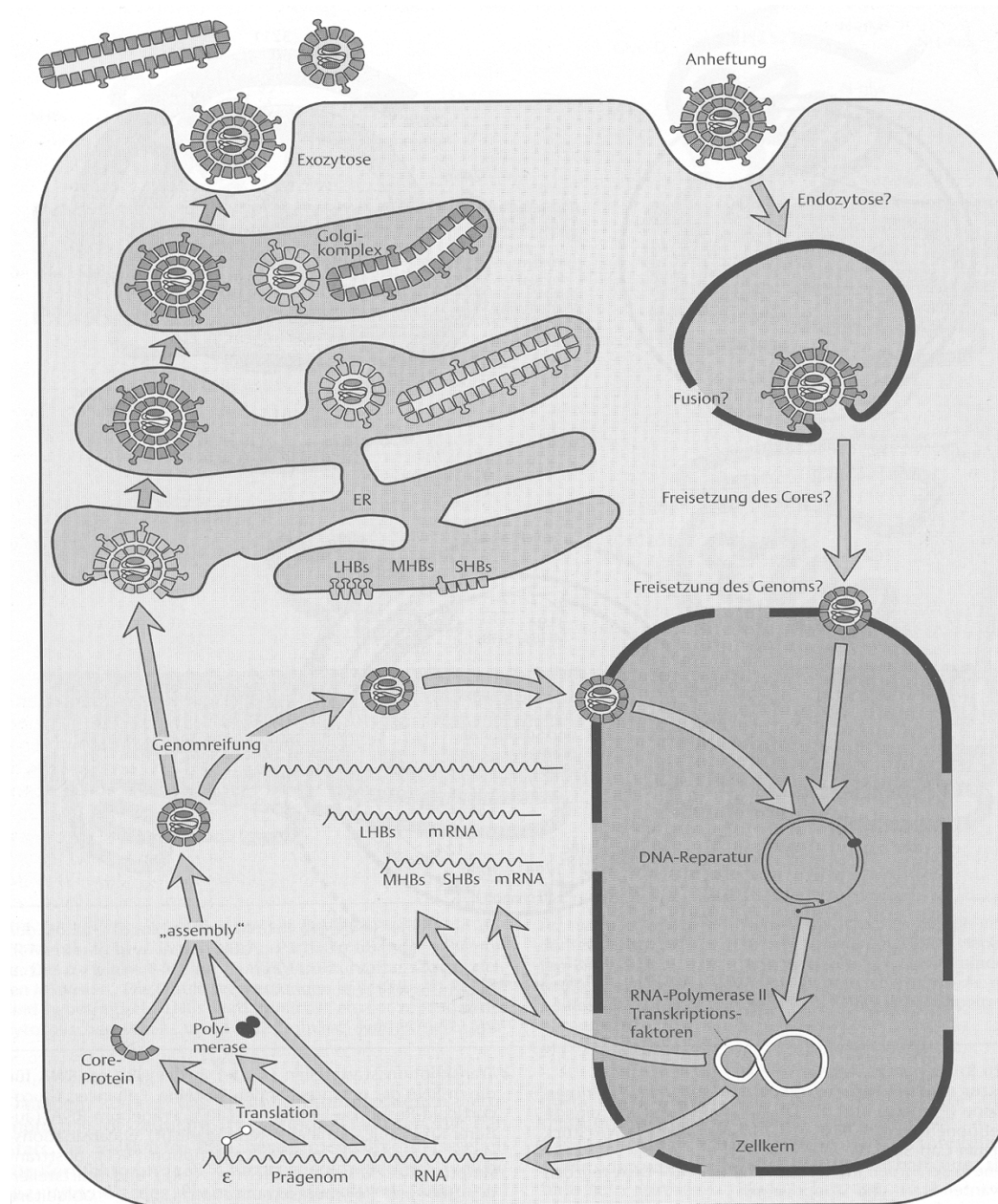


Abb. 5 Intrazellulärer Lebenszyklus des HBV (Gerlich und Schaefer, 2002).

Es ist davon auszugehen, dass bei einer hochreplikativen chronischen HBV-Infektion nahezu alle Hepatozyten infiziert sind (Gerlich und Kann, 2005). Die gebildete cccDNA dient als Matrize für die Transkription der viralen mRNAs. Zu beachten ist, dass das HBV mit 3200 Basen Länge ein sehr kleines Genom besitzt. Allerdings nutzt das Virus dieses kleine Genom durch überlappende Nukleotidsequenzen und alternative Verwendung von Startkodons sehr intensiv (Abb. 6). Insgesamt finden sich vier konservative ORFs (open reading frame), fünf

mRNA-Gruppen mit vier Promotoren sowie zusätzlich zwei Enhancer (E1 und E2). Weiterhin liegt nur ein einziges Polyadenylierungssignal vor, welches zu identischen 3'-RNA Enden führt. Verschiedene weitere Regulationselemente verstärken oder hemmen die Transkription der einzelnen mRNA-Gruppen.

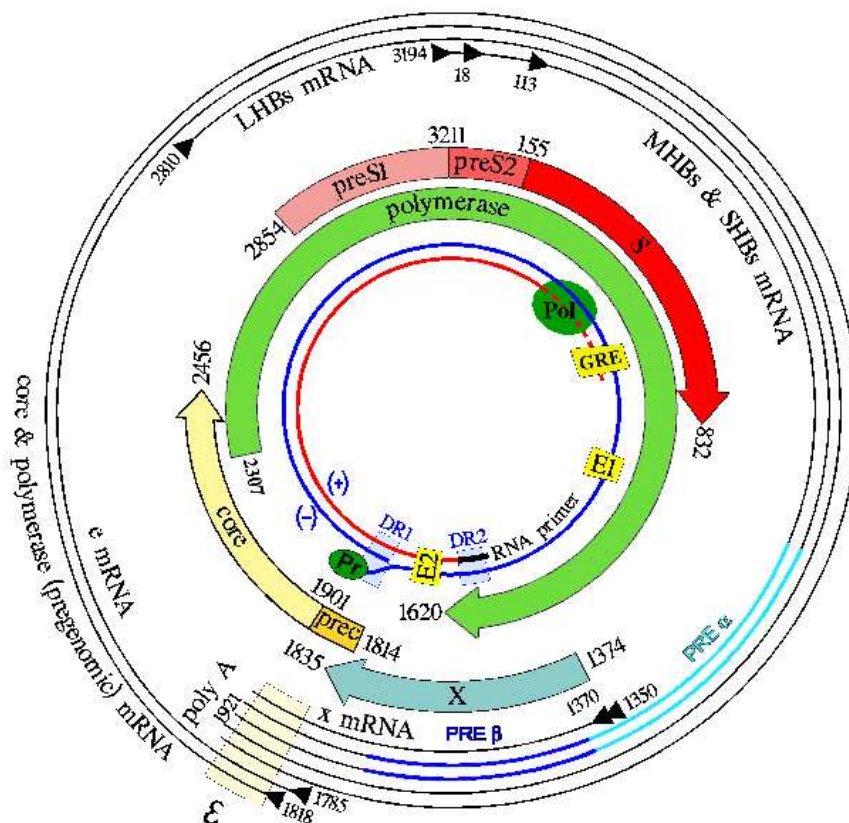


Abb. 6 Genomstruktur des HBV (Genotyp A, EMBL Access No. X51970). Von innen nach außen: pds-DNA, ORFs, mRNAs. DR= direkte Repetitionen von 11 Basen, E1 und E2= Enhancerelemente, GRE= Glucocorticoid-Response-Elemente. Enkapsidationssignal  $\epsilon$ , PRE= posttranskriptionelles Regulationselement (Kann und Gerlich, 2005).

Zu den oben genannten ORFs zählen das Core-Protein, die Viruspolymerase, die Oberflächenproteine sowie das X-Protein. Innerhalb dieser proteinkodierenden Regionen, die das komplette HBV-Genom umfassen, liegen die HBV-Promotoren. Bis auf den S1-Promotor fehlt den anderen Promotoren (basal core-Promotor, S2-Promotor und X-Promotor) die klassische TATA-Box als Startpunkt der Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes (Moolla et al., 2002). Alle Promotoren außer dem X-Promotor enthalten eine oder mehrere

Sp1-Bindungsstellen (Moolla et al., 2002). Das Sp1 bindet dabei an folgende DNA-Sequenz: GGGCGG. Dies ist deswegen bemerkenswert, da zum eukaryontischen BRE-Element (transcription factor B recognition element) mit der Sequenz GGGCGCC eine deutliche Homologie besteht. Da an das BRE-Element der Transkriptionsfaktor TFIIB bindet, kann man vermuten, dass das Sp1 die Funktionen des Tatabox Binding Proteins (TBP) übernimmt (Molecular biology of the cell, Alberts und Bray, 2002). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass der X-Promotor weder eine TATA-Box noch eine Sp1-Bindungsdomäne besitzt. Die Expressionsregulation erfolgt hier über das LSR-Element (Fukai et al., 1997).

Die Länge der gebildeten mRNAs liegt bei 3324 (prägenomische RNA), 2332 (LHBs-RNA), 1948 (MHBs- und SHBs-RNA) und 571 Basen für die X-RNA (jeweils ohne das Poly-A Ende und bezogen auf den Genotyp A, Isolat 991, EMBL Access Nummer X51970, Koechel, 1990). Hinzu kommt die PräC-RNA, die nur 33 Basen länger ist als die prägenomische RNA und wie selbige unter der Kontrolle des Core-Promotors steht. Diese PreC-RNA führt zur Bildung des HBeAg, welches ins Blutserum sezerniert wird und eine sekretorische Variante des Core-Proteins mit immunomodulatorischer Funktion darstellt.

Die Regulation der Promotoren erfolgt vorwiegend durch leberspezifische Transkriptionsfaktoren. Diese Regulation ist sehr differenziert, was sich am Beispiel des Core-Promotor/Enhancer 2-Komplexes zeigt (Abb. 7).

Der Core-Promotor beginnt bei 1636 B und endet bei 1851 B. Er setzt sich aus einem basal core promotor (BCP) sowie zwei core upstream regulatory sequences (CURS A und B) zusammen. Die CURS A wird in vier boxes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  eingeteilt, wobei  $\alpha$  und  $\beta$  einen Teil des Enhancers 2 bilden. Weiter aufwärts liegt zusätzlich ein negativ regulatorisches Element (NRE), welches wiederum in drei Regionen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  unterteilt wird. An bestimmten Sequenzmotiven der cis-Elemente binden nun spezifisch verschiedene trans-Elemente wie SP1, Coup-TF 1, HNF3, HNF4, PPAR- $\alpha$ , RXR usw.

Neben den vier Promotoren finden sich zwei Enhancer (E1 von 970 B bis 1240 B/ E2 von 1636 B bis 1744 B), die zu einer Steigerung der mRNA-Transkription führen.

Der Enhancer 1 liegt zwischen dem S- und X-ORF und hat eine Länge von 270 Basen (Abb.8). Er steigert stark die Transkription der pg/preC- und X-RNA. Der Enhancer 1 wird in drei Domänen eingeteilt, ein 5'-gelegenes modulatorisches Element, eine 3'-Domäne und eine zentrale Core-Domäne, welche den eigentlichen Enhancer darstellt. Hier binden HNF3, RFX1, EF-C und NF1. Zusätzlich findet sich ein Retinoic Acid Response Element (RARE),

welches neben HNF3, RXR $\alpha$ /PPAR und Coup-TF bindet. Der letztgenannte Transkriptionsfaktor supprimiert dabei die Enhanceraktivität.

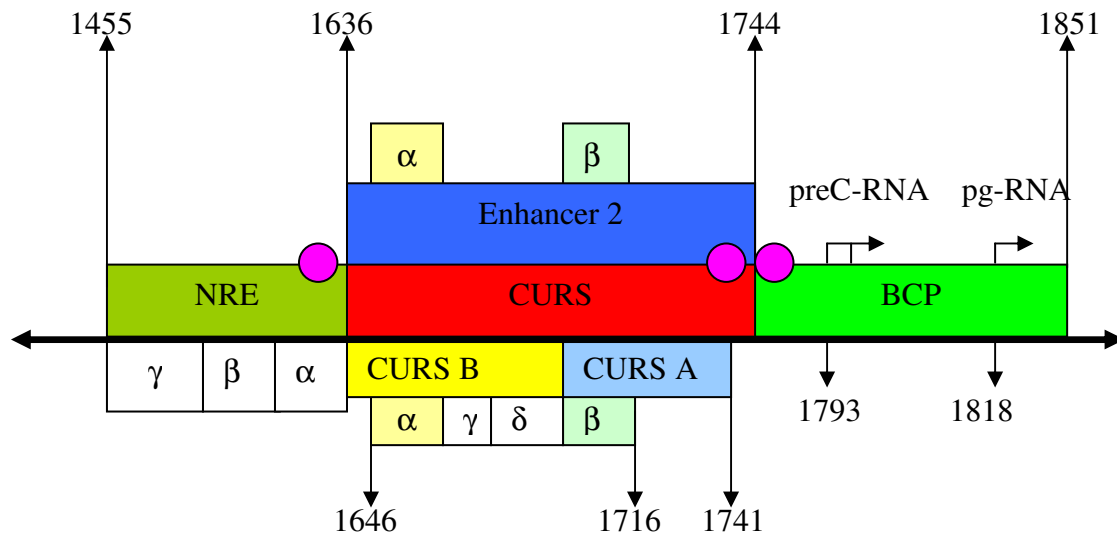


Abb. 7 HBV-Enhancer 2 und Core Promotor, subtyp adw (Yuh et al. 1992).

CURS-Box  $\alpha$ = 1646 B-1669 B, CURS-Box  $\beta$ = 1705 B-1716 B

●=SP1 (1623-1632/1733-1742/1744-1753) (Zhang et al., 1993)

NRE Lokalisation 1455 B-1636 B (Chen et al., 1995)

Der Enhancer 2 liegt aufwärts des BCP und überlappt mit der CURS-Sequenz des Core-Promoters. Seine Länge beträgt 105 Basen und er wird unterteilt in zwei Regionen, 2A und 2B mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen (FTF, HFL, E4BP4 und SP1). Nur zusammen wirken die beiden Untereinheiten steigernd, und zwar vorwiegend auf die Transkription der beiden HBs-RNAs sowie der X-RNA. Gleichzeitig steht der Enhancer unter dem negativ regulierenden Einfluss des NRE (Moolla et al., 2003).

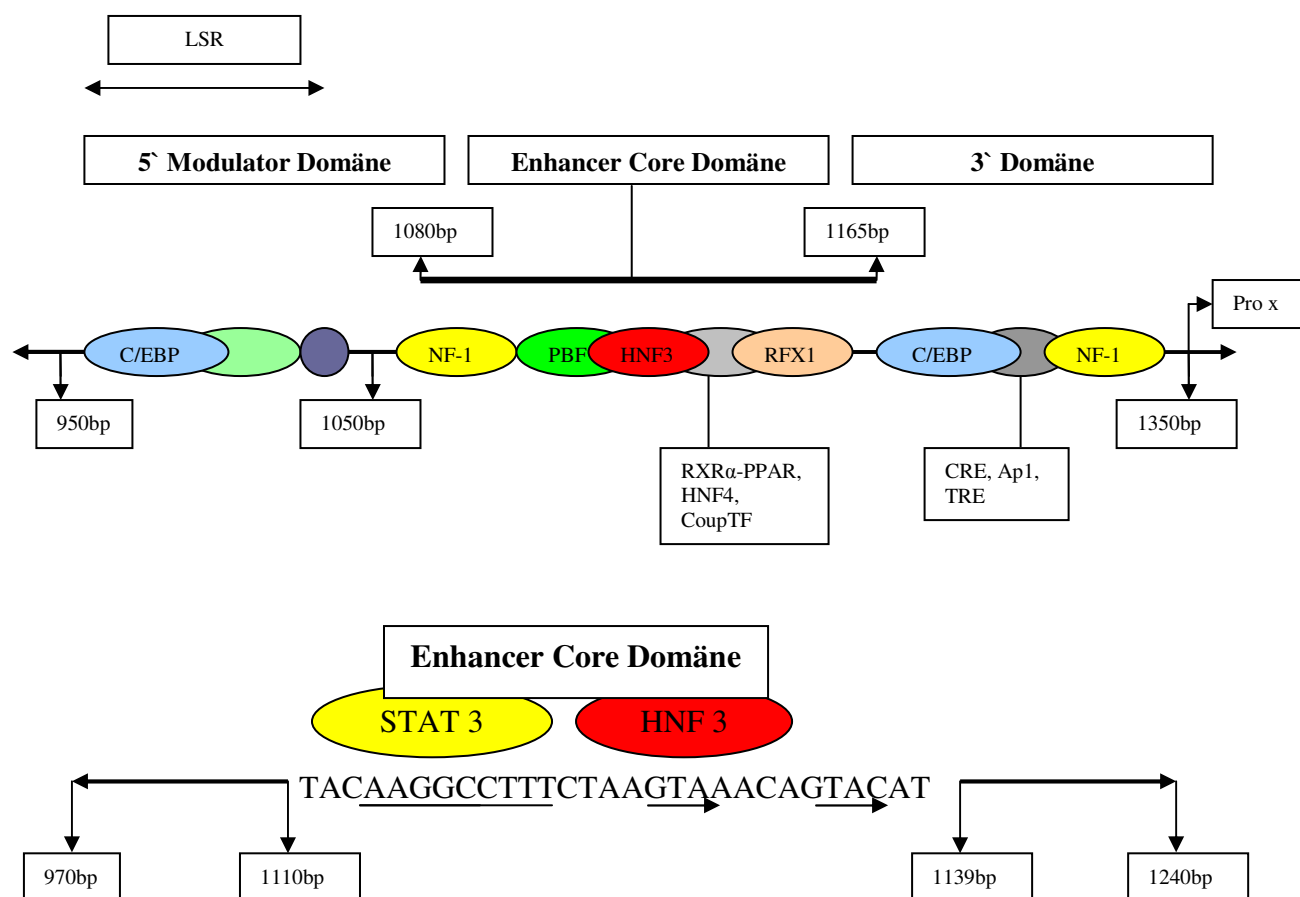


Abb. 8 HBV Enhancer 1 (970 B-1240 B), Basenangaben bezogen auf Subtyp adw2, LSR-Element von 989 B-1030 B (Fukai, 1997).

### 3.4 Klinik

Die Übertragung von HBV erfolgt parenteral, sexuell und perinatal. Eine hohe Übertragungsgefahr geht von Personen mit einer hohen Viruslast ( $>10^6$  infektiöse Einheiten/ml) aus, die meistens HBeAg-positiv sind. Bei sehr hoher Virämie tritt Virus auch in Tränenflüssigkeit, Speichel, Sperma, Vaginalsekret über, nicht aber in Stuhl und Urin. Weltweit gesehen ist der perinatale Übertragungsweg der wichtigste, weil infizierte Neugeborene zu 90% eine chronische HBV-Infektion entwickeln (WHO, 2002).

Neben dieser chronischen Verlaufsform, die durch eine Persistenz des HBsAg von mehr als sechs Monaten definiert ist, kann die HBV-Infektion bei Erwachsenen subklinisch, akut oder in seltenen Fällen fulminant verlaufen und dann ausheilen. Die chronische Hepatitis kann persistierend oder aktiv verlaufen. Übergänge von der einen in die andere Form sind möglich.

Vor allem die chronisch aktive Hepatitis führt in der Regel zur Leberfibrose, dann zur Leberzirrhose (15% der chronisch Infizierten) und letztlich häufig zum hepatozellulären Karzinom (0,5% der chronisch Infizierten). Bei Erwachsenen nimmt dieser Verlauf ca. 30-50 Jahre in Anspruch (Seeger et al., 2000). Bei infizierten Neugeborenen kann die Erkrankung gelegentlich auch schneller fortschreiten, so dass selbst unter 10jährige an HBV assoziiertem Leberkrebs erkranken.

Die serologisch beweisenden Parameter einer akuten HBV-Infektion sind das positive anti-HBc-IgM sowie das Vorhandensein von HBsAg. Weitere Zeichen einer akuten Infektion sind der HBeAg- sowie der HBV-DNA-Nachweis mittels ELISA bzw. PCR. Je nach Form der HBV-Infektion zeigen sich unterschiedliche Verlaufsformen der eben genannten Parameter (Abb. 9 a-d).

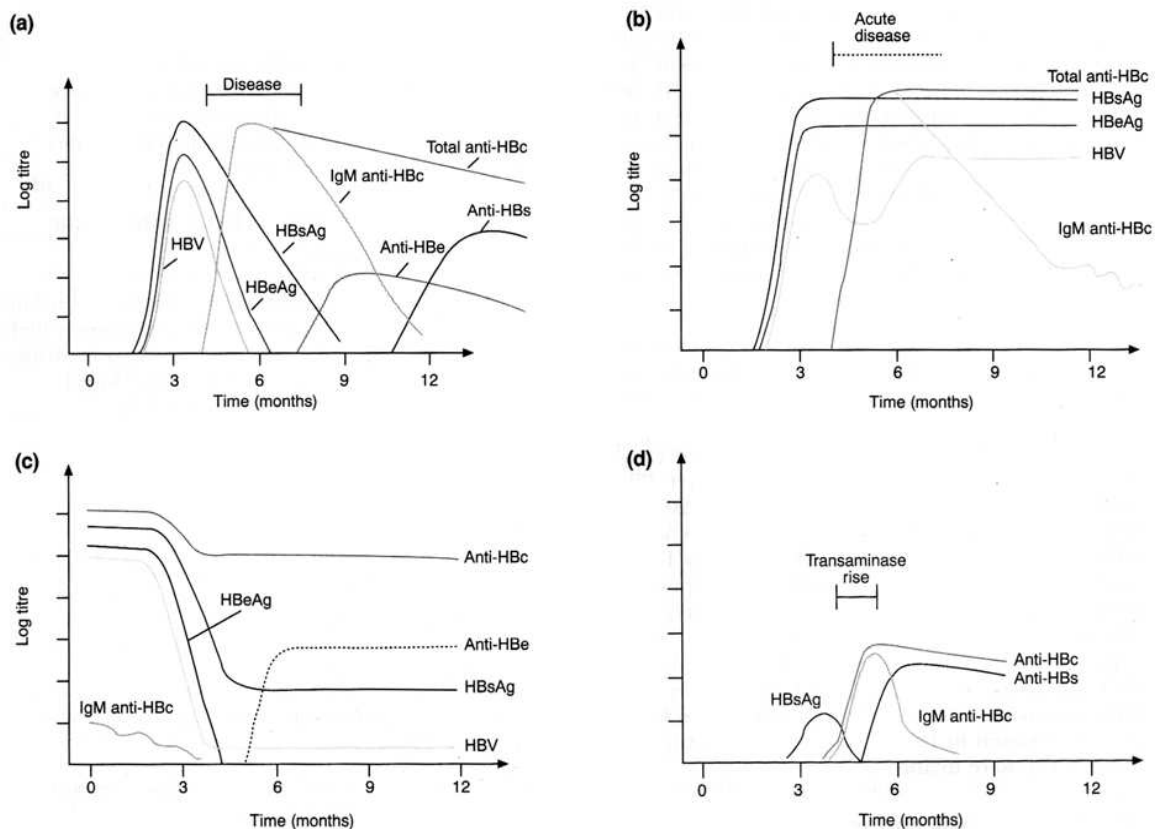


Abb.9 a-d Verlaufsformen und diagnostische Parameter der HBV-Infektion (Gerlich und Schaefer, 2002)

Als Zeichen einer Genesung zeigt sich in aller Regel eine Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe sowie das Verschwinden von HBsAg und das Auftreten von Anti-HBs. Das Vor-

liegen von HBeAg wird als Zeichen erhöhter Infektiosität gesehen. Die Vermehrung des HBV und die Produktion seiner Bestandteile HBsAg, HBeAg und HBV-DNA führt nicht per se zur Krankheit, sondern erst die virusspezifische zelluläre Immunantwort über CD8 positive T-Lymphozyten. Merkmale der HBV-induzierten Entzündung sind neben Krankheitsgefühl, Leberfunktionsausfällen und Gelbsucht das vermehrte Auftreten von Enzymen der Leberzellen im Serum (insbesondere GPT und GOT). Als langjährigster Hinweis auf eine chronisch persistierende Infektion gilt der Nachweis von cccDNA in den Hepatozyten.

Klinisch verläuft die HBV-Infektion oft unspezifisch. Nach einer Inkubationszeit von sechs Wochen bis sechs Monaten, an deren Ende es zu allgemeinem Krankheitsgefühl, Übelkeit und Erbrechen kommt, entwickelt sich in 40% der Fälle ein Ikterus mit erhöhten Bilirubinwerten (20-40 mg/l, WHO, 2002). Auch anikterische Verläufe sind möglich. Die weiteren Verlaufsformen sind in Abb. 9 a-d dargestellt. Extrahepatische Manifestationen sind bei Kindern die makulopapulöse Acrodermatitis (Gianotti-Crosti Syndrom), bei Erwachsenen, vorwiegend durch Immunkomplexe ausgelöst, die Panarteriitis nodosa, die membranöse Glomerulonephritis sowie seltener die Kryoglobulinämie und das Guillain-Barré Syndrom. Seit 1982 ist ein Impfstoff gegen das HBV verfügbar, der früher aus gereinigten nicht infektiösen subviralen HBsAg-Partikeln von HBV-Trägern hergestellt wurde. Heute gewinnt man den Impfstoff vorwiegend aus rekombinanten Hefezellen, die nur SHBsAg produzieren (enthalten unter anderem in Engerix<sup>®</sup>, Fa. GSK). Die drei Impfdosen werden intramuskulär im Abstand von 0, 1 Monat und 6 Monaten verabreicht. Eine Titerkontrolle ist nur bei Personen mit erhöhtem Risiko notwendig. Ein sicherer Schutz liegt bei einem Titer von 10-100 IE/l anti-HBs vor. Bei einem Titer von >1000 IE/l ist eine Auffrischung alle 10 Jahre ausreichend.

### **3.5 Pathologie und Immunpathologie**

Das HBV ist ein typisches nicht zytopathogenes Virus. Die Hepatitis im eigentlichen Sinn wird durch das körpereigene Immunsystem hervorgerufen. Es finden sich verschiedene Mechanismen, die der Viruselimination dienen sollen. Die in der Leber angesiedelten Kupffer'schen Sternzellen dienen als Teil des monozytären-phagozytierenden Systems (MPS) zusätzlich als antigenpräsentierende Zellen (APC). Intrazellulär synthetisierte Virusproteine werden hier im Proteasom degradiert und nach Transport in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums an MHC1 gebunden. Anschließend erfolgt der Transport über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Weiterhin werden Antigene rezeptorvermittelt endozytiert und

lysosomal zu Peptiden fragmentiert. Es erfolgt Fusionierung mit MHC2-tragenden Vesikeln aus dem Golgi-Apparat mit Bindung der HBV-Peptide an MHC2 und Transport an die Zelloberfläche. Die Kupffer'schen Sternzellen präsentieren damit sowohl HBV-Peptid/ MHC1- als auch HBV-Peptid/ MHC2-Komplexe. Über Peptid/ MHC2-Moleküle erfolgt eine Stimulation von naiven CD4-positiven Th0-Zellen, die in Th1- oder Th2-Helferzellen differenzieren. Durch die Sekretion einer ganzen Reihe von Zytokinen wird die B-Zell-Proliferation gesteigert, was zur Bildung von Antikörpern gegen HBV-Bestandteile führt (v.a. anti-HBs, anti-HBe und anti-HBc, aber auch anti-HBx und anti-HBpol). Die Antikörper gegen die Oberflächenproteine verhindern das Attachment des Virus auf den Hepatozyten. Über spezifische Bindung von CD8-positiven T-Lymphozyten an Peptid/ MHC2-Moleküle der Kupffer'schen Sternzelle kommt es zur Differenzierung in zytotoxische T-Zellen, die HBV-infizierte Zellen über den antigenpräsentierenden MHC1-Komplex erkennen können. Zum einen wird durch Bindung an den Fas-Liganden der Hepatozyten die Apoptose induziert, zum anderen kann durch Sekretion von Membranporen-bildenden Perforinen eine zytotoxische Wirkung erreicht werden.



## **4. Das Hepatitis C Virus**

### **4.1 Einführung**

Vor der eigentlichen Entdeckung des Hepatitis C Virus (HCV) im Jahre 1989 kannte man dieses Virus lediglich unter der Bezeichnung „Erreger der parenteralen NonA-NonB-Hepatitis“.

Die Identifizierung des HCV durch Choo et al. stellt auf eindrucksvolle Weise die Möglichkeiten der Molekularbiologie dar. Es wurden auf gut Glück cDNA-Fragmente des Virus erzeugt, welches zuerst aus infizierten Schimpansen gewonnen wurde, in *E. coli*-Bakterien kloniert und als Fusionsproteine exprimiert. Die entstandenen Genprodukte wurden mit Antikörpern von Patienten detektiert, die mit dem mutmaßlichen Erreger der NonA-NonB-Hepatitis infiziert waren. Mit diesem Verfahren gelang die Identifizierung eines kleinen cDNA-Fragments, welches letztlich zur Detektierung des circa 9600 Basen langen RNA-Genoms des HCV führte.

### **4.2 Taxonomie**

Das HCV zählt zur Familie der Flaviviridae. In dieser Familie finden sich drei Genera, nämlich die Pestiviren, die Flaviviren und die Hepaciviren, zu denen auch das HCV zählt. Zur Gruppe der Flaviviren gehören unter anderem das Gelbfiebervirus und das Denguevirus, um nur zwei bekannte Beispiele zu nennen. Dem HCV am ähnlichsten und damit als Modell am geeignetsten sind die Pestiviren mit dem BVDV als typischem Vertreter. Einen hohen Verwandtschaftsgrad zeigen auch die drei GB-Viren des Typs A, B und C. Nur GBV-C kommt beim Menschen vor, ist aber nicht pathogen und auch nicht hepatotrop, obwohl es fälschlich auch als Hepatitis G Virus (HGV) bezeichnet wurde (Abraham et al., 2007, Kumar et al., 2007). Nach einer nach Simmonds et al. 1993 vorgenommenen Einteilung unterscheidet man sechs HCV-Genotypen und innerhalb der Genotypen eine ganze Reihe von Subtypen bzw. Isolaten. Die Isolate eines Subgenotyps zeigen dabei eine Sequenzhomologie von 90,8-99%, die Subtypen eine Homologie von 76,9-80,1% und die Genotypen eine von 65,7-68,9%. Die am höchsten konservierte Region ist die 5'-UTR (untranslated region), die variabelste die HVR1 (hypervariable region) des E2-Proteins. In Deutschland hat der Genotyp 1b die größte Bedeutung, bei Drogenabhängigen dominiert der Subtyp 3a. Genotyp 4 findet sich vorwiegend in Afrika, Genotyp 6 in Südostasien. Ähnlich wie beim HIV bildet sich bei einer In-

fektion mit dem HCV innerhalb eines Patienten eine Gruppe von Viren mit differierenden Genomen. Man spricht von Quasispezies. Die Ausbildung der Quasispezies wird durch die Irrtumsrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die auf ca.  $1 \times 10^{-4}$  geschätzt wird, ermöglicht. Selbst in der eigentlich hochkonservierten 5'-UTR Region finden sich neben den sogenannten „master sequences“ mit hoher Konservierung seriell angeordnete Regionen mit deutlichen Sequenzabweichungen.

### 4.3 Morphologie

Bei der Familie der Flaviviridae handelt es sich um lipidumhüllte Plusstrang-RNA-Viren. Der Durchmesser des HCV beträgt circa 50 nm. Eine überzeugende elektronenmikroskopische Darstellung des Virus ist bisher, unter anderem aufgrund von Verbindungen mit körpereigenen Proteinen, noch nicht gelungen. Man geht davon aus, dass das Core-Protein mit der RNA das Nukleokapsid des Virus bildet und die E1- und E2-Proteine als Hüllproteine fungieren, jedoch gibt es für das Vorliegen eines Kapsids keine Beweise.

### 4.4 Genomorganisation und Molekularbiologie

Das Genom des HCV besteht aus einem circa 9,6 kB langen ss-(+) RNA-Strang. Dieser enthält einen ORF (open reading frame), der nach der Translation zu einem einzigen Polypeptid von ca. 3100 aa Länge führt.

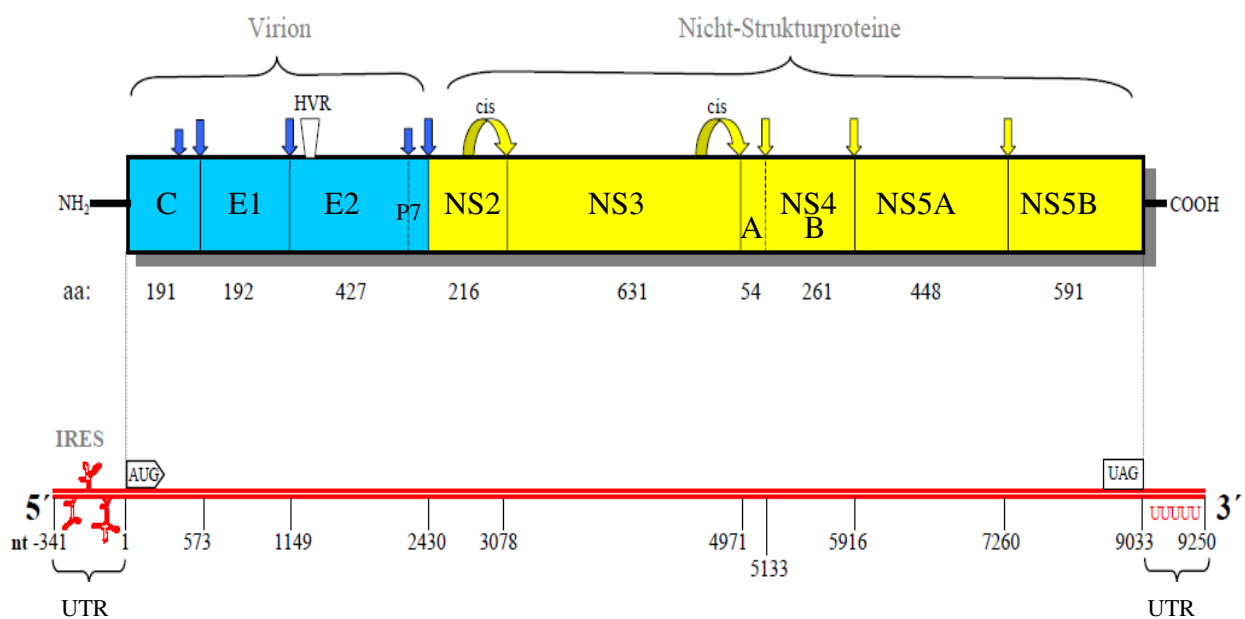


Abb. 10 Aufbau des HCV-Genoms, Grafik übernommen aus Christian Schüttler, Dissertation 2000, Fachbereich Humanmedizin, Gießen

Flankiert wird der ORF von der 5'-UTR und der 3'-UTR (untranslated region). Die 5'-UTR übernimmt dabei die Funktion einer IRES (internal ribosomal entry site), die einen cap-unabhängigen Translationsinitiationsmechanismus ermöglicht (Wang et al., 1993). Die IRES-Region liegt zwischen Base 40 und 355 und besteht aus vier Domänen. Im Bereich der Domäne 4 (Base 342) liegt das Startcodon des ORF, welches ohne zusätzliche Initiationsfaktoren an die 40S-Untereinheit der Ribosomen bindet (Bartenschlager und Lohmann, 2000). Eine IRES findet sich auch bei Picornaviridae, zu denen auch das Hepatitis A Virus zählt. Zur Translationsinitiation werden hier aber zusätzliche Initiationsfaktoren benötigt. Aber auch bei der eigentlich faktorunabhängigen HCV-IRES finden sich verschiedene Proteine, die die Translation steigern (La-Antigen, Ali und Siddiqui, 1997) bzw. senken (HCV-Core, Gowans, 2003). Nach Translation des ORF entsteht ein Polyprotein, welches durch zelluläre und virale Proteinasen in zehn verschiedene Proteine gespalten wird. Durch zelluläre Proteasen werden das RNA-bindende Core-Protein, die beiden Oberflächenproteine E1 und E2 sowie das Porenbildende p7-Protein freigesetzt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die Strukturproteine des HCV. Die verschiedenen Nicht-Struktur Proteine werden durch virale Proteasen freigesetzt. Hierbei fungiert die NS2-3-Protease als  $Zn^{2+}$ -abhängige Autoprotease. Alle weiteren Spaltungen werden durch die NS3-Protease alleine vorgenommen. Lediglich NS4A spielt als Cofaktor des NS3 eine größere Rolle.

Neben dem NS5B, welches als RdRP (RNA abhängige RNA-Polymerase) fungiert, spielt auch die 3'-UTR eine bedeutende Rolle in der Genomreplikation. Die 3'-UTR ist in drei Teile gegliedert. Sie besteht aus einer variablen Sequenz, die auf das Stopcodon des ORF folgt, einem Poly-U Trakt sowie einem 98 Basen langen, hochkonservierten Bereich am 3'-Ende, welches essentiell für die Replikation ist (Yanagi et al., 1999, Kolyhalov et al., 2000).

## **4.5 Funktion der einzelnen HCV-Proteine und deren Wirtszellinteraktion**

### **4.5.1 Core-Protein**

Man findet das Core-Protein in drei unterschiedlichen Größen: p21 (191aa lang), p19 und p16. Die ersten beiden finden sich im Zytoplasma, das p16 im Nukleus. Letzteres konnte lediglich beim Genotyp 1a detektiert werden.

Es handelt sich bei dem Core-Protein um ein lysin- und argininreiches und damit stark basisches Protein mit einer hohen Nukleinsäurebindungsaffinität. Die basischen Aminosäuren

befinden sich hierbei vor allem am N-Terminus. Das C-Ende ist demgegenüber hydrophob und enthält vermutlich zwei  $\alpha$ -Helix-Strukturen, mit der es Verbindungen zum Endoplasmatischen Retikulum eingeht (Schüttler, Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, 2000). Des Weiteren findet sich eine bZIP (basische Leucin-Zipper Struktur) innerhalb des Proteins, welches eine Heterodimerisierung mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Das Core-Protein ist damit ein multifunktionelles Protein, welches verschiedene Funktionen erfüllt. Seine Hauptaufgabe liegt vermutlich in der Bildung eines HCV-Nukleokapsids (Yasui et al., 1998). Weiterhin finden sich zahlreiche Interaktionen mit Zellsignalwegen, z.B. mit NF- $\kappa$ B (Kato et al., 2000), STAT3, p53, SRF, Lzip, Elk1, Protein 14-3-3 (Yoshida et al., 2002) und Sp110b (Watashi et al., 2003). Auch eine Interaktion mit den Proteinkinasen A und C sind beschrieben. Erstere phosphoryliert das Core-Protein u.a. an Ser 116, letztere u.a. an Ser 99 (Shih et al., 1993). Die Interaktion mit dem oben erwähnten STAT3 führt indirekt zu einer Hochregulation von Cyclin D1 und Bcl-XL. Diese Faktoren spielen eine besondere Rolle in der Zellzyklusregulation und in der Zelltransformation.

#### **4.5.2 E1 und E2-Protein**

Die glykosylierten E1- und E2-Proteine bilden ein Heterodimer, verbunden über nicht-kovalente Kräfte. Innerhalb des E2 finden sich zwei hypervariable Regionen (HVR 1 und 2), die das Ziel für neutralisierende Antikörper darstellen. Auch bei der Bindung des Virus an die Hepatozytenoberfläche spielt das E2 eine große Rolle. Es bindet spezifisch das Oberflächenprotein CD81 (Pileri et al., 1998, Cocquerel et al., 2006) sowie den scavenger receptor B1 (SR-B1) (Scarselli et al., 2002). Weiterhin bindet es an Glykosaminoglykane (Villanueva et al., 2005), den LDL-Rezeptor (Wünschmann et al., 2000) und verschiedene Lektine (Pöhlmann et al., 2003). Neuerdings wurde noch eine essentielle Interaktion mit dem Membranprotein Claudin erkannt (Evans et al., 2007).

#### **4.5.3 NS2-Protein**

Es handelt sich um ein hydrophobes Transmembranprotein mit autoproteolytischer Wirkung zur Erzeugung der NS2/3 Spaltung. Vermutlich dient es als Anker für die HCV-Proteine und ist an der Bildung der Replikationskomplexe am Endoplasmatischen Retikulum beteiligt (Bartenschlager et al., 2000).

#### 4.5.4 NS3-Protein

Das NS3-Protein besitzt klar unterschiedliche Domänen. Zum einen liegt eine  $Zn^{2+}$  abhängige Protease am N-terminalen Ende (Cofaktor ist das NS4A), zum anderen findet sich eine NTPase- und Helicase-Aktivität am C-terminalen Ende des 70kDa-Proteins. Das C-Ende ist damit essentiell für die HCV-Replikation. In Übereinstimmung hiermit findet sich eine starke Interaktion zwischen NS3 und NS5B. NS3/NS4A spaltet nicht nur den NS-Anteil des Polyproteins, sondern auch zwei Signalmoleküle, die über den Interferon regulierenden Faktor 3 (IRF3) die Produktion von Interferon induzieren (Sumpter et al., 2005). Damit wird der wichtigste Abwehrmechanismus der angeborenen Immunreaktion geschwächt.

#### 4.5.5 NS4A- und NS4B-Protein

NS4A fungiert als Cofaktor für NS3 und bindet gleichzeitig am ER und trägt somit wie das NS2-Protein zur Bildung der Replikationskomplexe bei. Eine ähnliche Funktion spricht man dem hydrophoben NS4B zu.

#### 4.5.6 NS5A- und NS5B-Protein

Das NS5A-Protein findet sich in zwei Größen, als p56 und daraus hervorgehend das hyperphosphorylierte p58. Die Funktion des NS5A ist noch größtenteils unklar. Durch  $Ca^{2+}$ -Freisetzung kann es zu oxidativem Stress führen, was mit der Aktivierung von STAT und NF- $\kappa$ B einhergeht (Gong et al., 2001). Auch eine ganze Reihe transaktivierender Eigenschaften sind beschrieben, ebenso wie Regulationsmechanismen zum nukleären Transport (Kato et al., 1997). Das NS5B ist perinukleär mit dem ER assoziiert und erfüllt die Aufgaben einer RNA-abhängigen RNA Polymerase (RdRP). Es interagiert mit NS3 und NS4A im Replikationskomplex. Das NS5A spielt hierbei offensichtlich eine Rolle in der Steuerung der Replikation respektive der Translation und Assembly. Dies legen RNA-Bindungseigenschaften des NS5A nahe (Appel et al., 2006).

### 4.6 Replikation

Die Produktionsrate neuer Viren ist beim HCV gering. Hinzu kommt, dass nur ca. 10% der Leberhepatozyten infiziert sind, woraus auf ca. 50 Partikel pro Zelle und Tag zu schließen ist (Neumann et al., 1998). Dies erklärt die experimentellen Schwierigkeiten bei der Untersuchung der HCV-Replikation. Zur Zeit geht man von folgenden Mechanismen aus: Das NS5B

dient als RdRP und synthetisiert aus dem viralen Plusstranggenom einen Minusstrang als Matrizenvorlage. Das Verhältnis von Minusstrang zu Plusstrang liegt bei ca. 1:5-1:10 (Roggendorf, 2002). Zur Elongation benötigt das NS5B das NS3 als Helicase und NTPase sowie weitere zelluläre Faktoren wie NF90/NFAR (Isken et al., 2007). Wie bei allen Plusstrang-RNA-Viren findet auch beim HCV die Replikation ausschließlich im Zytoplasma an vesikulären Membranstrukturen statt. Es finden sich hier Replikationskomplexe, die typisch für Plusstrang-Viren sind. Sie bestehen aus Nichtstrukturproteinen (in diesem Fall NS3-NS5B), RNA und zellulären Proteinen. Diese Komplexe finden sich auch in Huh7-Zellen mit subgenomischer HCV-RNA (Moradpour et al, 2003).

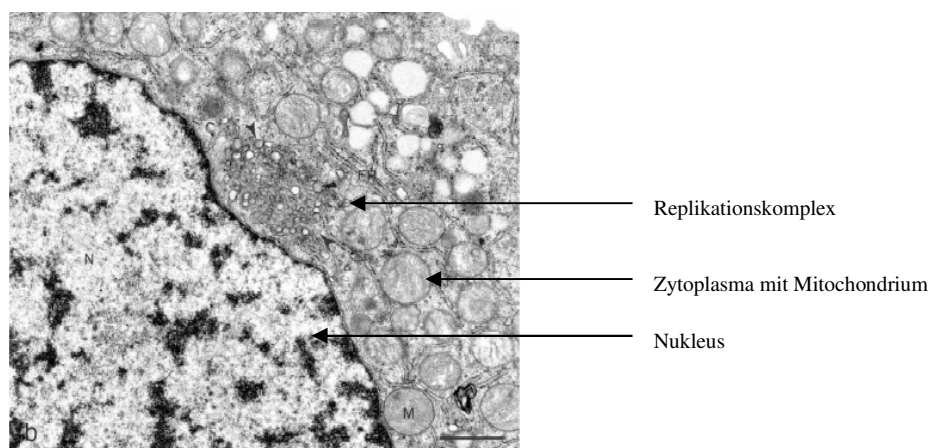


Abb. 11 Replikationskomplex des HCV, Moradpour et al., 2003

#### 4.7. Klinik und Therapie

Die Übertragung erfolgt parenteral, seltener sexuell oder perinatal. Die mittlere Inkubationszeit beträgt 7-8 Wochen. In der Mehrzahl der Fälle kommt es zu grippeähnlichen Symptomen mit häufig anikterischem Verlauf (ca. 80% der Fälle). Mit 1% sind fulminante Verläufe selten. In ca. 75-80% der Fälle kommt es zur Chronifizierung mit sich im Verlauf (ca. 10-30 Jahre) entwickelnder Leberzirrhose (20%) und HCC (hepatozelluläres Karzinom, 5-10%). Therapie der Wahl ist die Kombinationstherapie aus peg-Interferon  $\alpha$  und dem Nukleosidanalogen Ribavirin über 48 Wochen (Erfolgsrate 50-70%). V.a. die Genotypen 1 und 4 zeigen eine hohe Therapieresistenz, insbesondere im Vergleich zu Genotyp 2 und 3.

#### 5. HBV-HCV-Koinfektion

Eine Koinfektion mit HBV und HCV ist wegen der ähnlichen bzw. gleichen Übertragungswege häufig. Dabei ergeben sich folgende Möglichkeiten einer Koinfektion:

- Simultaninfektion mit HBV und HCV
- Superinfektion mit HBV bei chronischer HCV
- Superinfektion mit HCV bei chronischer HBV

Die Häufigkeit der Koinfektion ist von Personengruppe zu Personengruppe verschieden. So schätzt Fong et al. (1991), dass etwa 10% der HBV-Infizierten auch HCV-positiv sind; bei Drogenabhängigen fand man eine Koinfektionsrate von 42,5%.

Es ist zu beachten, dass noch weitere Viren an einer Koinfektion beteiligt sein können. So z.B. das HIV oder das HDV sowie andere. Dies ist bei klinischen Untersuchungen zu berücksichtigen (Srinivas et al., 1996). Die HBV-HCV-Koinfektion ist ein häufiger Inhalt von virologischen Untersuchungen. Shih et al. wiesen 1993, 1995 und 2003 eine Hemmwirkung des HCV-Core Proteins auf das HBV-Gesamtgenom, die HBsAg Syntheserate, auf das HBx-Protein und auf die HBV-Polymerase nach. Schüttler et al. beschrieben 2002 ebenfalls einen spezifischen inhibitorischen Effekt des HCV-Core Proteins auf die Enhancer 1 und 2 des HBV. Allerdings finden sich auch klinische Studien, die nachweisen, dass eine HBV-Superinfektion zu einer HCV-Suppression führen kann (Sagnelli et al., 2001, Wietzke et al., 1999), ebenso wie Literaturangaben, die das Gegenteil propagieren (Romano et al., 1995, Liaw et al., 2002). Neben der inhibitorischen Wirkung des HCV-Core Proteins, die von Shih sogar als Therapeutikum vorgeschlagen wurde (2003), wurden auch andere Proteine des HCV-Genoms wie das NS2 auf eine Hemmwirkung untersucht (Dumoulin et al., 2003). Selbst die Auswirkung der viralen Proteine auf die zelluläre Genexpression wurde näher beleuchtet (Aizaki et al., 2002).

Ganz anders aber lautet z.B. das Ergebnis einer klinischen Studie von Chulanov et al. von 2003. Hier konnte mit quantitativen Meßmethoden kein Effekt der HCV-Koinfektion auf die HBV-Dynamik festgestellt werden.

Als einzig sicherer Punkt kann wohl festgehalten werden, dass eine HBV-HCV Koinfektion häufiger zu einer fulminanten Hepatitis führt, als jeweils eine Einzelinfektion (Chu et al., 1994) und dass bei chronischen Koinfektionen häufig ein Virus dominant ist. Meist handelt es sich dabei um das HCV. Des weiteren leidet ein größerer Teil der Patienten mit HBV-HCV Koinfektion an einer Leberzirrhose. Infolgedessen ist auch die Rate des HCC deutlich höher als bei Monoinfektionen (Fong et al., 1991). Ein weiterer Aspekt in Bezug auf die Prognose ist die erhöhte Therapieresistenz der HBV-HCV Koinfizierten gegenüber einer Ifn  $\alpha$ -Therapie.

## 6. Materialien

### 6.1 Chemikalien

Name	Firma	Verwendungszweck
6M Ammonium-Acetat	Merck	Fällung von RNA
Ampicillin	Roth	Antibiotikum für Sektionierung
Anti-HBs-POD für Enzygnost HBs-Ag mcl II	Behring	bindet an SHBs-Ag und trägt Peroxidase für ELISA
Antikörper C20/2		bindet SHBs-Ag
beta-Mercaptoethanol	Sigma	verhindert Disulfidbrückenbildung
Casein 1%	Pierce	
Chloroform	Sigma	RNA-Aufreinigung
Collagen, Typ I, rat tail	Fa. BD Biosciences	Zellkultur
Diethylpyrocarbonat	Aldrich	modifiziert Histidinreste, inaktiviert damit v.a. RNasen
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma	hält Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus
DNase, RNase frei	Roche	DNA-Verdau
Dithreithiol, DTT	Sigma	verhindert Disulfidbrückenbildung, RNase Inaktivierung
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Sigma	bindet Calcium und inaktiviert damit versch. Enzyme
Ethanol	Riedel-DE Hain	Waschen von DNA, mit Salz: Fällung von Nucleinsäuren
Formamid deionisiert	Sigma	destabilisiert Nucleinsäure-Sekundärstrukturen
G418-Sulfat	Gibco	Antibiotikum, Gentamycin-ähnlich
Guanidiniumisothiocyanat	Roth	chaotropes Salz, denaturiert Proteine und lysiert Zellen
1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	ELISA, stoppt Peroxidase-reaktion
Hefeextrakt	Difco	Nährmedium
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck	ELISA
Isopropanol	Sigma	Nucleinsäure-Fällung
Insulin, Transferrin, Selen (ITS)	Gibco	Ergänzung Zellkulturmedium, siehe Zellzusätze



Li-Cl	Dynal	Fällen von RNA
Li-SDS	Dynal	siehe SDS, Anwendung bei RNA Aufreinigung
NaCl	Roth	
MgCl <sub>2</sub>	Roche	Mg <sup>2+</sup> ist Kofaktor zahlreicher Enzyme
Morpholinopropansulfon- säure, MOPS	Roth	Puffersubstanz für MEN Puffer, pH=6,5-7,9
Natriumacetat	Merck	mit Ethanol Fällen von Nukleinsäuren
o-Phenylendiamin Dihydrochlorid-Tabletten	Abbot	Substrat für ELISA mit Anti-HBs-POD
Phenol	Sigma	RNA-Aufreinigung
RNasin	Ambion	inaktiviert RNasen
Sodium Dodecylsulfat	Merck	denaturiert Proteine und negativiert sie
Seakem LE Agarose 2%	Cambrex	für Gelelektrophoresen
Spermidin	Sigma	bindet und fällt DNA, in vitro Transkription
T7-Polymerase	Stratagene	zur in vitro Transkription
TRIS	Roth	Puffersubstanz, pH=7,1-9,0
Trypsin	Pierce	Protease, Zellkultur (Herstellung von Trypton)
Tween20	Merck	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat, Emulgator

## 6.2 Puffer

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1xPBS; pH=7,4 (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 3,4 mM KCl 10,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1xTAE	40 mM TrisAcetat 1 mM EDTA pH=8,0
1xTNE	20 mM TrisHCl pH=7,4 140 mM NaCl 1 mM EDTA

10xMEN	200 mM MOPS 10 mM EDTA 50 mM Natriumacetat mit NaOH auf pH=6,6 einstellen, autoklavieren, der Puffer verfärbt sich hierbei gelb, lichtempfindlich
1xTE	10 mM Tris HCl pH=8,0 1,0 mM EDTA pH=8,0
10xTRX Transkriptionspuffer	400 mM Tris HCl pH=8,0 100 mM DTT 60 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM Spermidin
Beschichtungspuffer ELISA	183 mM NaCl 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=7,4
Substratpuffer für OPD (=o- Phenylendiamin Dihydro- chlorid), ELISA	100 mM Na <sub>2</sub> Citrat 200 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> frisch zugesetzt: 10 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf 100 ml
6x AgaroseLoading Puffer I	60 ml Glycerin 0,1 g Bromphenolblau ad 100 ml TE-Puffer
6x AgaroseLoading Puffer II	50 g Saccharose 1,0 g SDS 250 mg Xylenblau ad 100 ml TE-Puffer
Diethylpyrocarbonat (DEPC)- Wasser	100 ml H <sub>2</sub> O 100 µl 1% DEPC ü.N. bei 37°C inkubieren zweimal autoklavieren
RNasen Inhibitor	0,1 M NaOH 1 mM EDTA in DEPC-Wasser

<b>Puffer zur DNA Maxi-präparation aus Bakterien</b>	
Suspensionspuffer	50 mM Tris HCl pH=8,0 10 mM EDTA 100 µg/ ml RNase A
Lysispuffer	200 mM NaOH 1% SDS
Neutralisationspuffer	3,0 M Kaliumacetat pH=5,5 bindet SDS und präzipitiert es
Waschpuffer	1,0 M NaCl 50 mM MOPS pH=7,0 15% Isopropanol
Elutionspuffer	1,6 M NaCl 50 mM MOPS pH=7,0 15% Isopropanol

### 6.3 Nährmedien

<b>Nährmedium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
LB-Medium (Luria Broth)	10,0 g Trypton 5,0 g Hefeextrakt 10,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest, autoklavieren
LB-Ampicillin Medium LB-Ampicillin Platten	LB-Medium plus 1 µg/ µl Ampicillin 500 ml LB-Medium +7,5 g BactoAgar in Mikrowelle aufkochen auf 40°C abkühlen und 200 µg/ ml Ampicillin hinzufügen

### 6.4 DNA-Längenstandards für die Agaroseelektrophorese

pucMix8

Fa. MBI Fermentas, Vilnius

1kB DNA-Ladder

Fa. LifeTechnologies, Basel

## 6.5 Kits

Name	Firma	Verwendung
Dual Luciferase Assay	Promega	Enhancer Aktivitätsbestimmung
Dynabeads mRNA Direct Micro Kit	DynalBiotech	RNA Isolation aus Hepatozyten
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Plasmid DNA Isolation aus E.coli
LightCycler ColorCompensation Kit	Roche	Kalibrierung LightCycler
LightCycler RNA Amplifikation Kit, Hybridization Probes	Roche	quantitative mRNA Bestimmung
Metafectene	Biontex	Transfektion von HepG2 und HepG2-2.15
peqGOLD Trifast	Peqlab Bio-technologie	DNA-Extraktion aus humaner Leber
Qiaquick DNA Gel Extraction	Qiagen	Aufreinigung von DNA aus Agarosegel
RenillaLuciferase Assay	Promega	Zellaktivitätsmessung
RiboGreen RNA Quantification Reagent and Kit	Molecular Probes	Konzentrationsbestimmung der RNA
RNeasyMini Kit	Qiagen	RNA Reinigung nach Transkription
Superfect Transfection Reagent	Qiagen	Transfektion von Huh7- und 1b-BB-Zellen

## 6.6 Bakterienstämme

Epicurian®XL1 Blue MRF'

Fa. Stratagene, Heidelberg

Genotyp:  $\Delta(\text{mcrA})183\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173\text{endA1 supE44thi-1recA1 gyr A96 rel A1 lac [F}^{\prime}\text{ proAB lacI}^{\text{q}}\text{Z}\Delta\text{M15TN10(Tet}^{\text{R}}\text{)]}$

## 6.7 Animale Zellkultur

Zellmedium und Zusätze	Zusammensetzung	Firma	Anmerkung
Insulin-Transferrin-Selen-Mix	0,5 µg/ ml Na-Selen 0,5 mg/ ml Transferrin 0,5 mg/ ml Insulin	Gibco BRL	-verhindert Apoptose -erhöht Fe <sup>2+</sup> -Aufnahme -Aktivierung GRB2/MAPK-Weg

Fötales Kälberserum (FKS)		PAN	Wachstumsfaktoren
DMEM-Medium		Gibco BRL	Dulbecco´s modified Eagle Medium für HepG2 und HepG2-2.15
Williams E- Medium		Invitrogen	für Huh7- und 1b-BB-Zellen
Gefriermedium	6 ml DMEM 2 ml FKS 2 ml DMSO		

## 6.8 Zelllinien

### HepG2-Zelllinie

ATCC HB-8065

Es handelt sich hierbei um eine humane Leberkarzinomzelllinie von einem 15jährigen ethnisch als „kaukasisch“ bezeichnetem Jungen (Aden DP et al., 1979).

### HepG2.2.15-Zelllinie

Diese Zelllinie ist abgeleitet aus der HepG2-Zelllinie. Sie enthält nach Transfektion u.a. zwei stabil als Dimer in das Zellgenom integrierte HBV-Genome vom Genotyp D (Subtyp ayw, EMBL No. U95551, 3´3´Anordnung der beiden Dimere, initiale Selektion über G418).

### Huh7-Zelllinie

[JCRB0403], Zellbank OUCI [JCRB]

Die Huh7-Zelllinie ist eine differenzierte humane Leberzelllinie von einem 57jährigen japanischen Mann mit Leberkarzinom (Nakabayashi und Sato, 1982). Ein Zellwachstum ist auch im serumfreien Medium möglich. Ein besseres Wachstum ist in selen- bzw. insulinhaltigen Nährmedien beschrieben.

### 1b-BB Zelllinie

Diese Zelllinie ist aus den Huh7-Zellen abgeleitet. Sie enthält selbstreplizierende subgenomische HCV-RNA Moleküle.

Die hier verwendete 1b-BB Zelllinie wurde uns von Klaus Grassmann und Sven-Erik Behrens freundlicherweise überlassen. Die stabile Transfektion mit dem HCV-Replikon wurde wie folgt durchgeführt:

Ausgangsvektor war das Plasmid pHCVrep 1b/BBVII[SG-Neo-(S2204I)] (Blight und Rice, 2000). Dieses enthält den Genotyp HCV 1b con 1 (consensus full length cDNA, Acc. No. aj238799 (Lohmann et al., 1999)). Das HCV-Fragment wurde mit XbaI und ClaI ausgeschnitten und in das puc19-Plasmid inkloniert. Dieses Plasmid wurde in vitro transkribiert, DNase verdaut, gereinigt und per Elektroporation in Huh7-Zellen stabil transfiziert (Selektion über G418). Die Zellen erhielten den Namen 1b-BB-Zellen (für den Genotyp **1b** und die **Blazing Blight Mutation**). Das Replikon besitzt eine Länge von 8,1kB und trägt die sogenannte Blazing Blight Mutation S2204I. Die Transkription des Neomycin-Gens ist unter Kontrolle der HCV-IRES, die der NS-Proteine unter Kontrolle der EMCV-IRES. Damit ergibt sich das Bild eines Bicistrons (Abb. 12).

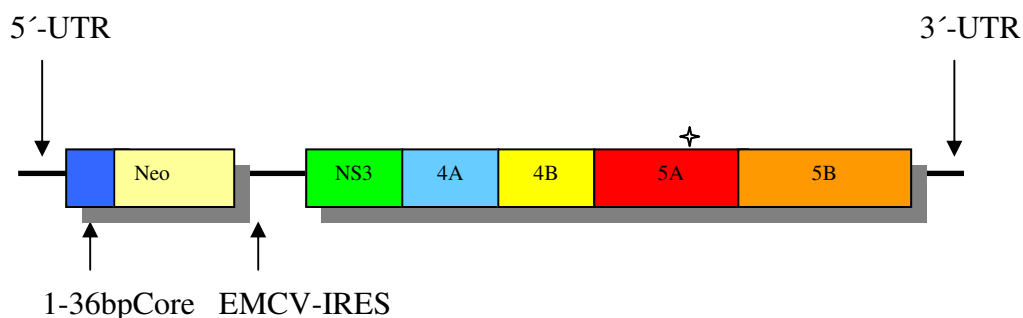


Abb. 12 Replikon der 1b-BB Zellen

⚡ = Position der S2204I Mutation (Blazing Blight Mutation), 1b-BB= Genotyp 1b mit Blazing Blight Mutation, Länge Replikon= 8,1 kB, 5'-UTR= bildet u.a. HCV-IRES, NS= Nichtstrukturprotein, Neo= Neomycin Resistenz Gen, EMCV= Enzephalomyocarditisvirus, IRES= internal ribosomal entry site, UTR= untranslated region, Ausgangsplasmid: pHCVrep1b/BBVII [SG-Neo (S2204I)] (Blight/Rice, 2000), inkloniert in puc19 über XbaI und ClaI, Genotyp: HCV 1b con1 (consensus full length cDNA, Acc.No. aj238799), Mutation: S2204I, Replikationseffizienz: 10% (Blight/Rice, 2002), Sequenz: Bicistron

Die 1b-BB Zellen wurden dauerhaft unter Selektionsdruck von G418 gehalten, da das Fehlen zu einer Verringerung der Replikonmenge und damit von HCV-Proteinen führt (Pietschmann et al., 2001).

## 6.9 Vektoren

### pcDNA 3.1+

Dieser Vektor stammt von der Fa. Invitrogen (Cat. No. V790-20). Es handelt sich um einen 5428 Basen großen Plasmidvektor mit dem immediate early CMV-Promotor und einem Resistenzgen gegen Neomycin bzw. Ampicillin.

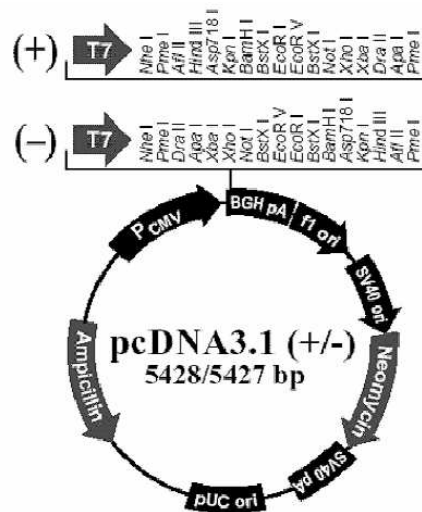


Abb. 13 Plasmidvektor pcDNA3.1+, Fa Invitrogen

### pcX

Dieser Vektor enthält das komplette X-Fragment des HBV (Länge 464 nt, Genotyp A, Serotyp adw2, Isolat 991, EMBL-Nr.: X51970) von Base 1374 bis Base 1838, einkloniert in pcDNA3.1+ über EcoRI und XbaI (kloniert von Ralph Schuster, Institut für Medizinische Virologie, Gießen).

### pHC 2-5/1b

Dieser Vektor enthält ein HCV-Core Insert (aa 1-191) des Genotyps 1b, Subtyp M58335, ebenfalls einkloniert in pcDNA3.1+ mittels HindIII und XbaI (kloniert von Christian Schüttler, Institut für Medizinische Virologie, Gießen).

### pc1820-0-1984

Es wurde ein 1,2 mer des HBV-Genoms (Genotyp A2, Serotyp adw2, Isolat 991, EMBL-Nr.: X51970) über KpnI und NotI von 1820 über 3221/1 bis 1984 in pcDNA3.1+ einkloniert. Das Startcodon ATG der prägenomischen RNA liegt bei Base 1852 bis Base 1854, das der preC RNA bei Base 1816 bis Base 1818. Eine Bildung von HBeAg ist also nur über den Zwischenschritt der cccDNA Bildung möglich (kloniert von Ralph Schuster, Institut für Medizinische Virologie, Gießen).

### pluci EII

Dieses enthält die gesamte Enhancer2/Core Promotor Sequenz aus HBV (Base 1381 bis Base 1903, Genotyp A2, Serotyp adw2, Isolat 991, EMBL-Nr.: X51970), einkloniert über BglII und NcoI vor das Luciferase-Gen von pLuci3. Das Plasmid pLuci3 leitet sich von dem Vektor pCAT-3 Basic (Fa. Promega) ab und enthält das Gen für die Firefly-Luciferase von *Photinus pyralis* aus pGL-2 Basic (ebenfalls Fa. Promega) (kloniert von Nicola Fiedler, Institut für Medizinische Virologie, Gießen). Damit enthält pLuci EII keine Regulationselemente zur eukaryontischen Expression außer dem einklonierten Enhancer-Element.

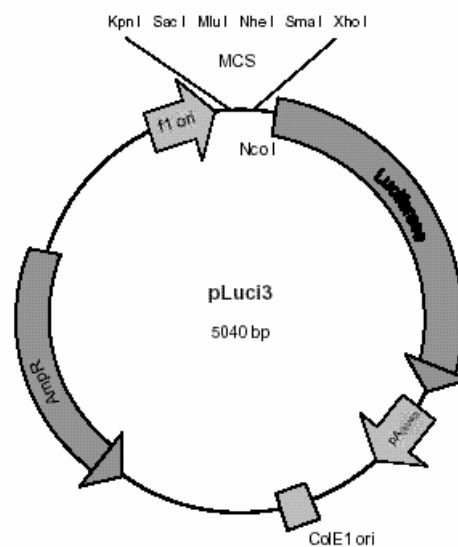


Abb. 14 Luciferasevektor pLuci3, Diplomarbeit Nicola Fiedler, Institut für Medizinische Virologie Gießen



### pLuci EI

Dieser Vektor entstand wie pLuci EII durch Einklonierung der Enhancer I/X-Promotor-Sequenz (Base 1040 bis Base 1372, Genotyp A2, Serotyp adw2, Isolat 991, EMBL-Nr.: X51970) vor den Luciferase-ORF in pLuci3 (kloniert von Nicola Fiedler, Institut für Medizinische Virologie, Gießen).

### pBlueSkript II SK+

Dieser Vektor stammt von der Fa. Stratagene (Cat. No. 212205). Es handelt sich um ein 3,0kB großen Phagemid-Vektor mit Ampicillinresistenzgen zur Expression in *E. coli* XL1-Blue MRF' bzw. zur in vitro Transkription über die T3/T7-Polymerase.

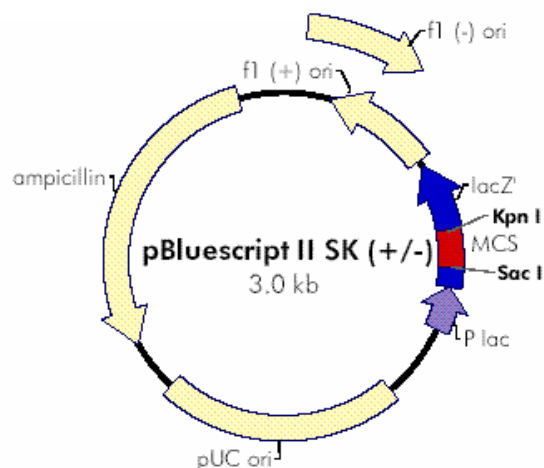


Abb. 15 Basisvektor pBluescript II SK +, Fa. Stratagene

### pBs 991 Dimer T7

Bei diesem Vektor wurde ein HBV EcoRI-Dimer (Genotyp A2, Serotyp adw2, Isolat 991, EMBL-Nr.: X51970) in pBlueScript II SK+ in Leserichtung des T7-Promotors inkloniert. Die HBV-Elemente stehen unter Kontrolle ihrer eigenen Promotor- und Enhancerelemente (kloniert von Ralph Schuster, Institut für Medizinische Virologie, Gießen).

### ph-Renilla TK mp

Dieser ca. 4,0 kB große Vektor leitet sich vom ph Renilla TK Vektor der Fa. Promega ab und enthält das Gen für die Renilla-Luciferase der *Renilla reniformis*, welches wie bei der Firefly-Luciferase des pLuci3 als Kontrollreporterenzym verwendet wurde. Das Gen steht unter Kontrolle des HSV-TK Promotors, Terminations- und Polyadenylierungssignal stammen von dem SV40-Virus. Im Gegensatz zu ph Renilla TK fehlen dem ph Renilla TK mp-Vektor die Schnittstellen für EcoRI und BglII.

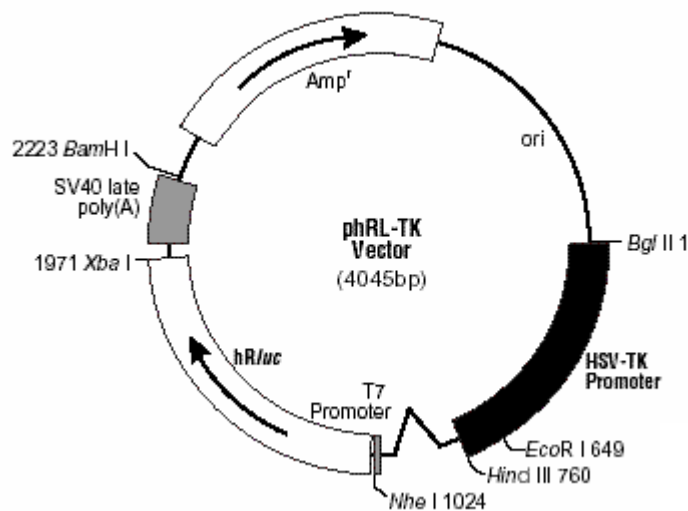


Abb. 16 ph Renilla TK, Fa. Promega

### 6.10 Primer und Hybridisierungssonden

X rtPCR			
	Primer	Name	Sequenz
	x-sense	HBV x2s	5'- gac gtc ctt tgt yta cgt ccc gtc-3'
	x-antisense	HBV x2as	5'- tgc aga ggt gaa gcg aag tgc aca-3'
	Hybprobes	Name	Sequenz
	Fluorescein	3FL-X	5'- acg ggg cgc acc tct ctt tac gcg g--FL
	LC Red 640	5LC-X	5'- LC Red 640- ctc ccc gtc tgt gcc ttc tca tct gc PH

<b>PG rtPCR</b>			
	<b>Primer</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
	pg sense	pg2s	5'- acc ata ccg cac tca ggc aag c-3'
	pg antisense	pg2as	5'- ctg cga ggc gag gga gtt ct-3'
	<b>Hybprobes</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
	Fluorescein	pg3fl	5'- ccc cta tct tat caa cac ttc cg --FL
	LC Red 640	pg3lc640	5'- LCRed640- gac tac tgt tgt tag acg acg agg PH
sämtl. Primer stammen von der Fa. MWG Biotech, sämtl. Hybprobes von der Fa. TIB-Molbiol			

### 6.11 Geräte

Zentrifuge Jouan CR 422	Fa. Firstenberg Machinery
Zentrifuge Centrikon H-401B water cooled	Fa. Kontron Instruments
Thermomixer HLC PRO GR	Fa. Dynal
Agarosegelkammer Horizon 11•14	Fa. GibcoBRL
Voltmeter Modul 200	Fa. GibcoBRL
UV-Illuminator TFX 20M	Fa. Vilber Gourmat
Spektrophotometer Dual DU-70	Fa. Beckmann
Lichtmikroskop Diavert	Fa. Leitz
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35 mit GFP- Filter 450–490 nm, FT 510/ LP 520	Fa. Zeiss
realtime PCR Gerät	Fa. Roche
LightCycler 1.0 Software Version 3.5	
HybaidCycler Combi Thermal Reactor TR-2	Fa. MWG Biotech
ELISA Shaker	Fa. Amershan
LMax™ microplate ELISA reader	Fa. Molecular Devices
Software Soft Max Pro for LMax 1.1L	
Typhoon 9200 Variable Mode Imager	Fa. Molecular Dynamics
Lamin Air HB 2448 Arbeitsbank	Fa. Heraeus
LP-400 ELISA-Reader	Fa. Pasteur
ELISA Washer	Fa. Tecan SLT

## 7. Methoden

### 7.1 Zelltransformation

Die Einschleusung von Plasmid-DNA erfolgte in kompetente *E. coli* XL 1 Blue MRF<sup>-</sup>-Bakterien. Transformationskompetenz wurde durch die CaCl<sub>2</sub>-Methode erreicht. Die kompetenten Bakterien wurden freundlicherweise von Dipl. biol. Katja Schmidt zur Verfügung gestellt. Die eigentliche Transformation wurde wie folgt durchgeführt: 100 µl kompetente Bakterien (gelagert bei -70°C) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 ng Plasmid-DNA zugesetzt und dieser Ansatz 10 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurde diese Lösung im Sinne eines Hitzeschockes für 2 Minuten auf 41°C erhitzt. Nun wurde 1 ml LB-Medium zugesetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend entsprechend dem enthaltenen Resistenzgen auf LB-Antibiotikaplatten ausplattiert und für ca. 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erfolgreicher Transformation können einzelne Klone leicht abgegrenzt werden.

### 7.2 Plasmid-DNA Präparation

Die Präparation erfolgt mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits der Firma Qiagen. Zunächst wurde eine transformierte Bakterienkolonie einer Antibiotikaplatte mit einer Pipettenspitze aufgenommen und mit der Spitze in 200 ml LB-Medium in einen großen Erlenmeyerkolben gegeben. Weiterhin wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugeführt. Es erfolgte Inkubation bei 37°C über Nacht auf einem Rüttler. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Bakterien bei 4°C und 4500 g 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in Resuspensionspuffer aufgenommen. Grundlage der nun folgenden Plasmid-DNA Isolation ist die alkalische Lyse. Hierbei wird den resuspendierten Bakterien ein Lysispuffer mit 200 mM NaOH und 1% SDS zugeführt. Das SDS lysiert dabei die Bakterienmembran, das NaOH denaturiert sowohl Proteine, als auch Plasmid-DNA und chromosomale DNA. Nach Zufuhr des Lysispuffers wurde die entstandene visköse Lösung 4-5 mal geschwenkt, aber nicht geschüttelt, um die chromosomale DNA, die an der Zellwand gebunden ist, nicht zu mobilisieren. Durch die entstandene Perforation der Bakterienwand kann die denaturierte Plasmid-DNA, nicht aber die chromosomale DNA, in den Überstand entweichen. Austretende RNA wird durch die im Resuspensionspuffer enthaltene RNaseA abgebaut. Durch Zufuhr des Neutralisationspuffers

und ca. 4-5 maligem Schwenken wurde nach vier Minuten die Bakterienlyse gestoppt. Die saure Kaliumacetatlösung bildet mit dem alkalischen Lysispuffer unlösliches Kalium-Dodecylsulfat, welches mit dem Zelldebris präzipitiert. Anschließend wurde das Bakterienlysate ca. eine halbe Stunde mit einem Filter filtriert, dessen Poren aufgrund ihrer Abmessung zwar den Zelldebris einschließlich der chromosomalen DNA, nicht aber die Plasmid-DNA auffing. Das Sammelgefäß stand hierbei auf Eis. Im Anschluss wurde das Filtrat über den äquilibrierten Qiagenfilter gefiltert, welche die Plasmid-DNA bindet, zweimal mit 30 ml Waschpuffer gewaschen (mittlere Salzkonzentration) und schließlich mit 15 ml Elutionspuffer (hohe Salzkonzentration) in ein Spezialröhrchen eluiert. Es wurde 10,5 ml Isopropanol zur DNA-Fällung hinzugefügt und 60 Minuten bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet in ca. 1 ml 70%igen Ethanol aufgenommen und für 5 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde verworfen und das somit gewaschene DNA Pellet in TE-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der DNA im UV-Photometer. Hierzu wurde die DNA-Lösung 1:100 mit TE-Puffer verdünnt und 100 µl hiervon in eine Quarzküvette gefüllt. Nach Einstellung des Nullwertes mit TE-Puffer erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ). Die gemessene  $OD_{260}$  wird mit dem Verdünnungsfaktor und einem nukleinsäurespezifischen Faktor (für DNA= 50, für RNA= 40) multipliziert. Es ergibt sich die Konzentration in µg/ ml. Gleichzeitig wurde der Reinheitsgrad der isolierten DNA über den  $OD_{260/280}$ -Quotient bestimmt. Es kamen nur Plasmide mit einem Reinheitsgrad von 1,5 bis 2,0 zum Einsatz.

### 7.3 Restriktionsverdau

Zur Bestätigung der Isolation des korrekten Plasmids wurde dieses einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen. Für die jeweiligen Plasmide wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet (Fa. New England Biolabs, Schwalbach). Die resultierenden Fragmente sind in ihrer jeweiligen Größe angegeben.

1. pHC2-5/1b und HindIII und XbaI: 5907B, 573B
2. pc1820-0-1984 und HindIII: 9228B
3. pBs991T7 und AatII: 6221B, 3221B
4. pcX und FspI und NdeI: 2364, 1426, 1185, 830B

- |                             |       |
|-----------------------------|-------|
| 5. pLuciEI und XhoI:        | 4560B |
| 6. pLuciEII und KpnI:       | 4760B |
| 7. ph Renilla TK mp + FspI: | 3396B |
| 8. pcDNA3.1+ und KpnI:      | 5428B |

Es wurde auf 1 µg der Plasmid-DNA 1 µl Restriktionsenzym und 1 µl des passenden Puffers gegeben und auf 10 µl mit Wasser aufgefüllt (ca. 1 U/ µg DNA). Das Gemisch wird anschließend 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert und in der darauffolgenden Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 17)

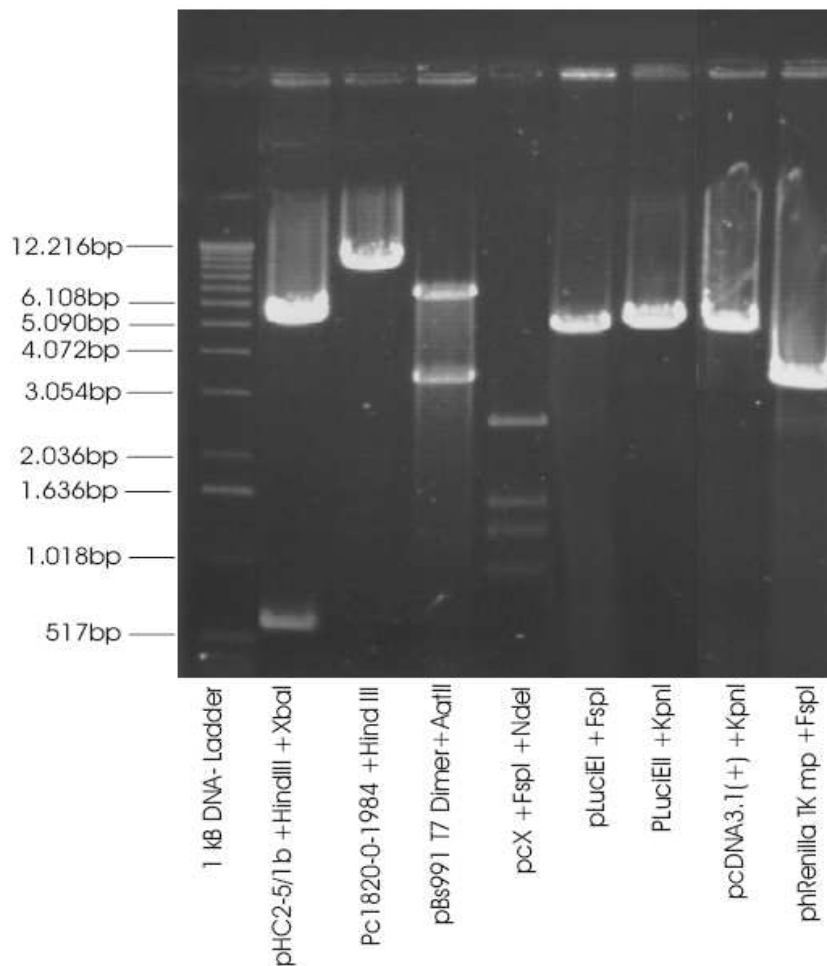


Abb. 17 Analytischer Verdau aller verwendeten Vektoren, 1%iges Agarosegel

## **7.4 Agarosegelelektrophorese**

Hierfür ist zunächst ein 1%iges Agarosegel herzustellen. Je nach Fragmentgröße wurden auch höhere Agarosekonzentrationen gewählt. Man gibt auf 495 ml 1fach TAE-Puffer 5 g Agarosepulver und kocht dies in der Mikrowelle auf, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Anschließend lässt man das Agarosegel auf ca. 60°C abkühlen und gießt mit Hilfe eines Plastikammes ein Gel mit Taschen. Dieses Gel lässt man aushärten. Anschließend wurde die Gelkammer mit 1fach TAE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig vom Puffer bedeckt ist. Nun erst wurde der Kamm entfernt. Damit werden Luftblasen in den Geltaschen verhindert. Anschließend wurden die Proben wie folgt eingefüllt: Die 10 µl aus dem Restriktionsverdau werden mit 2 µl 6fach Agarose Loadingpuffer versehen. Nach vorsichtigem Einfüllen der Proben wurde eine Spannung von ca. 50-100 V angelegt. Nach Auftrennung der Banden erfolgte die Färbung im Ethidiumbromidbad (1fach TAE-Puffer plus EtBr in einer Endkonzentration von 2 µg/ ml) für ca. 15 bis 20 Minuten. Die Banden wurden im UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente dienten parallel laufende Größenmarker (1 kB-Ladder und pucMix8).

## **7.5 In Vitro Transkription**

### **7.5.1 Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau zur in vitro Transkription verläuft prinzipiell wie der oben beschriebene analytische Verdau. Lediglich die DNA-Menge (ca. 5-7,5 µg) und die Menge der Enzyme wurde deutlich erhöht. Der Ansatz wurde ca. 4-5 Stunden inkubiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte anschließend in einem niedrigprozentigen, meist 1%igen Agarosegel. Unter dem UV-Illuminator wurde die gewünschte Bande mit T7-Promotor und gewünschten Fragment detektiert und ausgeschnitten.

### **7.5.2 DNA-Isolation aus AgaroseGel**

Mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits von Qiagen wurde die DNA aus der ausgeschnittenen Bande isoliert. Die Aufreinigung erfolgte hierbei nach der Glasmilchmethode über einen Silica-Filter in Anwesenheit chaotroper Salze. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung im UV-Photometer wie oben beschrieben.

### 7.5.3 In-vitro Transkription

Die in-vitro Transkription erfolgte mit folgendem Ansatz:

6 µl DTT

6 µl NTPs (10 mM jeweils)

6 µl 10fach TRX- Puffer

1,5 µl Rnasin

3 µl T7-Polymerase

1 µg Template

ad 60 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Je nach zu bildender RNA-Größe wurde 2-4 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei RNA-Bildung wird der Ansatz trüb.

### 7.5.4 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau erfolgte mit Hilfe einer RNase freien DNase I. Dem obigen Ansatz wurden 3 µl DNase I hinzugesetzt (470 U/ ml) und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. MgCl<sub>2</sub> muss nicht zugesetzt werden. Es ist schon im TRX-Puffer enthalten und liegt dann in einer Konzentration von 5,7 mM vor.

### 7.5.5 RNA-Reinigung

Die RNA-Reinigung erfolgte mittels der Phenol/Chloroform-Methode bzw. mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Bei letzterem wurde nach gegebenen Protokoll vorgegangen. Die Reinigung erfolgt über ein Silica-Gel, an das die RNA (>200 bp) bindet. Bei dieser Aufreinigungsmethode wurden sehr gute Reinheitsgrade der RNA erzielt.

Bei der Phenol/Chloroform- Methode wurde wie folgt vorgegangen: Der 63 µl messende obige in vitro Ansatz wurde mit 137 µl DEPC-H<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl Phenol/Chloroform 1:1 hinzugegeben, gevortext und 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde unter Vermeidung der Interphase abgezogen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 200 µl Chloroform wurden hinzugefügt, es wurde 1-2 Minuten gevortext und 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgezogen. Zur RNA-Fällung wurden 36 µl 6 M Ammoniumacetat sowie 472 µl Ethanol reinst zugeführt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde der Ansatz 12 Stunden auf -70°C gelagert. Nach Auftauen auf Eis erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei



14.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl Ethanol gewaschen. Das restliche Ethanol lässt man verdampfen und löst das Pellet in einer adäquaten Menge RNase freien Wassers. Die RNA wurde bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **7.5.6 RNA-Gelelektrophorese**

Die Agarose wurde mit einem Anteil von 1,4% in 1fach MEN-Puffer gelöst. Vor Gießen des Gels wurde die Gelkammer mit 5%iger SDS-Lösung ausgesprüht und anschließend mit Aqua bidest. gespült. Als Laufpuffer wird ebenfalls 1fach MEN-Puffer verwendet. Die RNA-Proben wurden wie folgt vorbereitet:

2 µl der RNA-Probe wurden mit 6 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl deionisiertem Formamid gemischt und für 5 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert, was die RNA denaturierte. Anschließend wurden sofort 2 µl 6fach Agaroseprobenpuffer II hinzugegeben und der Ansatz in die Geltaschen gefüllt. Bei der Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 50 V angelegt. Anschließend erfolgte die Färbung im EtBr-Bad.

### **7.5.7 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die gewonnen RNA sollte u.a. als Standard bei verschiedenen quantitativen RT-PCRs dienen. Entsprechend waren die Konzentrationen möglichst genau zu bestimmen.

Als sensitivste Methode zur Konzentrationsbestimmung fand die Fluoreszenzmessung mittels eines RNA-bindenden Farbstoffes Anwendung. Die Messung wurde mit Hilfe des „RiboGreen RNA Quantitation Reagent“ der Firma Molecular Devices durchgeführt. Es wurde nach Protokoll ein low range assay (Konzentrationsbereich von 2,5-50 ng/ ml RNA) angefertigt. Als Standard diente eine HBV X-RNA, deren Konzentration im Photometer mit 0,07 µg/ µl gemessen wurde. Diese wurde mit TE-Puffer auf eine Zielkonzentration von 1 ng/ µl eingestellt. Aus dieser RNA-Stammlösung wurde mit TE-Puffer und 1:2000 verdünntem RiboGreen Farbstoff eine Verdünnungsreihe von 0,25 ng/ µl bis 0,01 ng/ µl erstellt. Alle zu messenden Proben wurden insgesamt 1:1000 verdünnt. Die Proben wurden in eine spezielle Mikrotiterplatte (nunc F16 immuno modules) pipettiert und lichtgeschützt auf Eis zwischengelagert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Typhoon 8600 Imaging System mit dem Emissionsfilter 526SP/Green 532 nm. Der Farbstoff RiboGreen zeigt eine Exzitationsmaximum von 500 nm und ein Emissionsmaximum von 525 nm. Aus der angegebenen Geradengleichung ergaben sich dann die Konzentrationen für die unbekannt RNA-Proben.

Aus diesen Konzentrationsangaben wiederum wurde die Anzahl der RNA-Kopien pro Reaktionsansatz berechnet. Grundlage hierfür war das mittlere Gewicht pro RNA Base, das 340 Dalton beträgt. Eine Base ss-RNA wiegt damit  $5,64 \times 10^{-22}$  g (1 D=  $1,66 \times 10^{-24}$  g). Dieses Gewicht wurde mit der Basenlänge der gebildeten RNA multipliziert und ergab das Gewicht der RNA. Die gewonnene Konzentration für die RNA wurde durch das Gewicht der einzelnen RNA dividiert, womit sich die Anzahl der RNA- Kopien pro  $\mu$ l ergab. Anschließend wurde die Anzahl der RNA-Kopien pro Reaktionsansatz ermittelt.

## **7.6 Kultivierung von Hepatozyten**

### **7.6.1 HepG2/HepG2.2.15 Zellen**

HepG2 und HepG2.2.15 Zellen wurden identisch behandelt. Als Zellmedium diente DMEM unter Zusatz von 10% FKS. Die Zellen wurden auf 24 cm großen Platten gehalten (unbehandelte Multiwell-Zellkulturplatten, Fa. Nunc, Wiesbaden, Cat. Nr. 144530), regelmäßig separiert und dauerhaft auf Integrität überprüft. Zur Passagierung wurde das Zellmedium abgesaugt, die Zellen mit 1fach PBS gewaschen und durch Zugabe von 5-10 ml Trypsin/PBS 1:5 abgelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in frischem Medium aufgenommen und neu ausplattiert. Nach ca. 2 Stunden wurde das Medium nochmals gewechselt.

Zur mRNA-Isolation wurden die Zellen 12-18 Stunden vor der Transfektion mit 60-70%iger Konfluenz auf 24 well Platten ausgesät. Die Kulturbedingungen sind im Kapitel „Ergebnisse“ dargestellt. Pro well wurden 2 ml DMEM hinzugefügt, welches alle drei Tage gewechselt wurde. Die Zellüberstände wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und später der HBsAg-Bestimmung zugeführt.

### **7.6.2 Huh7- und 1b-BB-Zellen**

Beide Zelllinien wurden auf 24 cm messende Platten in Williams E-Medium plus 1fach ITS (Insulin, Transferrin und Selen) kultiviert. Aufgrund der hohen Zellteilungsrate wurde dem Medium nur 1% FKS plus zugesetzt. Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurden die 1b-BB-Zellen über 2 Wochen relativ hohen G418-Konzentrationen ausgesetzt ( $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), um eine suffiziente Selektion zu gewährleisten. Im weiteren Verlauf wurde dem 1b-BB-Zellmedium G418 in einer Konzentration von  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  zugeführt. Nach Umsetzen in 24

well Platten zur mRNA-Isolation wurde kein G418 mehr zugesetzt. Beide Zelltypen wurden in 24 well Platten relativ dünn mit einer Zelldichte von 30-40% ausgesät.

12-18 Stunden nach Aussaat wurde die Transfektion (s.u.) durchgeführt. Da die Zellen bis zu 8 Tage in den 24 well Platten gehalten wurden, wurde der FKS-Zusatz bei 1% gehalten. Nach 6-7 Tagen wurde damit eine vollständige Konfluenz erreicht. Insgesamt war es möglich, die Zellen unter diesen Bedingungen maximal 13 Tage in gutem Zustand in 24 well Platten zu züchten. Das Zellmedium wurde alle 2 Tage gewechselt und auf  $-20^{\circ}\text{C}$  zur HBsAg Bestimmung aufbewahrt.

### **7.7 Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/PBS 1:5 abgelöst und in DMEM aufgenommen. Man zentrifugiert die Zellen bei 1500 rpm 10 Minuten ab. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in einem kleinen Volumen DMEM aufgenommen und 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1-1,5 ml Gefriermedium langsam zugeführt, die Zellen nochmals 10 Minuten auf Eis gestellt und wiederum 1-1,5 ml Gefriermedium zugegeben. Die Zellen wurden in einer  $-70^{\circ}\text{C}$  Kühltruhe langsam eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **7.8 Aufreinigung chromosomaler DNA**

Die Aufreinigung chromosomaler DNA aus Gewebeproben erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Phenol/Chloroformextraktion (PeqLab, preGold Trifast). Nach Zellyse und RNA-Extraktion wie unter 7.10 beschrieben erfolgte die weitere Aufreinigung nach Angaben des Herstellers.

### **7.9 DNA-Transfektion**

Alle HepG2-Zellen wurden mit Metafectene (Fa. Biont, Martinsried), alle Huh7- und 1b-BB-Zellen nach der Superfect-Methode (Fa. Qiagen, Hilden) transfiziert.

#### **7.9.1 Metafectene**

Metafectene ist ein polykationisches Transfektionsreagenz in Kombination mit einem neutralen Kolipid. Der erste Faktor bindet aufgrund seiner kationischen Eigenschaften das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA, der zweite Faktor sorgt aufgrund seiner

Lipophilie für den Durchtritt durch die Lipidmembran der Zelle. Die DNA wird im Zytoplasma vollständig freigesetzt. Sich teilende Zellen fördern den Übertritt der DNA in den Nukleus zur Transkription.

Die HepG2-Zellen wurden 12-18 Stunden vor Transfektion in 24 well Platten mit einer Zelldichte von ca. 60-70% ausgesät. Die DNA- und Metafectene-Lösungen wurden auf Raumtemperatur gebracht und vor Gebrauch leicht gevortext. Pro well wurden insgesamt 0,5 µg DNA transfiziert. Es wurde wie folgt vorgegangen: 0,5 µg DNA-Lösung wurde mit DMEM auf 50 µl aufgefüllt. 1,5 µl Metafectene wurde mit 48,5 µl serumfreiem DMEM in einem zweiten Eppendorfgefäß angesetzt. Das Volumenverhältnis DNA zu Metafectene lag damit bei 1:3. Hiermit zeigte sich eine optimale Transfektionseffizienz. Die Lösungen wurden zusammengegeben und 2-3 mal auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die 100 µl Endlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und zu 1,5 ml FKS-haltigem DMEM in das entsprechende well pipettiert. Die Inkubation der Zellen mit dem DNA-Lipid-Komplex erfolgte für 4-6 Stunden, dann wurde das Zellmedium gewechselt.

### **7.9.2 Superfect- Methode**

Das Superfect-Reagenz ist ein verzweigter Komplex mit globulärer Form (ein sog. Dendrimer). Die einzelnen Äste enden in positiv geladenen Aminosäuren, an die die DNA-Moleküle binden und komplexiert werden. Der Superfect-DNA Komplex bindet an negativ geladene Sialoglykoproteine eukaryontischer Zellmembranen. Die Aufnahme erfolgt pinozytisch. Wie die Freisetzung aus dem sich bildendem sekundärem Lysosom erfolgt ist noch nicht geklärt. Die eigentliche Transfektion wurde wie folgt durchgeführt: Pro well einer 24 well Platte wurden 0,5 µg DNA transfiziert. Zu dieser DNA-Lösung wurde das Superfect Reagenz in einem DNA-Superfect-Verhältnis von 1:5 gegeben sowie 60 µl serumfreies WilliamsE-Medium. Anschließend wurde für 10 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden nun 350 µl WilliamsE-Medium mit 1,0% FKS und ITS zugegeben. Die gesamte Transfektionslösung wurde dann auf die frisch gewaschenen, vor 12 Stunden mit einer Zelldichte von 30-40% ausgesäten Zellen gegeben, welche anschließend für 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Hiernach erfolgte ein normaler Mediumwechsel. Es wurden nach Waschen mit PBS 500 µl WilliamsE-Medium zugeführt, dem 1% FKS und ITS zugegeben wurde.

### 7.10 RNA-Isolierung

Die mRNA-Isolierung aus Hepatozyten erfolgte mit Hilfe des „Oligo(dT)<sub>25</sub> mRNA direct Micro Kit“ der Firma Dynal Biotech. Grundlage der Aufreinigung ist die Basenbindung der poly A-Enden der mRNA-Moleküle an die Oligo(dT)<sub>25</sub>. Es handelt sich bei diesen Oligo-partikeln um sphärische biomagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 2,8 µm, an deren Oberfläche kovalent Oligo(dT)<sub>25</sub>-Sequenzen gebunden sind. Zur Aufreinigung wurden separate Eppendorfgeläße und separate gestopfte Pipettenspitzen verwendet, um Kontaminationen mit RNasen zu minimieren.

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Vor Lyse der Zellen wurden diese in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden grundsätzlich in jeder Probe das maximale Fassungsvermögen der Oligo(dT)<sub>25</sub>-Partikel knapp überschritten, um standardisierte Bedingungen zu erreichen. Die Zelllyse erfolgte mit 1%iger LiDS-Lösung, der zusätzlich DTT als Schutz vor RNasen zugesetzt war. Am Ende der Isolation wurden die mRNAs eluiert und die Oligo(dT)s verworfen. Um DNA-Kontaminationen komplett auszuschließen, erfolgte nach der Aufreinigung durch Zugabe von 5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 µl DNaseI/ RNase frei sowie Inkubation bei 37°C über 45 Minuten ein DNase-Verdau. Die Proben wurden entweder direkt in die RT-PCR eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C zwischengelagert. Nach Angaben des Herstellers kann man mit 20 µl Oligo(dT)s die mRNA von 1x10<sup>4</sup> kultivierten Zellen isolieren. Aufgrund der verwendeten Volumina im Reaktionsansatz des externen Annealings und der LightCycler Reaktion (Seite 45, Abschnitt 7.11) bezieht sich die isolierte mRNA Menge auf circa 2000 lysierte Zellen.

### 7.11 RT-PCR und LightCycler Instrument

Die RT-PCRs wurden mit dem LightCycler Instrument der Firma Roche durchgeführt. Zunächst soll die Quantifizierungs- und Meßmethode dargestellt werden. Zur Quantifizierung wurde eine externe Referenzlösung hergestellt (s.o.). Nach genauer Konzentrationsbestimmung wurde die Anzahl der RNA-Kopien pro LightCycler-Reaktionsansatz berechnet (s.o.). Es wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, indem die Referenzlösung 1:10, 1:100 usw. verdünnt wurde. Auf dem Boden der bekannten Konzentrationen der Standardkurve errechneten sich die Werte der einzelnen Probe. Grundlage der LightCycler-Messmethode ist die Auswertung von Fluoreszenzdaten der amplifizierten Proben. Diese Fluoreszenz wird durch zwei sogenannte hybridization probes, kurz „Hybprobes“, vermittelt. Es handelt sich hierbei um

kurze Oligonukleotide (20-30 mer), an deren 5'- bzw. 3'-Enden chemische Veränderungen vorgenommen wurden. Beide Hybprobes wurden mit dem LC Probe Design Programm der Firma Roche entwickelt. Die Sequenz der beiden Hybprobes ist dem Amplikon komplementär und ermöglicht die Hybridisierung mit dem gesuchten DNA-Fragment. Die Hybprobes erlauben aufgrund ihrer Komplementarität eine hohe Spezifität hinsichtlich der Amplikon-detektion. Die beiden Hybprobes werden dabei so gewählt, dass sie auf dem Amplikon vorzugsweise 1-5 Basen voneinander entfernt hybridisieren. Dies bringt das 3'-Ende der ersten mit dem 5'-Ende der zweiten Hybprobe in engen Kontakt. An das 3'-Ende der ersten Hybprobe wurde der Donorfarbstoff Fluoreszein gebunden, an das 5'-Ende der zweiten Hybprobe der Akzeptorfarbstoff LC-640. Die LC-640 Hybprobe ist zusätzlich am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Sequenzverlängerung der DNA durch DNA-Polymerase zu verhindern. Nach Anregung des Fluoreszenz durch blaues Licht kann die Energie ohne Lichtausstrahlung aufgrund der engen räumlichen Anordnung auf dem Amplikon auf den Akzeptorfarbstoff LC-640 übergehen und diesen zur Emission von Licht der Wellenlänge 640nm veranlassen. Der Energietransfer zwischen den Hybprobes wird auch FRET genannt (fluorescence resonance energy transfer). Das Licht wird im F2-Kanal des LightCycler Gerätes detektiert und auf die Hintergrundstrahlung im F1-Kanal bezogen. Es besteht innerhalb gewisser Grenzen eine proportionale Beziehung zwischen der Stärke der Fluoreszenz und der Menge an amplifizierter DNA. Im Verlauf der PCR ergibt sich eine bestimmte Kurvencharakteristik mit annähernd sigmoidalem Verlauf (s.u. ). Eine annähernde Verdopplung der Amplikonmenge pro Zyklus liegt nur im linearen Anteil der Fluoreszenzkurve vor (auch log-Phase genannt). Diese log-Phase wird durch eine Näherungsgerade beschrieben, welche die Nulllinie (gemittelte Hintergrundstrahlung) an einem gewissen Punkt schneidet. Diesen Punkt nennt man crossing point. Anhand der crossing points der Standardkurve wird eine Regressionsgerade, die in Bezug zur Zyklusanzahl steht, abgeleitet. Anhand dieser Regressionsgerade werden die RNA-Konzentrationen aller unbekanntenen Proben bestimmt. Eine Kalibrierung der Messkanäle erfolgte mittels des ColorCompensation Kits der Firma Roche. Zur Bestimmung der HBV-Gesamt-RNA-Menge wurde die X-RT-PCR entwickelt, zur Bestimmung der preC- und prägenomischen-RNA die PG-RT-PCR. Bei beiden RT-PCRs wurde zunächst die reverse Transkription von 12 Minuten bei 55°C durchgeführt. Beide PCRs durchlaufen während der Amplifikationsphase 45 Zyklen und zeigen den gleichen Temperatur- und Zeitverlauf der Schmelzkurven- und Kühlphase. Im Anschluss an die RT-

PCR wurde jeweils eine DNA-Gelelektrophorese in 2%iger Agarose durchgeführt. Beide RT-PCRs wurden mit Hilfe des „LightCycler RNA Amplification Kits“ der Firma Roche durchgeführt. Der MasterMix setzt sich wie folgt zusammen:

4,5 µl H<sub>2</sub>O

3,0 µl MgCl<sub>2</sub>

1 µl Sense Primer (10 pmol/ µl)

1 µl Antisense Primer (10 pmol/ µl)

0,5 µl FL-Hybprobe (8 pmol/ µl)

0,5 µl LC-640-Hybprobe (8 pmol/ µl)

0,5 µl Taq-Polymerase

4 µl ReactionMix (enthält Puffer, dNTPs und AMV-DNA-Polymerase)

Um die cDNA-Bildung durch die AMV-Polymerase zu erhöhen, wurden alle Proben vor der PCR einem externen Annealing unterzogen, was die Bindung von AS-Primer erhöht und damit auch die Effizienz der reversen Transkription. Extern bedeutet hier, dass ein eigenständiger Reaktionsansatz zunächst unabhängig von der eigentlichen RT-PCR vorbereitet wurde. Hierzu wurden 8 µl Template mit 2 µl AS-Primer (10 pmol/ µl) versetzt und folgendem Temperaturverlauf im HybaidCycler unterzogen:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	60sec
2	56°C	60sec
3	4°C	120sec

Aus dem Ansatz des externen Annealings wurden 5 µl als Template zu 15 µl des Master Mixes gegeben. In einem ersten gemeinsamen Reaktionsschritt erfolgte bei 42°C über 10 Minuten eine reverse Transkription mit o.g. AMV-Polymerase (avian myoblastosis virus). Diese stellt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit RNaseH-Aktivität dar. Sie elongiert unter Degradation des RNA-Templates den im externen Annealing gebundenen AS-Primer. Im Sinne einer „one tube Reaktion“ erfolgte im gleichen Ansatz im direkten Anschluß die eigentliche Amplifikation der entstandenen cDNA. Im Folgenden seien nochmals kurz die Temperaturverläufe der einzelnen RT-PCRs dargestellt.

### 7.11.1 X-RT-PCR

Die Länge des Amplikon beträgt 188 B. Es wurden folgende Primer und Hyprobes eingesetzt: HBV X2s-Primer, HBV X2as-Primer, 3FL-X-Hybprobe, 5LC-X-Hybprobe. Der Temperaturverlauf des Amplifikationszyklus sei kurz aufgelistet:

Step	Denaturation	Primer-annealing	Hyprobe-annealing	Extension
Target Temperature	95°C	64°C	64°C	72°C
Incubation time	10''	15''	1'	13''
Temp. Transition rate	20°C	20°C	5°C	5°C
Sec. Target Temperature		52°C		
Step Size		1,0		
Step Delay		1		
Acquisition Mode	none	none	single	none

### 7.11.2 Prägenomische-RT-PCR

Die Amplikonlänge beträgt 348 Basen. Es wurden folgende Primer und Hyprobes verwendet: pg2s-Primer, pg2as-Primer, pg3fl-Hybprobe, pg3lc640-Hybprobe. Der Temperaturverlauf des Amplifikationszyklus gestaltete sich wie folgt:

Step	Denaturation	Primer-annealing	Hyprobe-annealing	Extension
Target Temperature	95°C	59°C	59°C	72°C
Incubation time	10''	12''	1'	13''
Temp. Transition rate	20°C	20°C	5°C	5°C
Sec. Target Temperature		50°C		
Step Size		1		
Step Delay		1		
Acquisition Mode	none	none	single	none

### 7.12 Luciferase-Assay

Die Luciferase Assays dienen zur Quantifizierung der eukaryontischen Genexpression. Sie wurden verwendet, um die Aktivität der Enhancerelemente des HBV zu bestimmen. Es kamen zwei unterschiedliche Luciferase-Enzyme zum Einsatz: zum einen die Firefly-



Luciferase aus *Photinus pyralis* (amerikanische Feuerfliege), die in Anwesenheit von ATP und O<sub>2</sub> Luciferin in ein lumineszierendes Endprodukt (Oxy-Luciferin) umwandelt, zum anderen die Renilla-Luciferase aus *Renilla reniformis* (gemeine Seefeder), die aus Coelenterazin unter O<sub>2</sub> ebenfalls einen lumineszierenden Stoff bildet (Oxy-Coelenterazin). Die Lumineszenz wurde im L<sub>max</sub>-Luminometer gemessen und gilt als Maß für die Genexpression des jeweiligen Plasmids. Wurden beide Luciferasen eingesetzt, erfolgte die Messung sequentiell. Es wurden die Plasmide pLuciEI, pLuciEII (beide Firefly-Luciferase) und ph Renilla TK mp (Renilla-Luciferase) eingesetzt.

### 7.12.1 Renilla-Luciferase-Assay

Dieser Assay diente der Bestimmung der unterschiedlichen Transkriptionseffizienz von Huh7- und 1b-BB-Zellen. Vor der eigentlichen Messung wurden die zu untersuchenden Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Pro Messung wurden so immer gleiche Zellzahlen lysiert, so dass alle Werte beliebig untereinander vergleichbar waren. Dies sollte eventuelle Wachstumsunterschiede zwischen Huh7- und 1b-BB-Zellen aufdecken. Es wurde die Aktivität der Renilla-Luciferase mit Hilfe des „Renilla Luciferase Assay Kits“ der Firma Promega gemessen. Die ermittelnden Werte von Huh7- und 1b-BB-Zellen wurden als 1b-BB/Huh7-Renillaquotient in Beziehung gesetzt. Parallel hierzu wurden aus der gleichen Versuchsreihe die mRNAs und die HBsAg-Produktion des HBV in Huh7- und 1b-BB-Zellen quantifiziert. Alle gemessenen RNA- und HBsAg-Konzentrationen der 1b-BB-Zellen wurden durch den oben genannten Quotienten dividiert, um eventuelle transaktivierende Eigenschaften des stabil transfizierten Replikons auszugleichen.

### 7.12.2 Dual Luciferase Assay

Die duale Messung der beiden Luciferase Enzymaktivitäten erlaubt eine direkte Standardisierung. Während die Aktivität des Luciferasegens der pLuciEI- und pLuciEII-Plasmide unter dem experimentellen Einfluss der HBV-Enhancerelemente stand, stellt die Enzymaktivität der Renilla-Luciferase eine interne Kontrolle dar, die frei von einer Einflussnahme durch HBV-Regulationselemente sind. Die Messung erfolgte im L<sub>max</sub>-Luminometer mit Hilfe des „DualLuciferase Kits“ der Firma Promega. Es wurde nach gegebenem Protokoll vorgegangen. Die Ergebnisangabe erfolgte in Form eines Luciferase/Renillaquotienten, das heißt, die Biolumineszenz des Luciferase Endproduktes wurde in Beziehung zur Biolumineszenz des

Renilla Endproduktes gesetzt. Die Messung erfolgte mit einem Untersuchungsvolumen von 100  $\mu\text{l}$  und einem Delay von 2 Sekunden. Jede Messung erfolgte dreimal. Es wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

### 7.13 ELISA

Bei dem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) handelt es sich um ein Verfahren zur Detektion von Proteinen, das sich die Spezifität von Antikörpern zu nutze macht. An einen für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper wird zur Quantifizierung ein Enzym konjugiert, welches einen Farbstoff produziert, der wiederum kolorimetrisch erfasst werden kann. Die hier durchgeführten ELISAs erfolgten im „Sandwichverfahren“ auf 96 well nunc Maxisorb Platten. Zur Detektion von SHBs-Ag aus Zellüberständen wurde der Antikörper C20/2 verwendet. Als Standard wurde ein gereinigter laborinterner Standard HBs-Ag verwendet (Ausgangskonzentration 100 ng/50  $\mu\text{l}$ ). Es ergaben sich hieraus 1:1-Verdünnungsreihen von 3,1 ng/50  $\mu\text{l}$  bis 0,34 ng/50  $\mu\text{l}$  bzw. 0,024 ng/50  $\mu\text{l}$ . Der C20/2-Antikörper (gelagert in einer Konzentration von 1 mg/ ml in Glycerin 60% bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) wurde in Beschichtungspuffer gelöst. Es kam ein 1:1.000 Verdünnung des Antikörpers zum Einsatz. Zur Antikörperbeschichtung wurden 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung pro well der Mikrotiterplatte pipettiert und 12 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend zweimal mit 0,5% Tween20/ 1fach PBS und zweimal mit PBS gewaschen (ELISA Washer, TECAN SLT). Nun wurden 100  $\mu\text{l}$  10 %FKS in TNE-Puffer pro well eingefüllt und für zwei Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einem Schwenker inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben. Nun wurden 50  $\mu\text{l}$  der Proben aufgetragen und für 12 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die 96 well Platte wieder gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  antiHBs/POD Konjugat (1:100 verdünnt, also 55  $\mu\text{l}$  antiHBs/POD-Konjugat auf 5 ml PBS und 0,5 ml Casein 1%). Es wurde für zwei Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einer Schüttelplattform inkubiert. Nun wurde die 96 well Platte nochmals gewaschen und das OPD-Substrat für die Peroxidase zugegeben. Hiervon wurden 50  $\mu\text{l}$  pro well einpipettiert. Das Substrat wurde frisch angesetzt, indem eine Tablette in 5 ml einer Substratpufferlösung gelöst wurde. Das Substrat und die Probenplatte wurden zum Lichtschutz in Alufolie eingewickelt. Es erfolgte eine Inkubation über 10 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einer Schüttelplattform. Mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung wurde die Peroxidase-reaktion gestoppt. Die sich anschließende Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlängenbereich 620 nm) im LP-400-Messgerät.

## 8. Ergebnisse

Für die Medizinische Virologie Giessen war es Ziel, die Expression des HBV-Genoms möglichst empfindlich und zugleich quantitativ darzustellen. Es wurden deshalb zur Untersuchung der HBV-Transkriptionsrate in Zellsystemen verschiedene quantitative RT-PCRs zur mRNA Konzentrationsbestimmung entwickelt. Hier war sowohl die Bestimmung der Gesamt-mRNA Konzentration, als auch die Konzentration prägenomischer mRNA von Relevanz. Die Gesamt-mRNA Konzentration erlaubt eine generelle Aussage zur Genexpression des HBV. Die prägenomische RNA spielt aufgrund des Enkapsidationssignals  $\epsilon$  und des dadurch ausgelösten „assemblies“ in der Bildung neuer Viruspartikel und damit im Lebenszyklus des HBV eine wichtige Rolle. Die quantitative Bestimmung von HBV-mRNA sollte v.a. in transfizierten Leberzellkulturen und Leberbiopsien angewendet werden.

### 8.1 Herstellung von in vitro transkribierter HBV-RNA für Eichzwecke

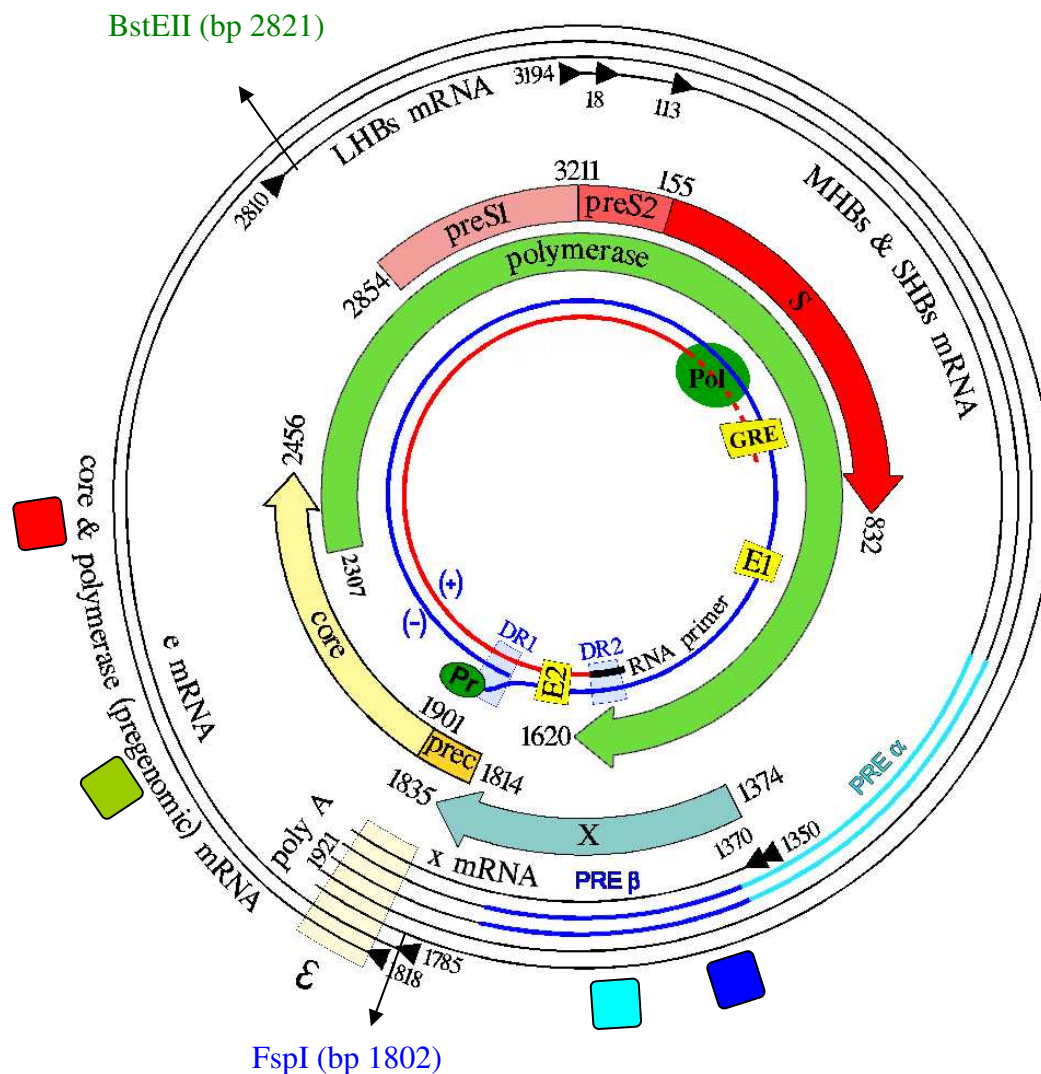
Zur Bestimmung der mRNA-Konzentration mittels RT-PCR wurden folgende RNA-Moleküle in vitro transkribiert:

X-RNA zur Bestimmung der Gesamt-RNA Konzentration

pg-RNA zur Bestimmung der prägenomischen und präC-mRNA Konzentration

Die X-RNA wurde aus dem pcX-Plasmid (siehe Materialien, Seite 29, Abschnitt 6.9) wie folgt erzeugt: das pcX-Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen FspI (schneidet das inklonierte HBV-Fragment bei Base 1802 sowie das pcDNA 3.1+ bei Base 2382 und 4746) und NdeI (schneidet pcDNA 3.1+ bei Base 485) verdaut. Es ergaben sich damit vier Fragmente mit einer Länge von 2364, 1426, 1185 und 830 Basen, wobei letzteres das benötigte Fragment darstellt (enthält die T7-Polymerase und das HBV-X-Gen). Das weitere Procedere ist unter Methoden dargestellt (Seite 37, Abschnitt 7.5).

Die Bildung der pg-RNA verlief prinzipiell gleich, jedoch wurde ein anderes Ausgangsplasmid sowie ein anderes Restriktionsenzym verwendet. Das Plasmid, welches zur Transkription aller anderen gebildeten RNAs benutzt wurde, ist pc1820-0-1984 (siehe Materialien, Seite 30, Abschnitt 6.9). Für die Bildung von pg-RNA wurde es mit BstEII linearisiert (Abb. 18)



	Primer	Name	Lokalisation
<b>Blau</b>	x-sense	HBV x2s	bp 1413-1436
<b>Türkis</b>	x-antisense	HBV x2as	bp 1579-1601
	Fluorescein	3FL-X	bp 1519-1543
	LC Red 640	5LC-X	bp 1545-1570
<b>Grün</b>	pg sense	pg2s	bp 2052-2073
<b>Rot</b>	pg antisense	pg2as	bp 2380-2400
	Fluorescein	pg3fl	bp 2309-2332
	LC Red 640	pg3lc640	bp 2335-2358

Abb. 18 Übersicht der verwendeten PCR Primer und Restriktionsenzyme. Dünne Pfeile markieren die Restriktionsenzymstimmstellen. Kleine Quadrate zeigen Primerlokalisierung an.

Die so entstandenen RNAs hatten folgende Längen und Massen (Abb. 19).

1. X-RNA      536B ( $3 \times 10^{-19}$  g)
2. pg-RNA    1070B ( $6 \times 10^{-19}$  g)

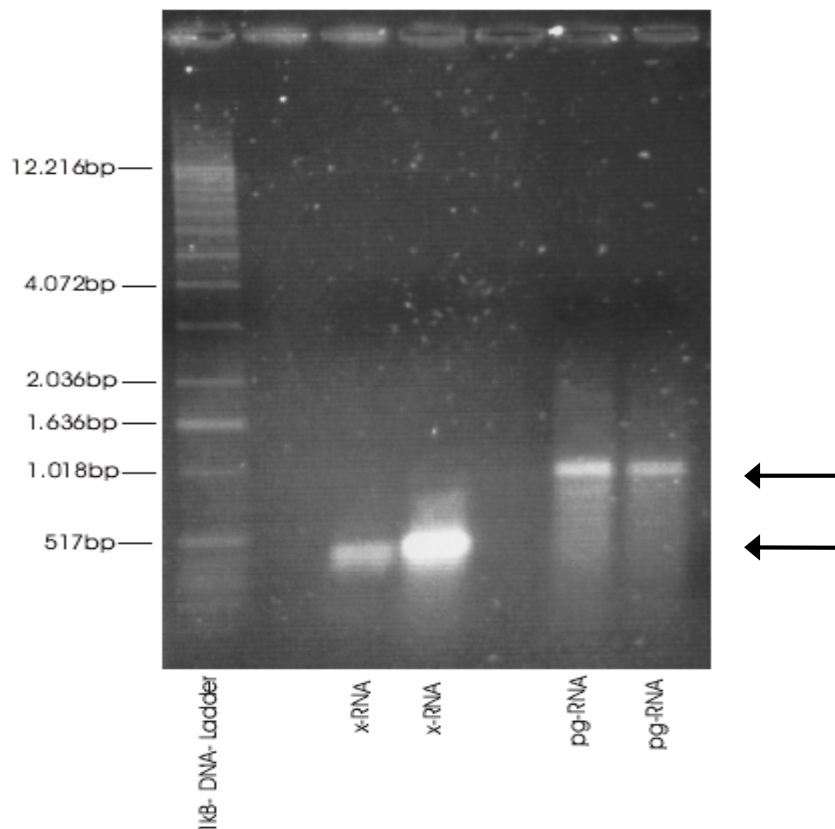


Abb. 19 RNA-Gelelektrophorese mit Darstellung der Eich-RNA. Auftragung aus unterschiedlichen Transkriptionsansätzen.

Um die Konzentration der einzelnen RNAs zu bestimmen, wurde eine fluorometrische Quantifizierung der gefärbten RNA-Banden im Typhoon 9200 Variable Mode Imager vorgenommen (siehe Methoden Seite 39, Abschnitt 7.7). Als Ausgangskonzentration zur Erstellung einer Standardkurve wurde die photometrisch bestimmte Konzentration einer hochreinen X-RNA verwendet (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> betrug 1,797). Die gewonnene Standardkurve ist in Abb. 20 dargestellt.

Aus den so gewonnenen Werten wurde die RNA-Kopienzahl pro  $\mu\text{l}$  durch Division der Konzentration (in  $\text{g}/\mu\text{l}$ ) durch die entsprechende RNA-Masse (in g) ermittelt. Anschließend wurde exakt berechnet, welche RNA-Molekül-Konzentration letztendlich pro LightCycler Reaktion enthalten war (siehe Methoden Seite 39-40, Abschnitt 7.5.7).

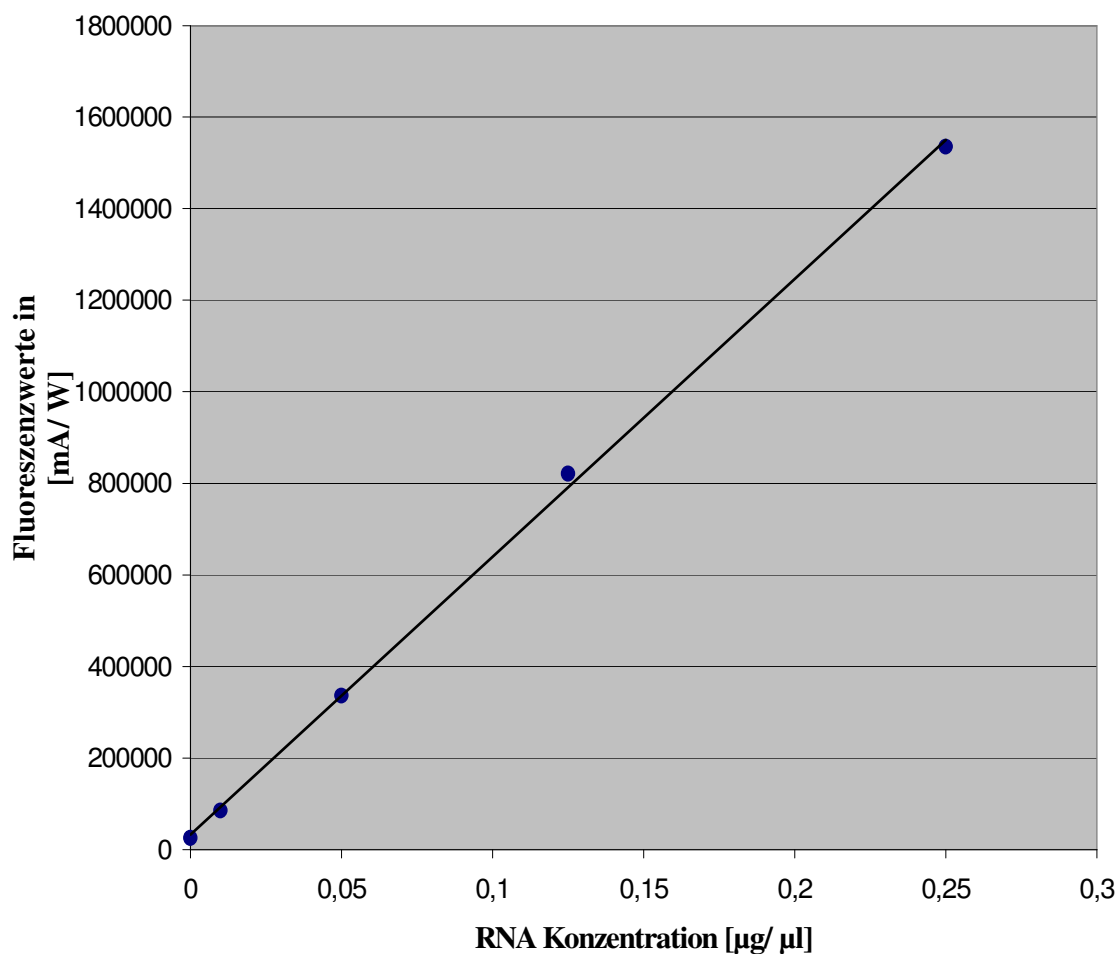


Abb. 20 Standardkurve zur Eich-RNA Quantifizierung am Typhoon9200 Variable Mode Imager.

## 8.2. Quantitative RT-PCR zum Nachweis von HBV-RNA

Die quantitative Messung von HBV-mRNA erfolgte am realtime PCR-Gerät LightCycler der Fa. Roche. Das Vorgehen ist auf Seite 43-45 im Detail dargestellt. Ziel war es, möglichst genaue Aussagen über die HBV-Produktion von Gesamt- und prägenomischer RNA zu erhalten. Das LightCycler Instrument berechnet anhand der vorgegebenen Konzentrationen des Eichstandards eine Regressionsgerade, mit deren Hilfe die Konzentration unbekannter Proben errechnet werden kann. In den Abb. 21 und 22 sind die Ergebnisse für die X-RT-PCR, in den Abb. 23 und 24 die Ergebnisse für die PG-RT-PCR dargestellt.

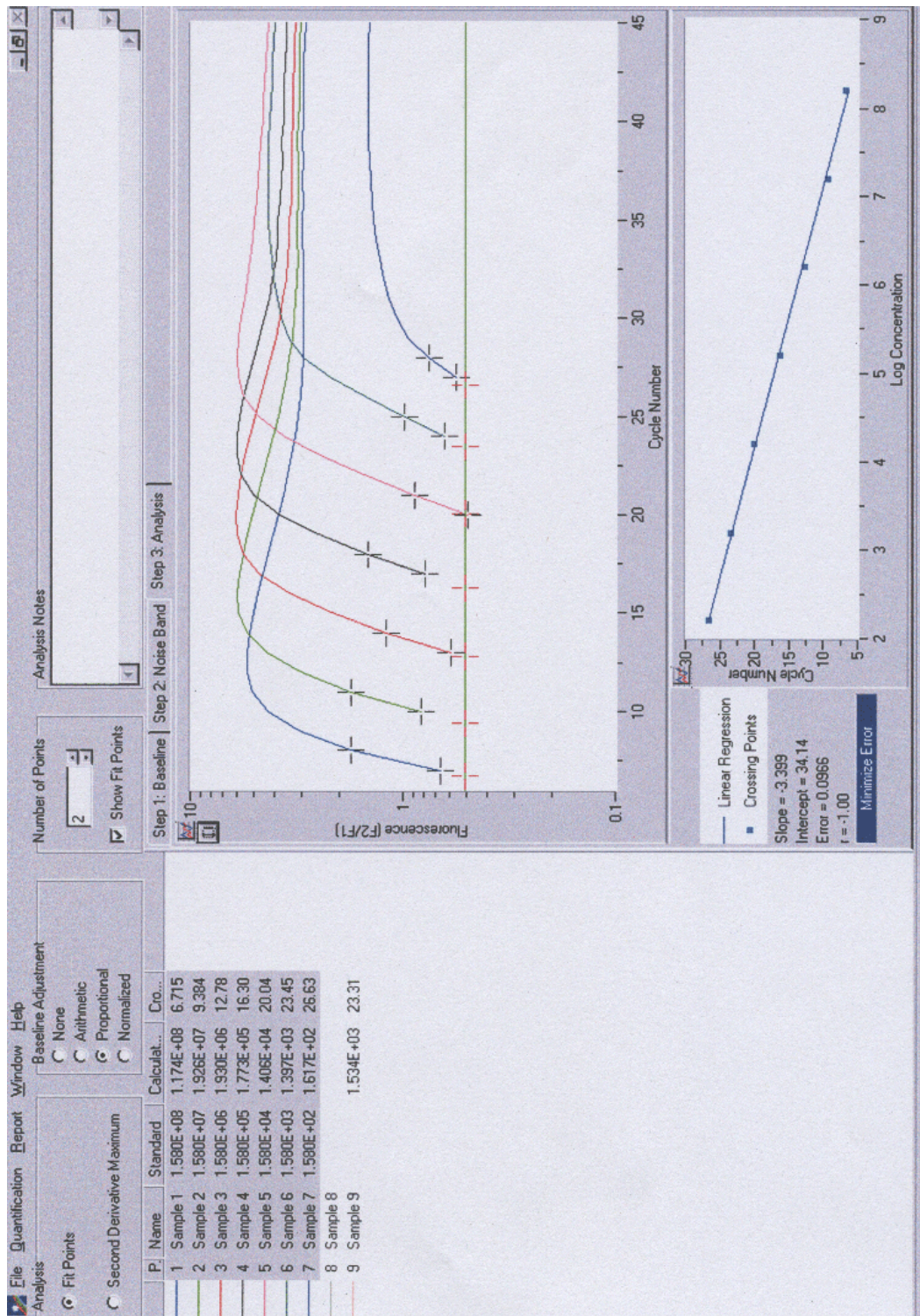


Abb. 21 Ergebnis der X RT-PCR am LightCycler Gerät. Sample 1-7 stellen die Proben der Eichkurve dar. Sample 8 ist eine Negativ-, Sample 9 eine Positivprobe. Im rechten oberen Feld ist der Fluorenzverlauf in Abhängigkeit der Zykluszahl dargestellt, im rechten unteren Feld die errechnete Regressionsgerade.

Im Anschluss an die X-RT-PCR wurde das PCR-Produkt im Agarosegel zur Analyse elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels EtBr-Färbung sichtbar gemacht (Abb. 22).

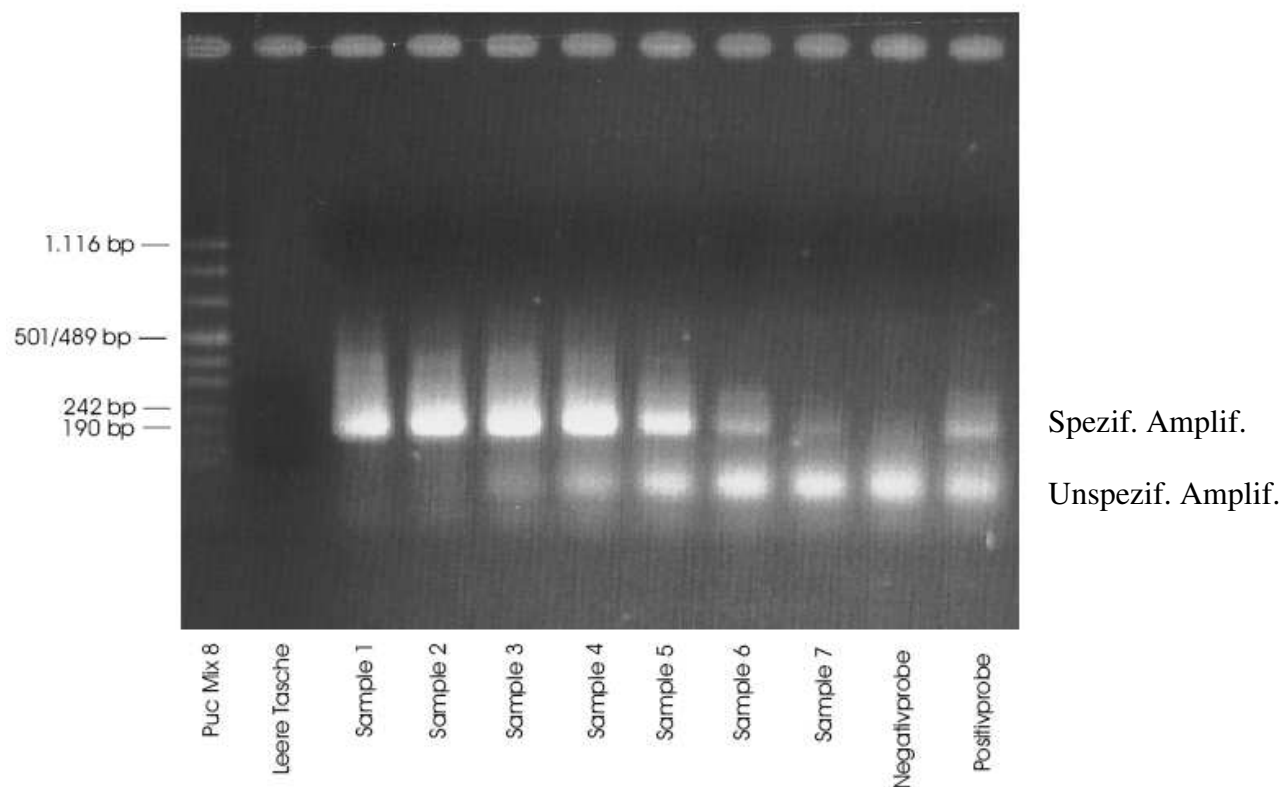


Abb. 22. 2%iges Agarosegel der oben aufgeführten X RT-PCR (Abb. 21), Amplikonlänge 188 bp

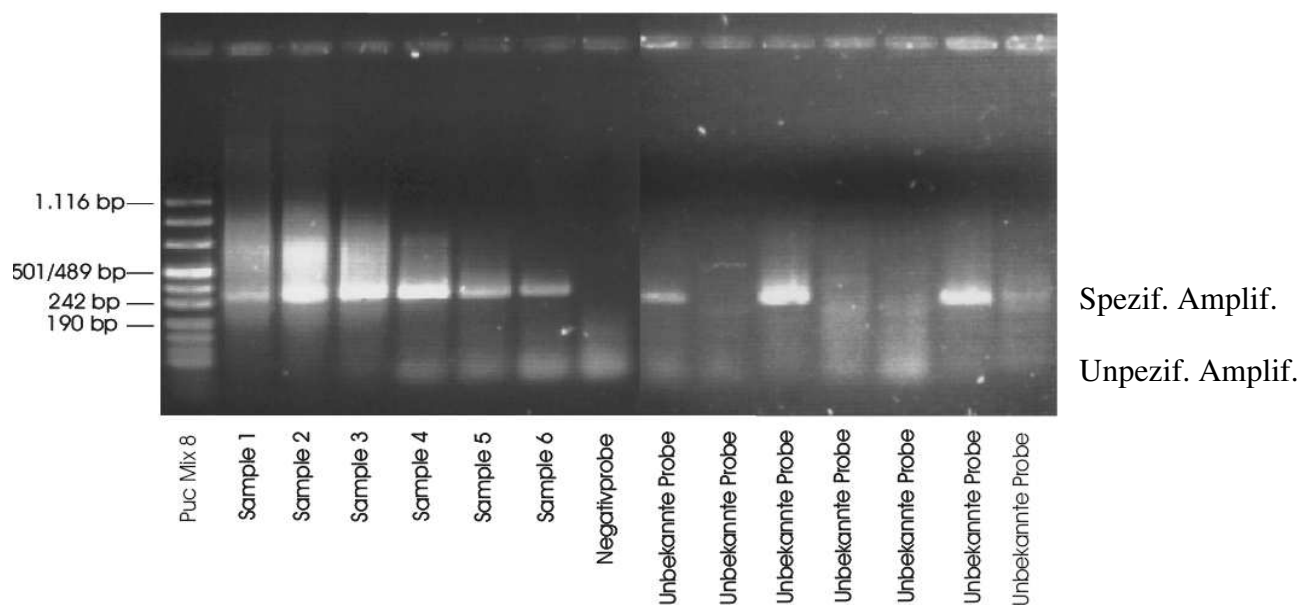


Abb. 23 2%iges Agarosegel der unten aufgeführten PG RT-PCR (Abb. 24)



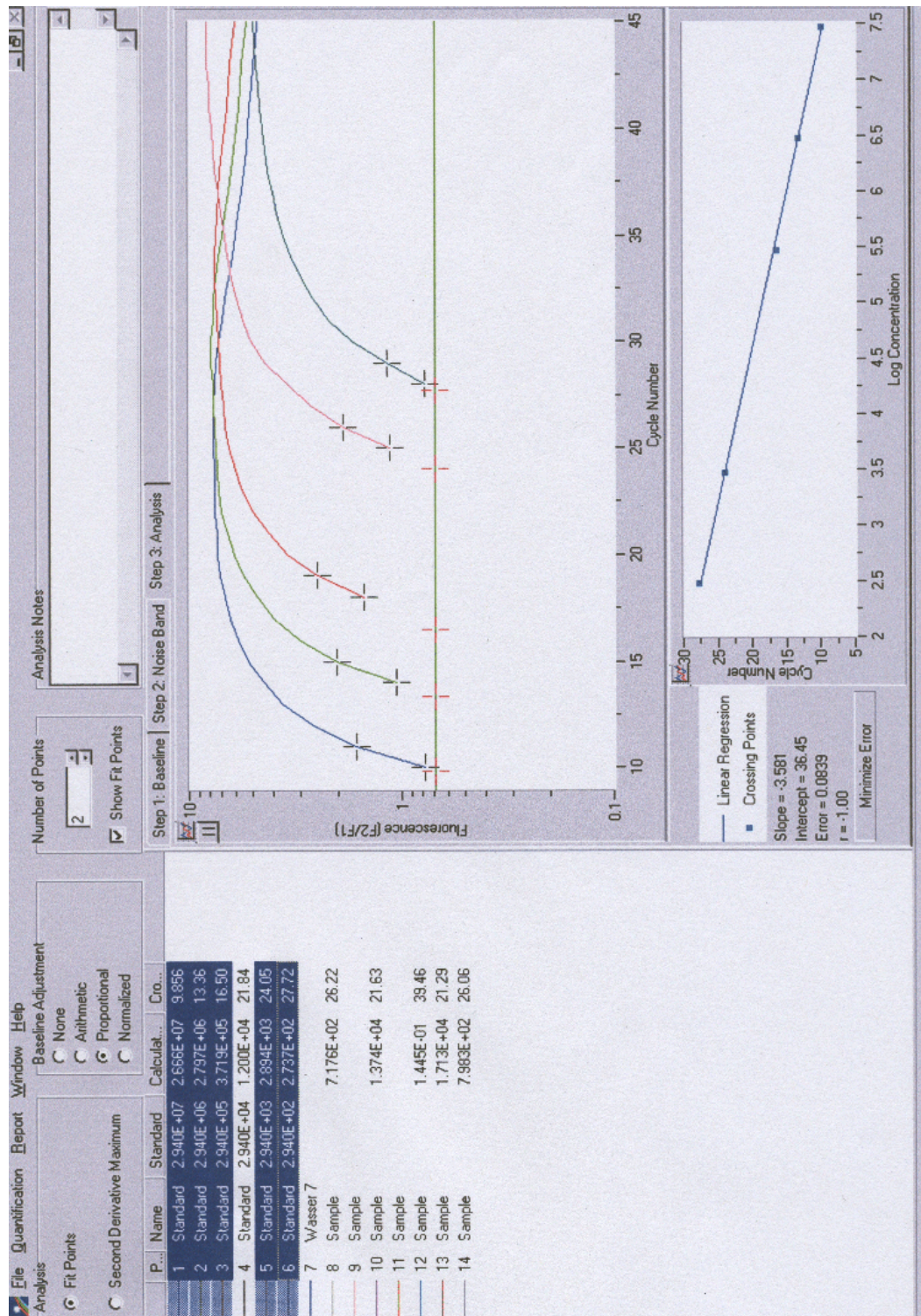


Abb. 24 Ergebnis der PG RT-PCR am LightCycler Gerät. Sample 1-6 stellen die Proben der Eichkurve dar. Sample 4 wurde als Messfehler aus der Bewertung genommen. Sample 7 ist eine Negativ-, Sample 8-14 Messwerte unbekannter Proben.

### 8.3 Quantifizierung von HBV-Oberflächenproteinen aus Zellüberständen

Neben der Quantifizierung der HBV-mRNA war auch die exakte Bestimmung der Produktion von HBV-Oberflächenproteinen aus Zellüberständen Ziel dieser Arbeit. Als Bestimmungsmethode fand der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) Anwendung. Das experimentelle Vorgehen wird unter Methoden, Seite 48, Abschnitt 7.13 ausführlich beschrieben. Als Standard diente laboreigenes gereinigtes HBsAg in einer Ausgangskonzentration von 100 ng/50 µl. Es wurde hieraus eine 1:1-Verdünnungsreihe hergestellt, die zur Erstellung einer Eichkurve diente. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlängenbereich 620 nm) im LP-400-Messgerät. Abb. 25 zeigt die Standardkurve zur Berechnung der HBsAg Konzentration aus Zellüberständen.

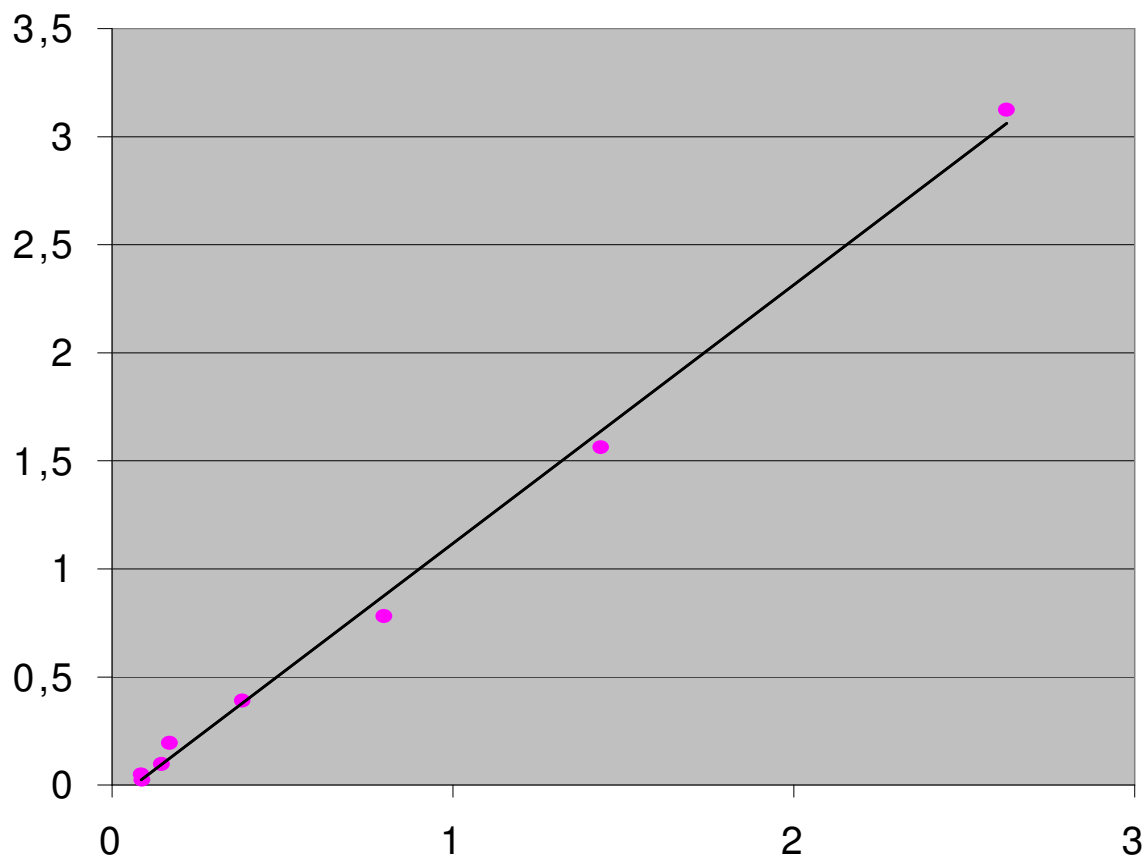


Abb. 25 Eichkurve aus HBsAg Standard zur Konzentrationsbestimmung von HBV-Oberflächenproteinbestimmung. Y-Achse: Konzentration in ng/50 µl, X-Achse: Messwerte in OD<sub>620</sub>, Geradengleichung:  $y=1,1968x-0,0784$

## **8.4 Vergleich der mRNA-Konzentration zwischen stabil und transient transfizierten Zelllinien unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen**

Ziel dieses Teiles der Arbeit war es, die Unterschiede bezüglich der HBV-mRNA Konzentration zwischen stabil und transient transfizierten Zellen darzustellen. Es sollten außerdem die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener Zellkulturbedingungen auf die HBV-mRNA Konzentration dargestellt werden. Beide Aspekte sollen verdeutlichen, in welchem Ausmaß die HBV-mRNA Konzentration von verschiedensten im Experiment vorgegebenen Bedingungen abhängig ist.

Als klassischer Vertreter einer mit HBV stabil transfizierten Zelllinie wurde die HepG2.2.15-Zelle gewählt. Das Pendant waren transient transfizierte HepG2-Zellen. Zwischen beiden Zellsystemen bestehen folgende Unterschiede:

Die HepG2.2.15-Zellen enthalten ein über retrovirale LTR (aus Moloney Mouse Leukaemia Virus) integriertes HBV-Tetramer, welches unter Kontrolle zellulärer Promotoren steht. In den transfizierten HepG2-Zellen findet sich wie bei einer natürlichen Infektion das transfizierte Plasmid pBs991 T7-Dimer episomal und die Transkription steht unter Kontrolle HBV-eigener Promotoren. Damit entspricht letzteres Versuchssystem eher einer natürlichen Infektion. Beide Zellsysteme wurden mit unterschiedlichen Genotypen transfiziert. Die RNA-Produktion des in den HepG2.2.15-Zellen enthaltenen Genotyps D Dimers (Subtyp ayw; U95551) wurde mit dem Genotyp A2 Dimer (Subtyp adw2; X51970) des transfizierten pBs991Dimer T7-Plasmids verglichen. Die transiente Transfektion der HepG2-Zellen erfolgte wie unter Methoden (Seite 41, Abschnitt 7.9.1) beschrieben.

Um vergleichbare Untersuchungsbedingungen zu schaffen, wurde folgende Überlegung angestellt. Da sich im Vergleich zu den stabil infizierten HepG2.2.15 Zellen bei der transienten Infektion nur ein Teil der Zellen transfizieren ließ, wurde die Transfektionseffizienz berechnet. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit dem peGFP2-Plasmid transfiziert, welches ein fluoreszierendes Protein kodiert. Durch Auszählen mehrerer Gesichtsfelder unter dem Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop wurde ein gemittelter Quotient zwischen transfizierter Zellzahl und Gesamtzellzahl gebildet. Die Auszählung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Es ergab sich für die HepG2-Zellen eine Transfektionseffizienz von 40%. Unter der Annahme, dass 100% der HepG2.2.15-Zellen HBV-DNA integriert haben, wurden alle

Originalmesswerte der mRNA und HBs-Ag Produktion in HepG2.2.15-Zellen mit einem Faktor von 0,4 multipliziert.

Unter Medium mit 10 % FKS und auf kollagenisierten wells ergaben sich folgende Ergebnisse drei Tage nach Transfektion (siehe Abb. 26).

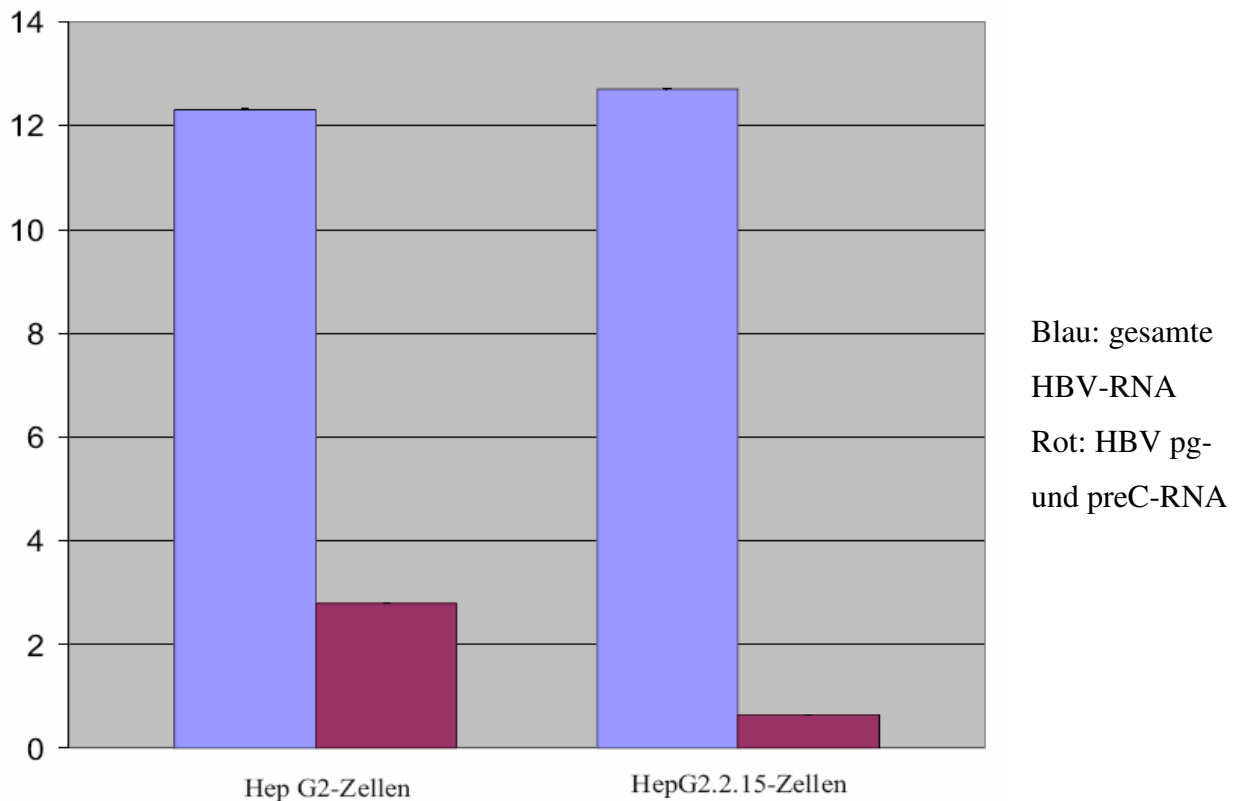


Abb. 26 Vergleich der mRNA-Konzentration zwischen stabil und transient transfizierten Zellen. 10% FKS, Kollagen. Y-Achse: HBV mRNA in  $10^5$  / 2000 Zellen

Es zeigte sich hinsichtlich der Gesamtmenge an HBV-mRNA zwischen HepG2.2.15- und HepG2-Zellen kein signifikanter Unterschied. Allerdings war die relativ höhere Transkription von prägenomischer RNA bei den transient transfizierten Zellen auffällig. Hinsichtlich des pg/Gesamt RNA-Verhältnisses fand sich ein Unterschied von Faktor 4,5 gegenüber den stabil transfizierten HepG2.2.15-Zellen (Abb. 27). HepG2- und HepG2.2.15-Zellen exprimierten also ungefähr gleiche Mengen an Gesamt-HBV-mRNA, jedoch fiel bei den transient transfizierten Zellen ein höherer Anteil an prägenomischer HBV-mRNA auf.

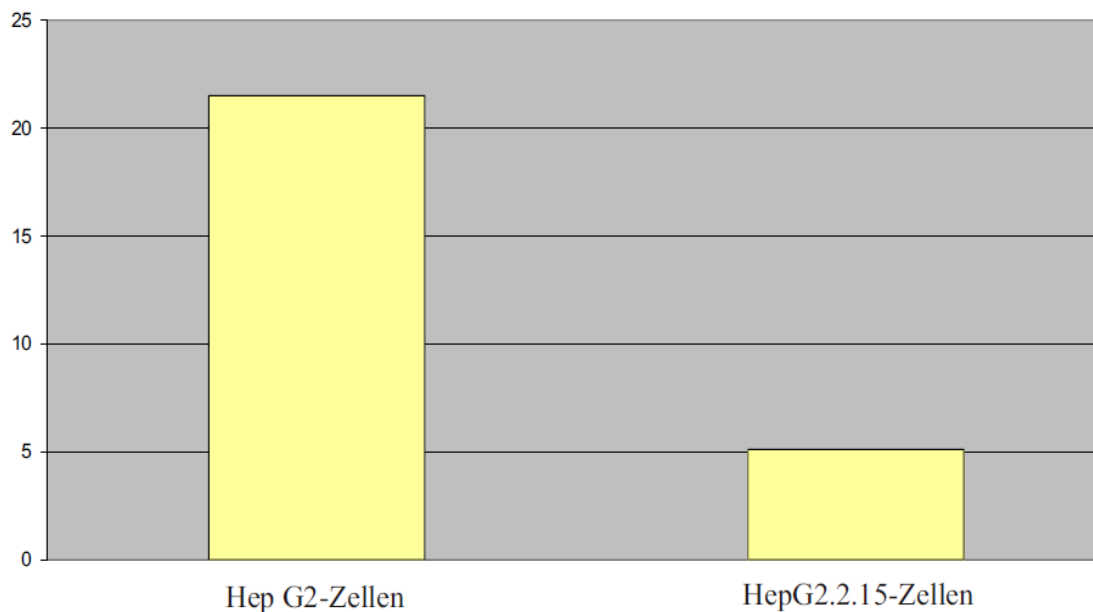


Abb. 27 pg/Gesamt-mRNA Verhältnis des HBV im Vergleich zwischen stabil und transient transfizierten Zellen. Y-Achse: prozentualer Anteil der pg-mRNA an Gesamt-mRNA

Die oben gemachten Angaben beziehen sich auf Zellen, die auf Kollagen und unter dem Einfluss von FKS wuchsen. Im folgenden wurde der Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf die HBV-Transkription stabil und transient transfizierter Zellen näher beleuchtet.

In Abb. 28 ist die HBV-Gesamt-mRNA Produktion, in Abb. 29 die HBV-pg-RNA Produktion drei Tage nach Transfektion aufgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen konfluent und wiesen kein Zellwachstum mehr auf. Hinsichtlich der HBV-Gesamt-mRNA Produktion zeigten sich bei den stabil transfizierten HepG2.2.15-Zellen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen Schwankungen von bis zu Faktor 2,0. Bei den transient transfizierten HepG2-Zellen war diese Schwankungsbreite wesentlich höher. Sie lag bei einem Faktor von bis zu 18,6. Die transient transfizierten Zellen sind durch verschiedene Zellkulturbedingungen wesentlich stärker beeinflussbar als die stabil transfizierten Zellen.

Alle folgenden Unterschiede beziehen sich auf den Vergleich mit der Leerprobe ohne Zusätze.

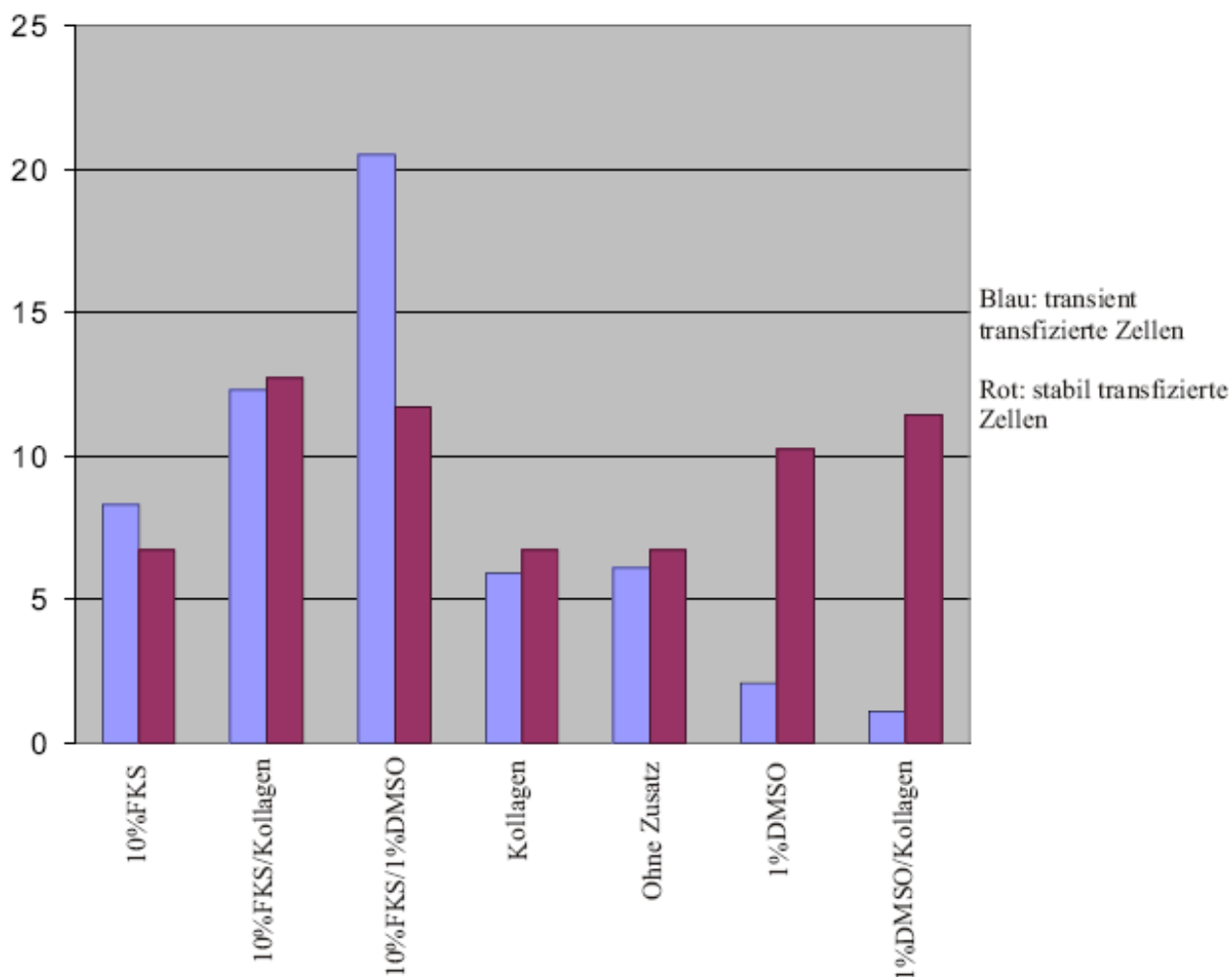


Abb. 28 Vergleich der HBV-Gesamt-mRNA Produktion unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen bei stabil und transient transfizierten Zellen. Y-Achse: HBV mRNA in  $10^5$  / 2000 Zellen, X-Achse: Zellkulturparameter

Das DMSO wies einen suppressiven Effekt auf die HBV-Gesamt-mRNA Produktion in transient transfizierten Zellen auf. Es fand sich ein Unterschied von Faktor 2,9 unter 1% DMSO bzw. von Faktor 5,5 unter 1% DMSO und Kollagen. Interessanterweise fand man diesen Effekt nicht unter gleichzeitigem Einfluss von 10% FKS/1% DMSO. Hier zeigte sich sogar eine Steigerung der HBV-Gesamt-mRNA Produktion von Faktor 3,3. Man kann aber zumindest folgern, dass unter gleichzeitigem Einfluss von 10% FKS und 1% DMSO der inhibitorische Effekt des DMSO auf die HBV-Gesamt-mRNA Produktion aufgehoben wurde. Bei transient transfizierten Zellen fiel zudem auf, dass unter FKS die höchsten HBV-Gesamt-mRNA Konzentrationen erreicht werden. Ohne fötales Kälberserum fiel die RNA-Produktion

deutlich ab. In den stabil transfizierten HepG2.2.15-Zellen fand sich eine Steigerung der HBV-Gesamt-mRNA Produktion unter 1% DMSO-Einfluss gegenüber den transient transfizierten HepG2-Zellen. Während bei letzteren das DMSO suppressiv auf die HBV-Gesamt-mRNA Produktion wirkte, führte es bei den stabil transfizierten Zellen zu einer vergleichsweise starken Transkriptionssteigerung.

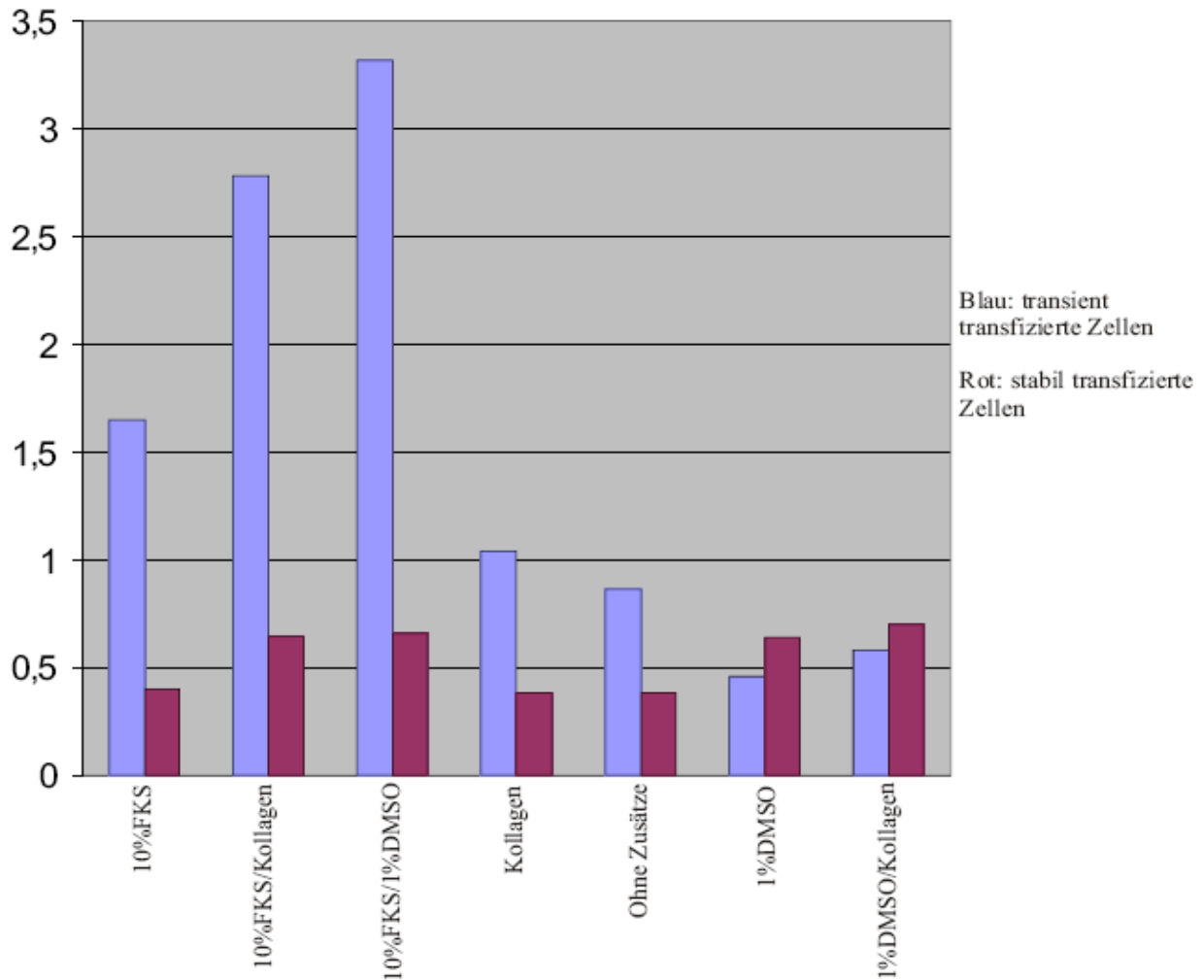


Abb. 29 Vergleich der HBV-pg-RNA Produktion unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen bei stabil und transient transfizierten Zellen. Y-Achse: HBV mRNA in  $10^5$  / 2000 Zellen , X-Achse: Zellkulturparameter

Hinsichtlich der HBV-pg-RNA Produktion in transient transfizierten Zellen fiel der ausgeprägte Effekt von 10% FKS ins Auge. Es fanden sich Steigerungen der HBV-pg-RNA Konzentration von 1,9 unter 10% FKS bis 3,8 unter 10% FKS/1% DMSO, jeweils verglichen mit dem Ansatz ohne Mediumzusätze. In Abwesenheit von FKS wies DMSO einen suppressiven Effekt auf die HBV-pg-RNA Produktion in transient transfizierten Zellen auf (Faktor 1,9

unter 1% DMSO, Faktor 1,5 unter 1% DMSO/Kollagen). Unter 10% FKS fand sich wie bei der HBV-Gesamt-mRNA Produktion ein starker Anstieg der HBV-pg-RNA Transkription, obwohl 1% DMSO ohne 10% FKS den oben genannten suppressiven Effekt auf die HBV-pg-RNA Transkription zeigte. In stabil transfizierten Zellen zeigten eine weitestgehende Konstanz der HBV-pg-RNA Produktion unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen. Die Werte unterschieden sich um maximal Faktor 1,7.

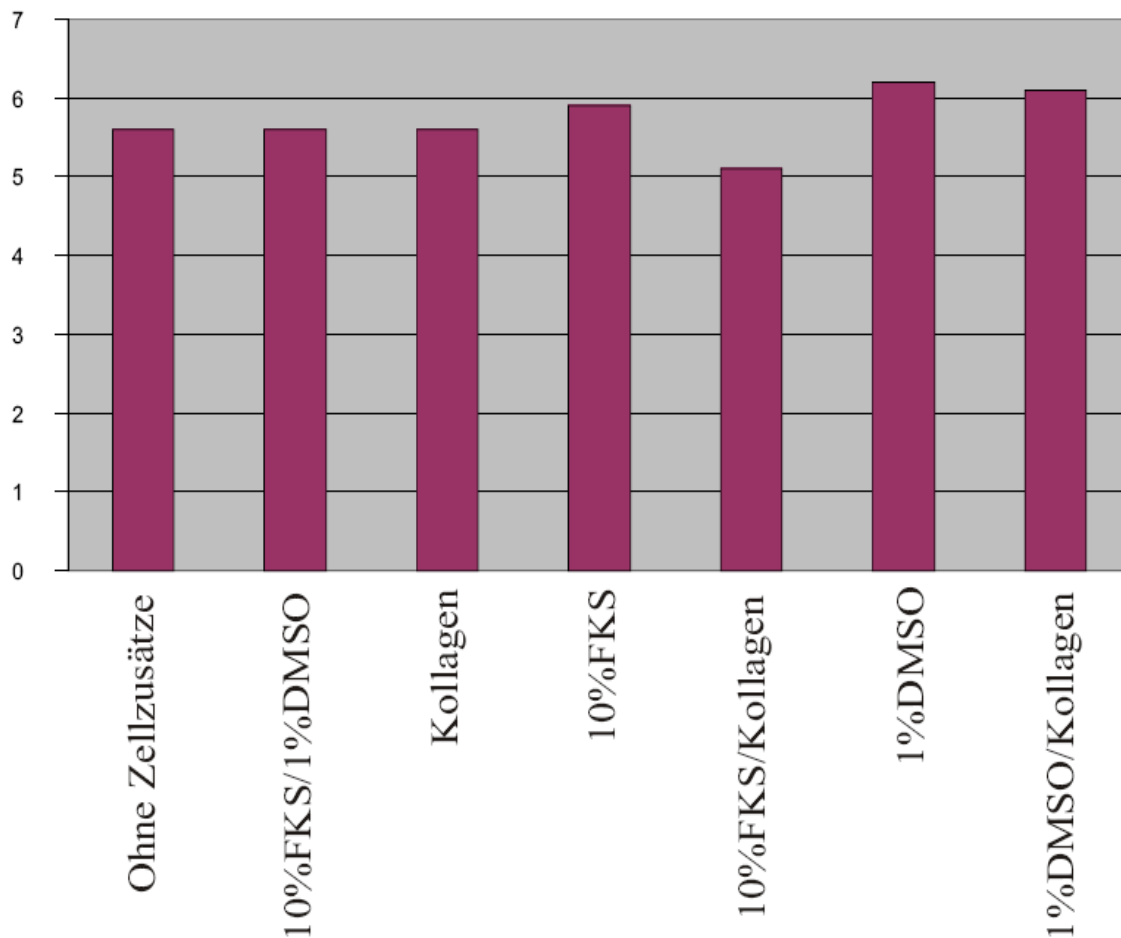


Abb. 30 Prozentualer Anteil von HBV-pg-RNA an HBV-Gesamt-mRNA unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen in stabil transfizierten Zellen. Y-Achse: HBV-pg/Gesamt-mRNA Anteil in Prozent

Die Abbildungen 30 und 31 zeigen den prozentualen Anteil der HBV-pg-RNA Produktion an der HBV-Gesamt-mRNA Produktion in stabil bzw. transient transfizierten Zellen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen.



Bezogen auf das HBV-pg/Gesamt-mRNA Verhältnis fiel der viel größere prozentuale Anteil an HBV-pg-RNA Produktion der transient transfizierten Zellen auf. Gegenüber den stabil transfizierten Zellen war er um bis zu Faktor 5,5 größer. Auch absolut gesehen zeigten die transient transfizierten Zellen eine höhere HBV-pg-RNA-Produktion zumindest unter 10% FKS-Einfluss (Unterschiede von bis zu Faktor 1,75). Hinsichtlich des HBV-pg/Gesamt-mRNA Verhältnisses war offensichtlich, dass dieses bei den HepG2-2.15 Zellen weniger variierte (Unterschiede von maximal Faktor 1,2 im Gegensatz zu Faktor 2 bei den transient transfizierten HepG2-Zellen).

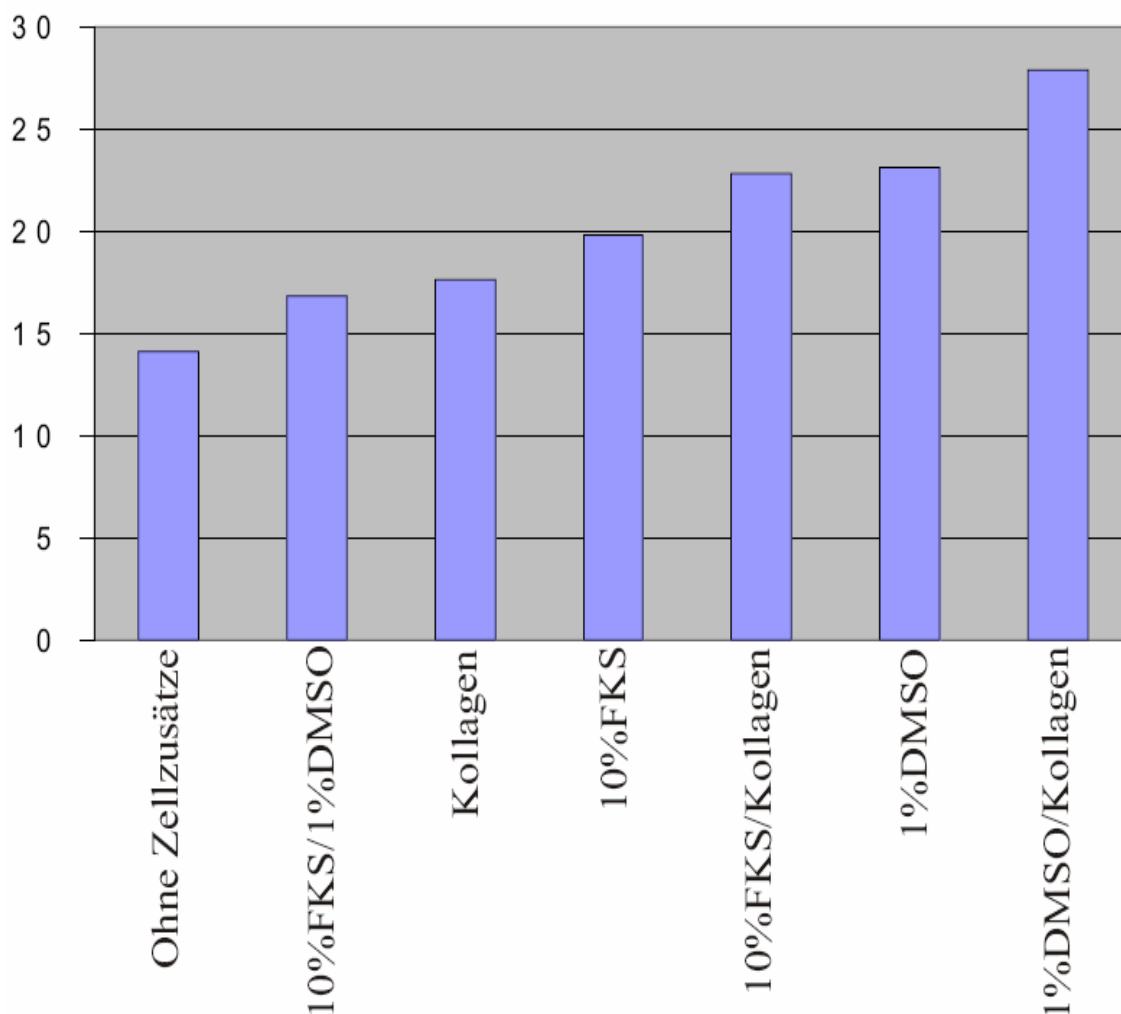


Abb. 31 Prozentualer Anteil von HBV-pg-RNA an HBV-Gesamt-mRNA unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen in transient transfizierten Zellen. Y-Achse: HBV-pg/Gesamt-mRNA Anteil in Prozent, X-Achse: Zellkulturparameter

---

Bei transienter Transfektion fanden sich unter Einfluss von 1% DMSO die prozentual größten Mengen an HBV-pg-RNA. Der Effekt von 1% DMSO wurde sowohl in stabil als auch in transient transfizierten Zellen durch 10% FKS wieder aufgehoben.

### **8.5 Vergleich der HBsAg-Konzentration aus Zellüberständen zwischen stabil und transient transfizierten Zelllinien unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen**

Neben der Quantifizierung der HBV-Gesamt-mRNA und prägenomischer RNA erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der sekretierten Oberflächenproteine des HBV als subvirale Partikel und Viren aus den jeweiligen Zellüberständen mittels ELISA. Hierbei wurde der Antikörper C20/2 verwendet, der die a-Determinante aller drei Oberflächenproteine detektiert. Ziel war es, neben den oben aufgeführten Effekten auf Transkriptionsebene auch Auswirkungen auf Ebene der HBV-Translation zu untersuchen.

Es ergaben sich folgende Unterschiede zwischen den stabil transfizierten HepG2.2.15 und den transient transfizierten HepG2 (siehe Abb. 32 und 33). Die Konzentrationen des HBsAg in den Zellüberständen der stabil transfizierten Zellen schwankten um den Faktor 2,6. Im Mittel wurde etwas weniger HBsAg produziert als bei den transient transfizierten Zellen (Faktor 1,7). Unter 10% FKS/1% DMSO fand man in stabil transfizierten Zellen die niedrigsten HBsAg-Konzentrationen, unter Kollagen die höchsten. 1%iges DMSO zeigte in stabil transfizierten Zellen keinen Effekt auf die HBsAg Produktion. In transient transfizierten Zellen wirkte es suppressiv (maximal Faktor 2,8). Ausnahme hiervon war allerdings die Kombination von 10% FKS und 1% DMSO. Sie senkte in stabil transfizierten Zellen die HBsAg-Produktion um Faktor 2,2 gegenüber der Probe ohne Zusätze. Das HBV-pg/Gesamt-mRNA Verhältnis der Kombination 10% FKS/1% DMSO war demgegenüber mit der Probe ohne Zusätze identisch. Die HBsAg Produktion in stabil transfizierten Zellen unter 10% FKS stellte sich wiederum gegensätzlich zu den transient transfizierten Zellen dar. In stabil transfizierten Zellen wies 10% FKS einen tendenziell suppressiven Effekt auf die HBsAg-Produktion auf (Faktor 1,4). Die HBsAg-Konzentrationen der transient transfizierten HepG2 Zellen wiesen mit Faktor 4,9 eine stärkere Schwankungsbreite auf. Hier fanden sich wie schon erwähnt unter 10% FKS die höchsten HBsAg-Konzentrationen und unter 1% DMSO die niedrigsten.

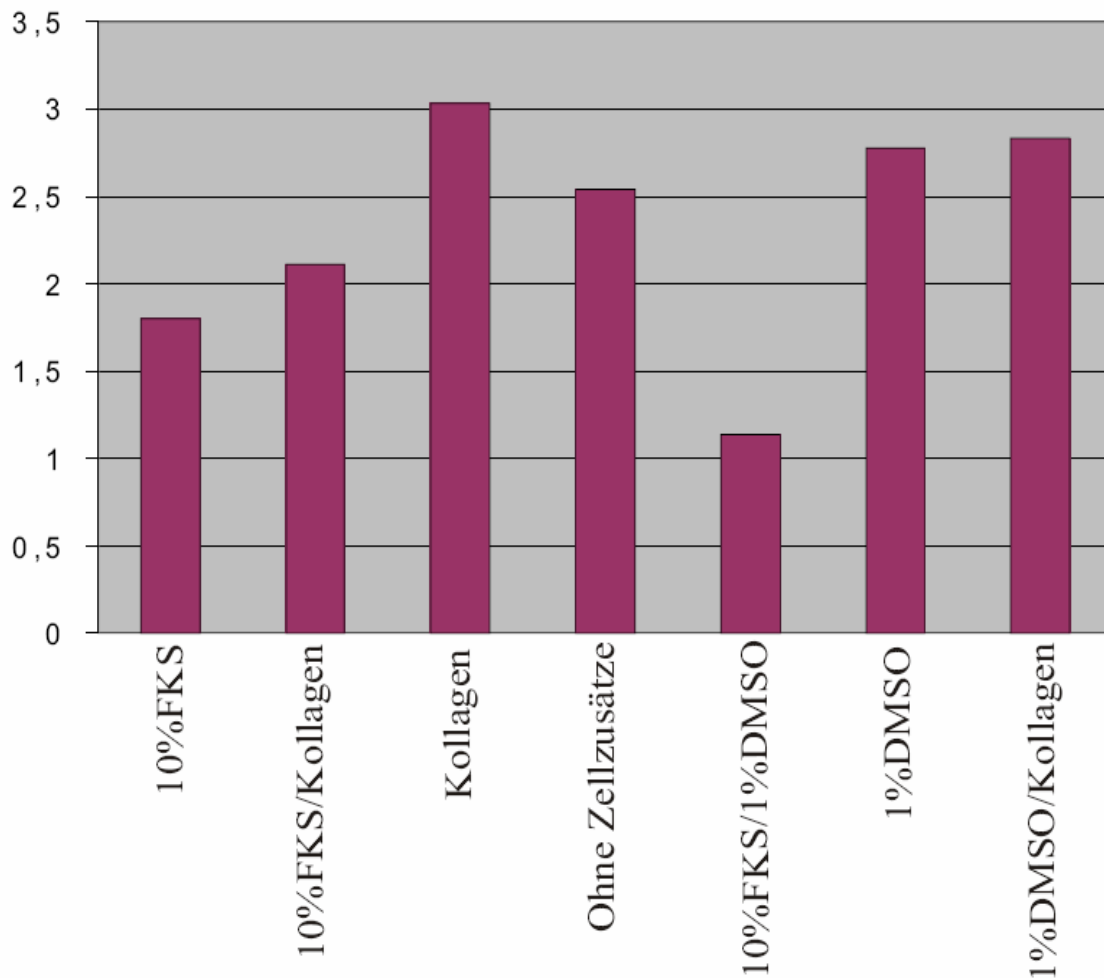


Abb. 32 Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die HBsAg-Produktion in stabil transfizierten Zellen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen. Y-Achse: HBsAg-Konzentration in ng/ ml im Zellüberstand.

Die stärkere Variation der HBsAg-Konzentration der transient transfizierten Zellen unter verschiedenen Zellkulturbedingungen korrelierte mit den ebenso variablen HBV-mRNA-Konzentrationen und insbesondere mit den HBV-pg/Gesamt-mRNA Verhältnissen. Hierbei fiel auf, dass die transient transfizierten Zellen unter Einfluss von 1% DMSO einen sehr hohen prozentualen Anteil von HBV-pg-RNA aufwiesen und gleichzeitig eine relativ geringe HBsAg-Produktion. Auch unter gleichzeitigem Einfluss von 10% FKS war dies der Fall. Gegenüber der Leerprobe zeigte 10% FKS eine Steigerung der HBsAg-Produktion in transient transfizierten Zellen von maximal Faktor 1,7. Gleichzeitig steigerte der Zusatz von 10% FKS das HBV-pg/Gesamt-mRNA-Verhältnis um maximal Faktor 1,6. In der HBsAg-Produktion unter verschiedenen Bedingungen verhielten sich also die stabil und transient

transfizierte Zellen oft gegensätzlich. Ausnahme war der gleichsinnige Effekt von 10% FKS und 1% DMSO, welches in beiden Fällen inhibitorisch wirkte.

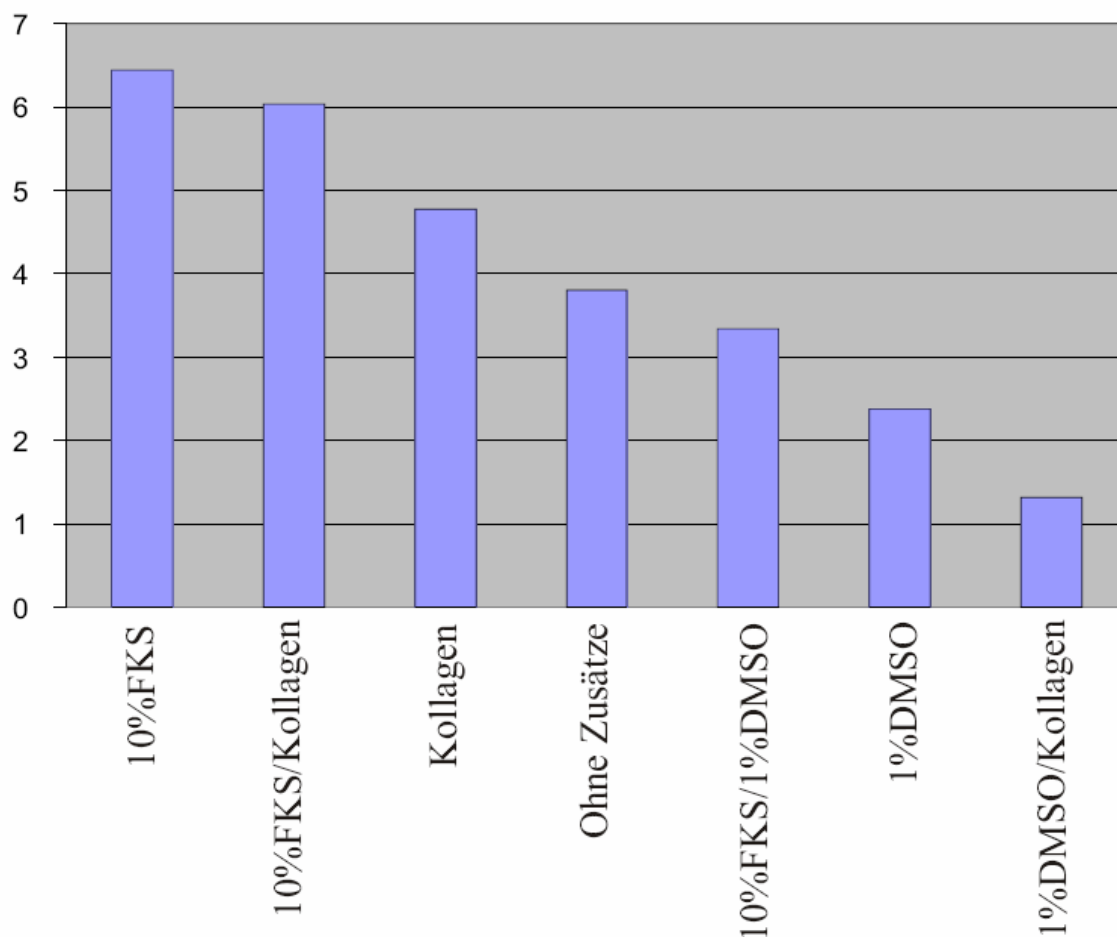


Abb. 33 Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die HBsAg-Produktion in transient transfizierten Zellen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen. Y-Achse: HBsAg-Konzentration in ng/ ml bezogen auf Zellüberstand.

## 8.6 HBV mRNA-Produktion in humaner Leber

Im folgenden soll die HBV mRNA-Produktion in humanem Lebergewebe untersucht werden. Hierzu standen insgesamt sieben Leberbiopsien zur Verfügung. Es handelte sich dabei teils um laparoskopische Zangenbiopsien, teils um Leberstanzbiopsien (jeweils ca. 1mm<sup>3</sup>). Die Proben wurden von Prof. Böcher, Mainz bereitgestellt. Die Patientendaten zu den Leberproben sind in Abb. 34 näher dargestellt.

Proben-Nr.	HBeAg	HBsAg	GPT	Serum-PCR	ccc-DNA	Histologie
1	pos.	pos.	unbek.	$4,0 \times 10^7$	$2,29 \times 10^4$	CAH
2	neg.	pos.	45	$2,4 \times 10^3$	Negativ	ASC
3	neg.	pos.	166	$1,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$	CAH
4	neg.	neg.	42	Negativ	Negativ	HCV-Infektion
5	pos.	pos.	198	$1,3 \times 10^5$	$5 \times 10^0$	CAH
6	pos.	pos.	294	$7,7 \times 10^6$	$2,45 \times 10^4$	CAH
7	neg.	pos.	unbek.	$4,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^2$	CAH

Abb. 34 Tabellarische Darstellung der untersuchten Leberproben. CAH= chronische aktive Hepatitis, ASC= asymptomatischer carrier, GPT in U/ l, Serum-PCR als Angabe von Kopien pro ml, ccc-DNA-Bestimmung in Kopien pro mg Lebergewebe durch M. Aliakbari, Inauguraldissertation, Fachbereich Humanmedizin, 2007, Gießen

Zur Probe 7 (Genotyp D) zu bemerken, dass hier eine typische Lamivudinresistenz (L180M sowie M204V im YMDD-Motiv) vorlag. Hinzu kommen außerdem die Mutationen Q101R, S167L, T189I, I195M, L205V, Y206H, I208T, V214A, so dass eine Resistenz auch gegen Tenofovir und Entecavir vorliegt. Aus den Leberbiopsien wurde die HBV-Gesamt- sowie prägenomische mRNA-Konzentration bestimmt. Hieraus wurde wiederum das HBV-pg/Gesamt RNA-Verhältnis gebildet. Da verschieden große Gewebeproben vorlagen und anzunehmen ist, dass je nach Gewebezustand unterschiedlich viele Zellen lysiert wurden, ist eine Standardisierung wie folgt durchgeführt worden. Nach Zelllyse wurde die mRNA mit Oligo(dT) Dynabeads isoliert. Aus dem restlichen Lysat wurde die Gesamt-DNA Menge, also auch die chromosomale DNA der Leberzellen, photometrisch bestimmt. Die Isolation erfolgte mittels einer modifizierten Phenol/ Chloroform-Extraktion (siehe Methoden Seite 41, Abschnitt 7.8). Es fanden sich dabei unterschiedliche DNA-Konzentrationen in den verschiedenen Leberproben. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 aufgeführt.

Proben -Nr.	Ges.-DNA in $\mu\text{g}$	Ges.-RNA (unkorr.)	Ges.-RNA (korr.)	pg-RNA (unkorr.)	pg-RNA (korr.)	pg/Gesamt RNA-Ratio
1	1,76	$2,94 \times 10^3$	$1,67 \times 10^3$	$7,18 \times 10^2$	$4,08 \times 10^2$	0,24
2	5,09	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	
3	4,70	$5,98 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4$	$1,37 \times 10^4$	$2,91 \times 10^3$	0,23
4	8,90	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	
5	2,59	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	
6	4,61	$6,73 \times 10^4$	$1,46 \times 10^4$	$1,71 \times 10^4$	$3,71 \times 10^3$	0,25
7	2,14	$1,67 \times 10^5$	$7,79 \times 10^4$	$7,98 \times 10^2$	$3,72 \times 10^2$	0,005

Abb. 35 Darstellung der HBV-Gesamt-mRNA (=Ges.-RNA) und der prägenomischen HBV-RNA (=pg-RNA) in Abhängigkeit von der isolierten Gesamt-DNA aus den Leberproben (=Ges.-DNA). Um nun die in der RT-PCR gewonnenen mRNA-Konzentrationen zu standardisieren, wurden die ermittelten Werte durch die Gesamt-DNA Menge (in  $\mu\text{g}$ ) der jeweiligen Leberbiopsie dividiert.

Betrachtet man die Ergebnisse näher, so stellt man zunächst fest, dass die Probe 4, die im Serum keine HBV-Parameter zeigte, auch keinen positiven HBV-mRNA-Nachweis aus Leberzellen erbrachte und somit als Negativkontrolle zu betrachten ist. Eine mögliche Fehlmessung könnte bei Probe 5 vorliegen. Trotz des Nachweises von  $1,3 \times 10^5$  Kopien HBV-DNA pro ml im Serum blieb die RT-PCR auf HBV-mRNA in der Leber negativ. Dies könnte bei der Höhe der Viruslast auf einen Verlust der mRNA während Präparation zurückführen oder durch die begrenzte Nachweisempfindlichkeit verursacht sein. In Probe zwei fand sich bei einer Viruslast von  $2,4 \times 10^3$  zwar ein erkennbarer Anstieg der Fluoreszenz im Verlauf der RT-PCR, jedoch blieb dieser unter der Nachweisgrenze und musste daher aus der Bewertung ausgeschlossen werden. Verwertbare Ergebnisse lieferten also die Proben 1, 3, 4, 6 und 7.

### 8.7 Auswirkungen von HCV-Core und NS3-NS5B auf die Aktivität der HBV-Enhancer Elemente

Bei Koinfektionen mit HBV und HCV können Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Viren auftreten. Um diese viralen Interaktionen näher zu beschreiben, sollen hier die

Auswirkungen des HCV-Core und der NS3-NS5B Proteine auf die Transkriptionsregulations-elemente des HBV, die Enhancer 1 und 2 untersucht werden.

Der Versuch war wie folgt aufgebaut:

Als Ausgangszelllinie diente die Huh7-Zelllinie bzw. deren Derivat, die 1b-BB-Zelllinie, die alle Nicht-Struktur Proteine des HCV bis auf NS2, als RNA-Replikon kodiert, enthält (siehe Abb. 12, Seite 28, Abschnitt 6.8). Die Zellen wurden in Williams E-Medium mit 1% FKS und 1x ITS gezüchtet. Abb.36 zeigt tabellarisch, wie diese beiden Zelllinien transfiziert wurden.

<b>Zelllinie</b>	<b>HBV- Enhancer</b>	<b>Exprimierte HCV- Proteine</b>	<b>transfizierte Plasmide (insg. 0,5µg)</b>
Huh7	1	∅	pLuciEI+ phTK Renilla mp+ pcDNA3
	1	Core	pLuciEI+ phTK Renilla mp+ pHc2-5/1b
	2	∅	pLuciEII+ phTK Renilla mp+ pcDNA3
	2	Core	pLuciEII+ phTK Renilla mp+ pHc2-5/1b
1b-BB	1	NS3-NS5B	pLuciEI+ phTK Renilla mp+ pcDNA3
	1	NS3-NS5B+Core	pLuciEI+ phTK Renilla mp+ pHc2-5/1b
	2	NS3-NS5B	pLuciEII+ phTK Renilla mp+ pcDNA3
	2	NS3-NS5B+Core	pLuciEII+ phTK Renilla mp+ pHc2-5/1b

Abb. 36 Transfektionsschema zur Untersuchung der Auswirkungen von HCV-Proteinen auf die beiden HBV-Enhancer Elemente

Die Zellen wurden mittels der Superfectmethode (Fa. Qiagen, Heiden) transfiziert, da sich dieses Transfektionsagens als am wenigsten zytopathogen erwiesen hat (Näheres siehe Methoden, Seite 42, Abschnitt 7.9.2). Die Transfektion erfolgte im dreifachen Ansatz. Die Enhanceraktivität wurde am 2., 4., 6. und 8. Tag nach Transfektion anhand der Aktivität der Firefly Luciferase im LMax-Luminometer photometrisch bestimmt. Aus den beiden gemessenen RLU-Werten (Relative Light Units) für die Firefly-Luciferase sowie für die Renilla-Luciferase als Kontrolle wurde ein Quotient gebildet. Mit Berechnung dieses Quotienten werden eventuelle Unterschiede bei der Transfektion, bei der Zelllyse bzw. bei der zellspezifischen Transkription und Translation ausgeglichen. Vor Darstellung der Ergebnisse sei noch auf Folgendes hingewiesen. Es zeigte sich eine generell niedrigere Aktivität des

pLuciEI- gegenüber dem pLuciEII-Plasmid. Diese liegt sogar niedriger als die der ph TK-Renilla mp. Man muss dies wohl auf besondere Eigenschaften des Plasmids pLuciEI selbst zurückzuführen. In Abb. 37 sind die arithmetischen Mittelwerte tabellarisch dargestellt. Die Abb. 38 zeigt eine graphische Darstellung der Enhancer 1-Aktivität unter dem Einfluss der einzelnen HCV-Proteine. Die Abb. 39 zeigt die Aktivität des Enhancer 2.

<b>Tag</b>	<b>HCV-Protein</b>	<b>Enhancer1</b>	<b>Enhancer2</b>
2	∅	0,036	1,49
2	Core	0,035	1,105
2	NS3-NS5B	0,038	2,24
2	NS3-NS5B+Core	0,045	1,9
4	∅	0,0986	0,1038
4	Core	0,1055	0,1107
4	NS3-NS5B	0,1041	0,1049
4	NS3-NS5B+Core	0,1041	0,1089
6	∅	0,104	7,314
6	Core	0,09	6,861
6	NS3-NS5B	0,158	12,172
6	NS3-NS5B+Core	0,15	8,819
8	∅	0,187	24,69
8	Core	0,238	21,182
8	NS3-NS5B	0,386	14,88
8	NS3-NS5B+Core	0,43	17,5

Abb. 37 Messung der Quotienten aus Firefly- zu Renilla Luciferase am Lmax Luminometer zur Bestimmung der HBV-Enhancer Aktivität unter dem Einfluss von HCV-Proteinen am Tag 2-8 nach Transfektion. Angegeben sind die Mittelwerte dreier Messungen. Auf die Berechnung von Standardabweichungen wurde verzichtet.

Es werden zunächst die Messungen für die Aktivität des HBV-Enhancer 1 vorgestellt.



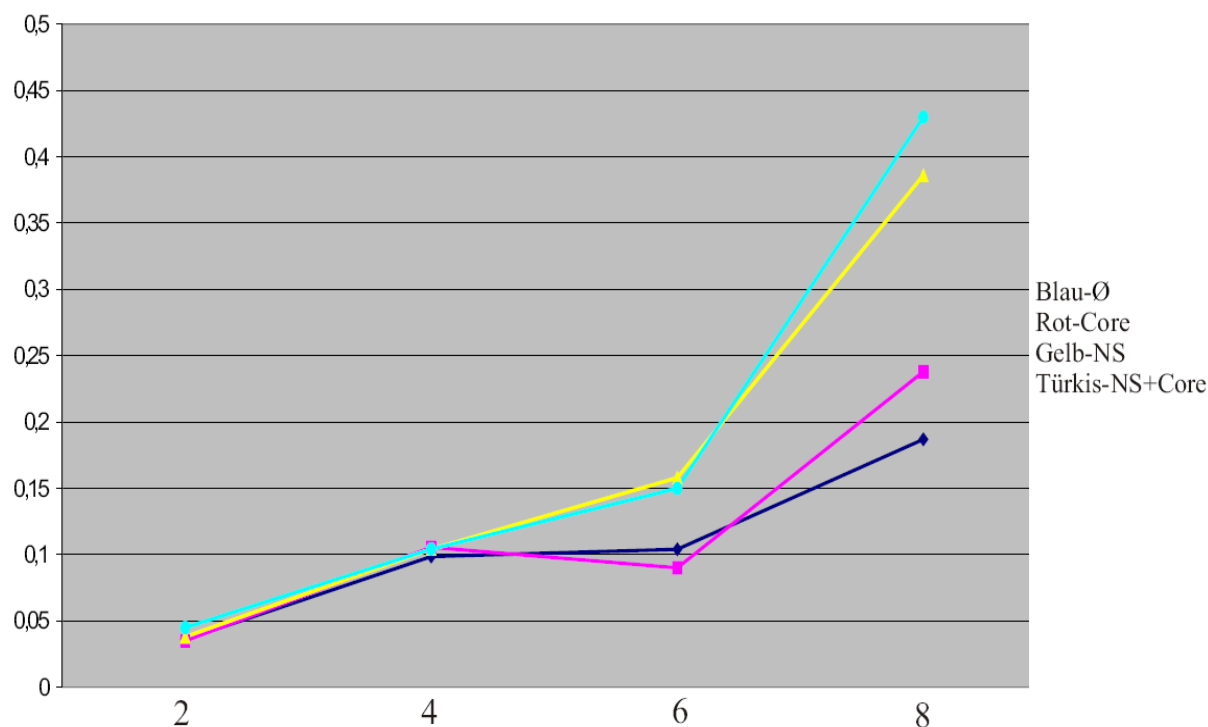


Abb. 38 Aktivität des HBV-Enhancer 1 in Abhängigkeit von verschiedenen HCV-Proteinen. Y-Achse: Quotient aus Firefly-Luciferase/Renilla-Luciferase Aktivität. X-Achse: Tag nach Transfektion

Während am Tag 2 nach Transfektion noch keine Unterschiede in der HBV-Enhancer 1-Aktivität auffielen, so zeigte sich am Tag 8 nach Transfektion eine leichte Steigerung durch HCV-Core Protein sowie eine deutliche Steigerung durch die HCV-Nicht-Strukturproteine. HCV-Core Protein steigerte die HBV-Enhancer 1-Aktivität gegenüber der Leerprobe um Faktor 1,3, die HCV-Nicht-Strukturproteine um Faktor 2,0.

Im folgenden werden die Ergebnisse für die Aktivität des HBV-Enhancer 2 vorgestellt. Es liegt eine offensichtliche Fehlmessung am Tag 4 vor. Diese Ergebnisse werden daher aus der Beurteilung ausgegrenzt.

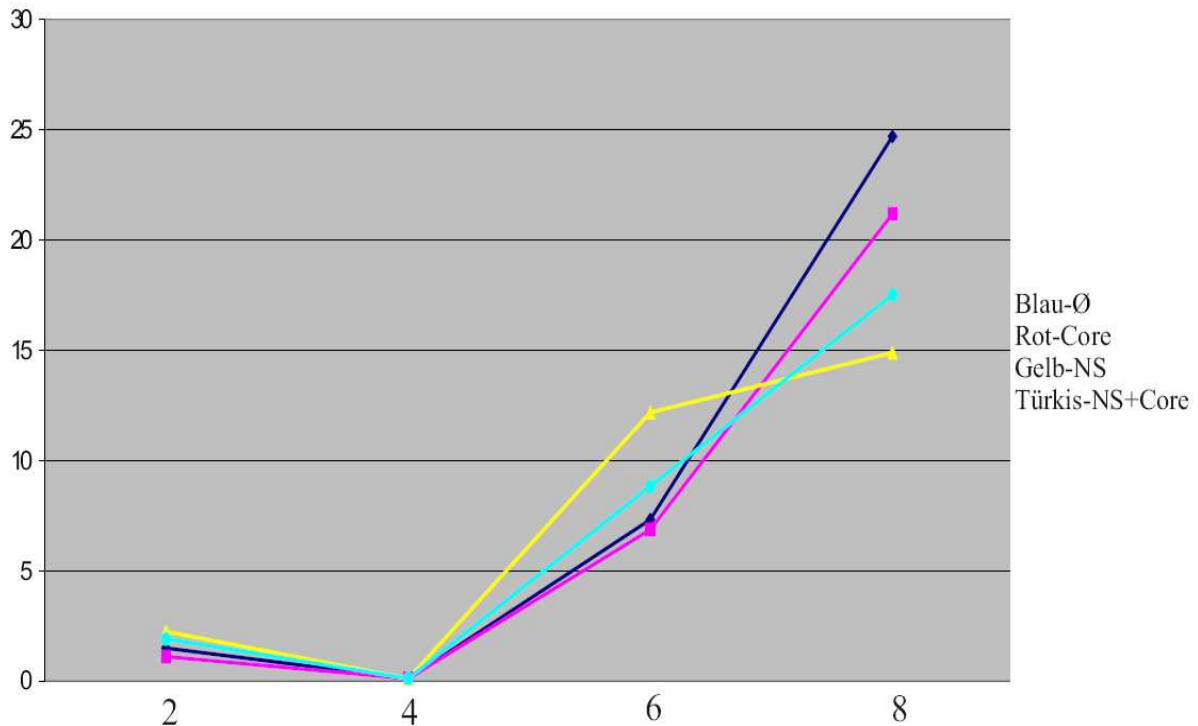


Abb. 39 Aktivität des HBV-Enhancer 2 in Abhängigkeit von verschiedenen HCV-Proteinen. Y-Achse: Quotient aus Firefly-Luciferase/Renilla-Luciferase Aktivität. X-Achse: Tag nach Transfektion

Während am Tag 2 nach Transfektion noch keine Unterschiede in der HBV-Enhancer 2-Aktivität auffielen, so zeigten sich am Tag 8 nach Transfektion nur geringfügige Änderungen der HBV-Enhancer 2-Aktivität. Am Tag 8 nach Transfektion hemmt das HCV-Core Protein die HBV-Enhancer 2 Aktivität um Faktor 1,1, und die HCV-Nicht-Strukturproteine die HBV-Enhancer 2 Aktivität um Faktor 1,6. Zusammen wirken das HCV-Core Protein und die HCV-Nicht-Strukturproteine mit einem Faktor von 1,4 ebenfalls inhibitorisch auf die HBV-Enhancer 2-Aktivität.

### 8.8 Auswirkung von HCV-Proteinen auf die HBV-Transkription

Während im vorherigen Abschnitt die Effekte der HCV Proteine auf die beiden Enhancer des HBV untersucht wurden, sollte nun die mRNA-Produktion von HBV unter dem Einfluss von HCV-Core sowie NS3-NS5B mittels real time RT-PCR quantitativ bestimmt werden. Es wurden hierfür wieder die beiden Zellsysteme Huh7 sowie 1b-BB verwendet. Als Zell-

medium diente Williams E, 1% FKS plus und ITS (Insulin, Transferrin, Selen). Die Zellen wurden jeweils im dreifachen Ansatz transfiziert (Abb. 40).

	<b>transfizierte Vektoren</b>
<b>Huh7</b>	pcDNA3+phTK Renilla mp+ pBs991T7
<b>Huh7</b>	pHc2-5/1b+phTK Renilla mp+ pBs991T7
<b>1b-BB</b>	pcDNA3+phTK Renilla mp+ pBs991T7
<b>1b-BB</b>	pHc2-5/1b+phTK Renilla mp+ pBs991T7

Abb. 40 Transfektionsschema zur Untersuchung der HBV-mRNA-Produktion unter dem Einfluss von HCV-Proteinen (Vektoren siehe Materialien Seite 29-31, Abschnitt 6.9)

Die Zellen wurden nach der SuperFect-Methode (Fa. Qiagen) transfiziert (Methoden Seite 42, Abschnitt 7.9.2). Mit dem oben genannten Transfektionsschema lässt sich der Effekt von HCV-Core (pHc2-5/1b), der HCV NS3-NS5B (Replikon der 1b-BB Zellen) sowie der gemeinsame Effekt aller eben genannter Proteine gegenüber der Leerprobe (pcDNA3.1+) darstellen.

Zum Ausschluss eventueller Zellaktivitätsunterschiede zwischen den Huh7- und 1b-BB-Zelllinien, wurden die beiden Zellsysteme in dieser Hinsicht näher untersucht. Neben der Transfektion mit pBs991T7 sowie pcDNA3.1+ wurde sowohl die Huh7-Zelllinie, als auch die 1b-BB-Zelllinie mit phTK Renilla mp in einem zusätzlichen Ansatz kotransfiziert. Das phTK-Renilla mp Plasmid exprimiert in Abhängigkeit vom Transfektionserfolg und der Zellintegrität die Renilla-Luciferase, ein Enzym, dessen Aktivität nach Lyse und Substratzugabe luminometrisch bestimmt werden kann. Des Weiteren wurden die Zellen vor der Enzymaktivitätsbestimmung mit der Neubauerzählkammer ausgezählt. Die hier aufgeführten Enzymaktivitätswerte gelten rechnerisch für jeweils 2000 Zellen. Damit sind die Messwerte untereinander vergleichbar. Die gemessene Enzymaktivität dient dabei als genereller Marker der Expressionsaktivität. Die Abbildungen 41-42 bieten eine Übersicht über die Unterschiede der Expressionsaktivität.

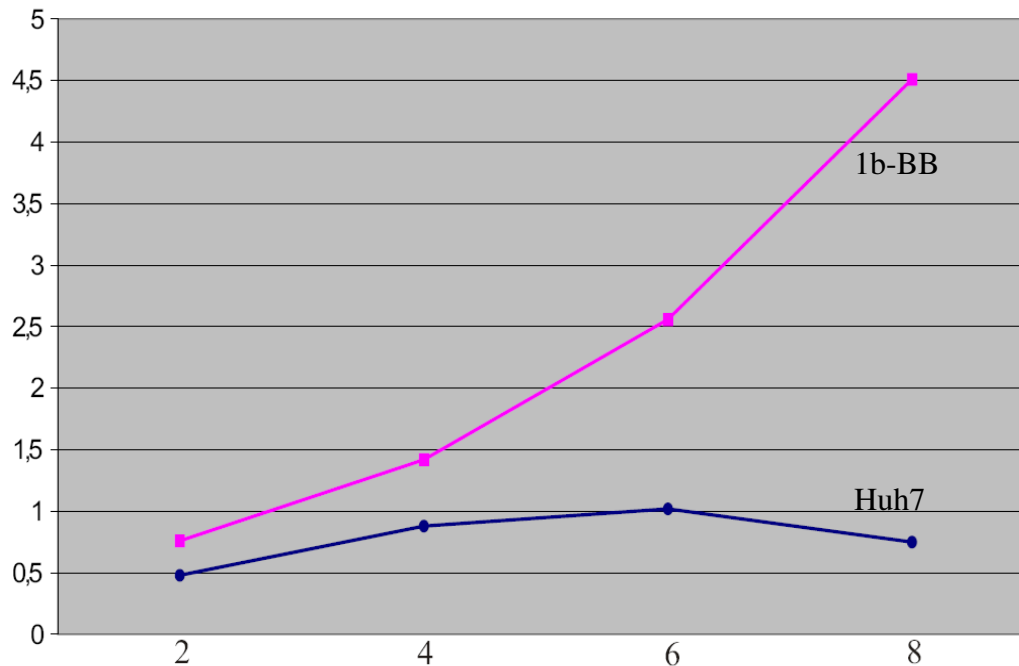


Abb. 41 Expressionsaktivität der Huh7- und 1b-BB-Zelllinie in Abhängigkeit vom Tag der Transfektion. Y-Achse Expressionsaktivität in RLU (relative light units). X-Achse: Tag der Aktivitätsbestimmung nach Transfektion

Wie man erkennen kann, liegt die Expressionsaktivität ([RLU]=relative light units) der 1b-BB-Zellen deutlich über derjenigen der Huh7-Zellen. Im Mittel zeigte sich ein Unterschied von Faktor 3. Das Verhältnis von 1b-BB zu Huh7 beträgt maximal 6,0 am Tag 8 (Abb. 42). Ab Tag 6 kommt es zu einer starken Zellaktivitätssteigerung der 1b-BB-Zellen gegenüber den Huh7-Zellen. Am gleichen Tag zeigte sich in der Zellkulturschale eine 100%ige Konfluenz im Zellwachstum beider Zelllinien. Um generelle aktivierende Eigenschaften der HCV Nicht-Struktur Proteine auszuschließen und die Effekte der Nicht-Struktur Proteine auf die HBV-Transkription im speziellen zu untersuchen, wurde der 1b-BB/Huh7-Renillaquotient folgendermaßen eingerechnet. Die Zellaktivität der Huh7-Zellen wurde mit 1,0 gleichgesetzt. Die Messwerte der 1b-BB-Zelllinie wurden zur Angleichung der unterschiedlichen Expressionsaktivität durch den 1b-BB/Huh7-Renillaquotienten dividiert. Unter Berücksichtigung des obigen Transfektionsschemas sind in den Abbildungen 43-45 die gewonnenen Werte für die Gesamt mRNA-Bildung des HBV unter HCV-Einfluss aufgeführt. Es ist jeweils der arithmetische Mittelwert der Messwerte sowie deren zweifache Standardabweichung angegeben.

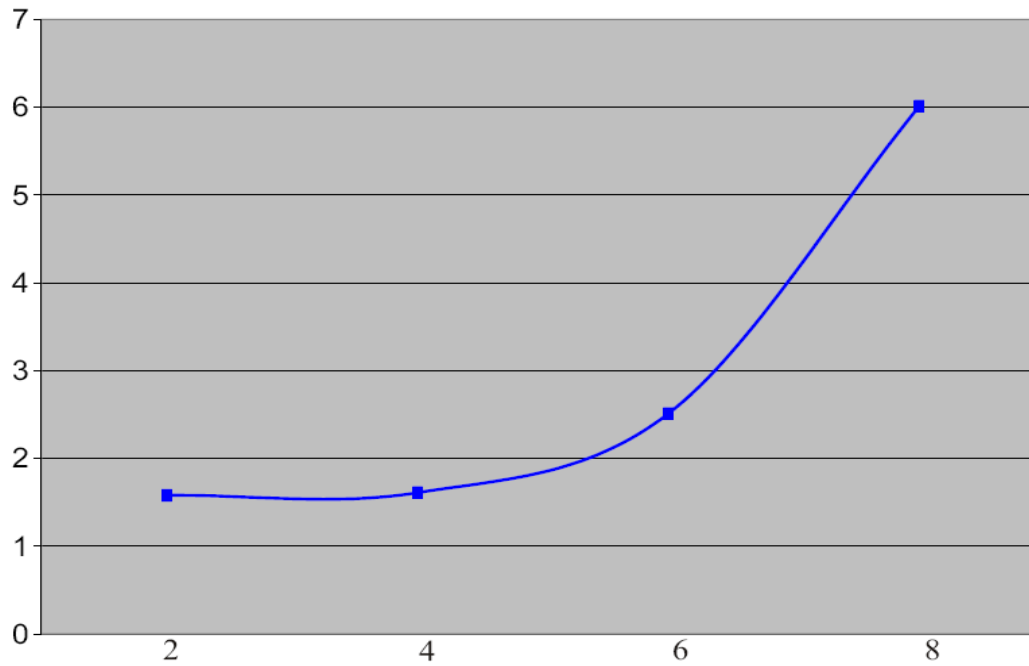


Abb. 42 Quotient aus Expressionsaktivität der 1b-BB-Zelllinie/Huh7-Zelllinie in Abhängigkeit vom Tag der Transfektion. Y-Achse Relative Expressionsaktivität. X-Achse: Tag der Aktivitätsbestimmung nach Transfektion

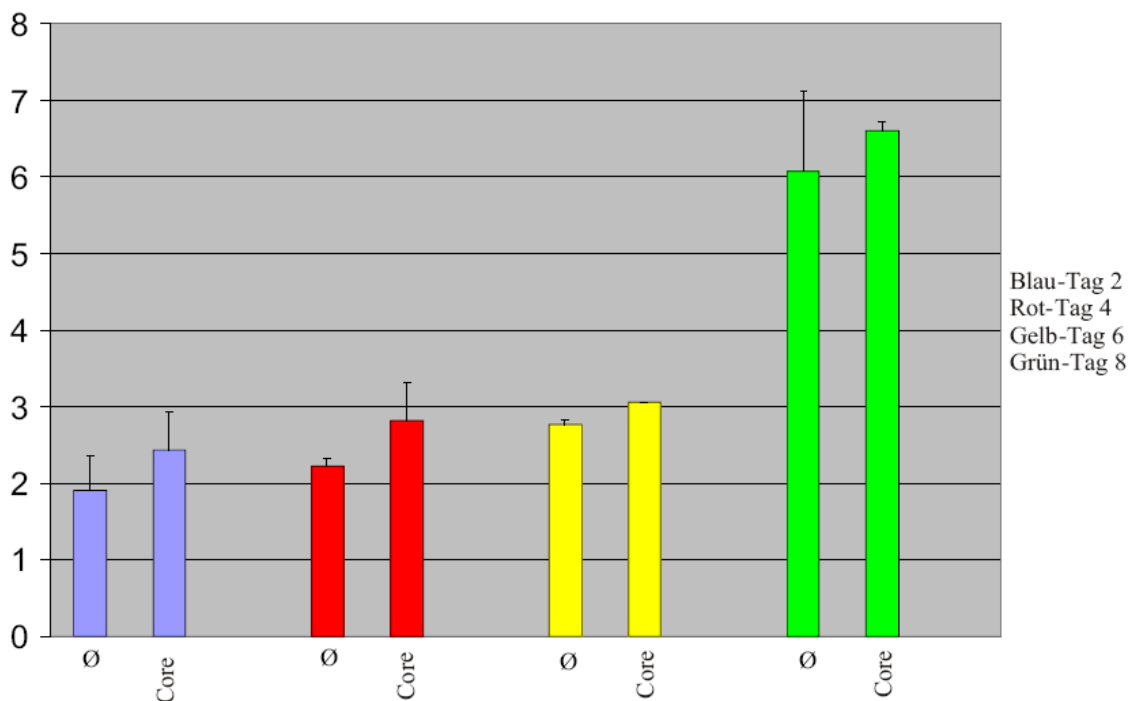


Abb. 43 HBV-Gesamt mRNA Gehalt in  $10^5$  Kopien/ 2000 Zellen unter dem Einfluss von HCV-Core Protein.

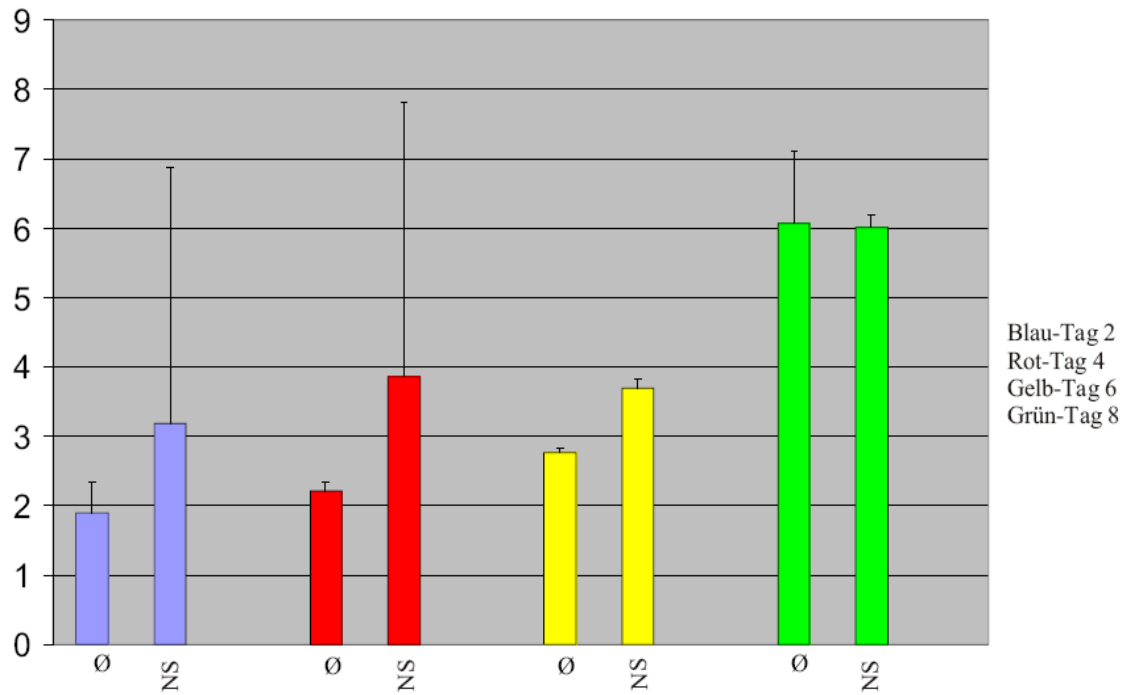


Abb. 44 HBV-Gesamt mRNA Gehalt in  $10^5$  Kopien/ 2000 Zellen unter dem Einfluss von HCV-NS Protein.

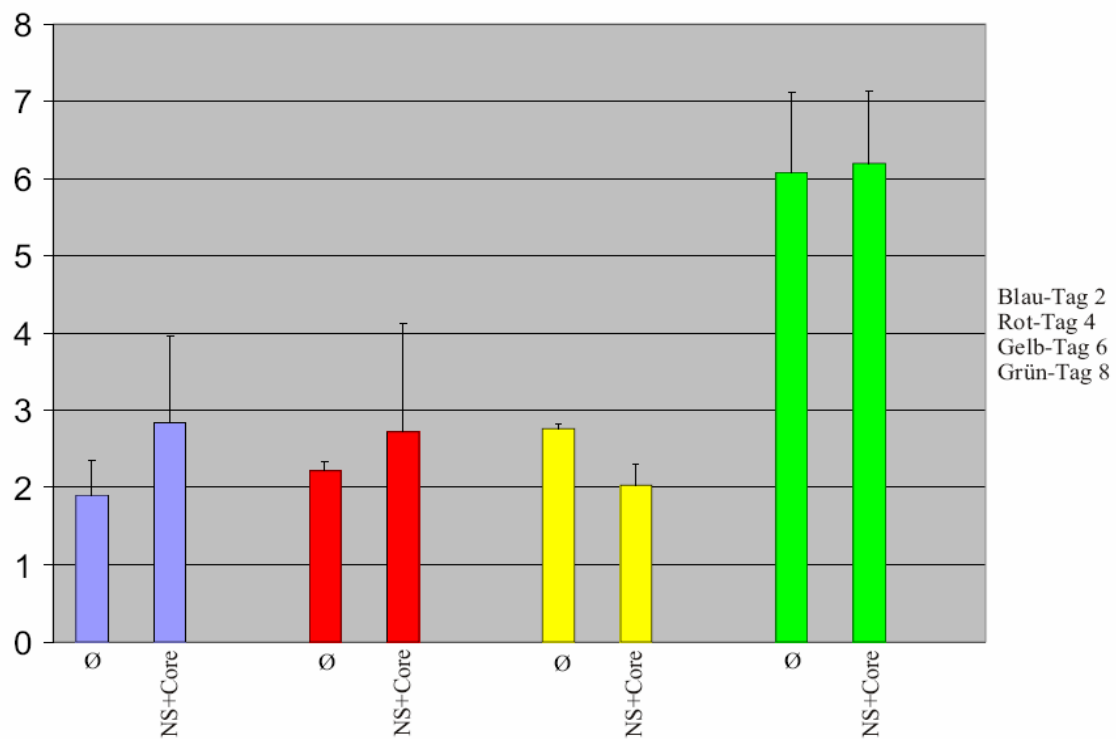


Abb. 45 HBV-Gesamt mRNA Gehalt in  $10^5$  Kopien/ 2000 Zellen unter dem Einfluss von HCV-Core und HCV-NS Protein.

Es zeigte sich ein Anstieg der Gesamt mRNA-Produktion von Tag 2 bis Tag 8 um den Faktor 3,2 (Leerprobe). Ähnlich hoch ist der Anstieg unter Einfluss des HCV-Core Proteins (Faktor 2,71). Unter den HCV-Nicht-Struktur Proteinen liegt der Anstieg bei 1,88, unter den HCV-Nicht-Struktur Proteinen und dem Core-Protein bei Faktor 2,18. Weder HCV-Core-Protein, noch die HCV-Nicht-Struktur Proteine, noch die Kombination aus Struktur- und Nicht-Struktur-Proteinen des HCV zeigte eine signifikante Änderung der Gesamt mRNA-Produktion des HBV.

In den Abbildungen 46-48 wird die HBV-pgRNA Produktion unter dem Einfluss verschiedener HCV-Proteine dargestellt.

Auch bei der HBV-pgRNA-Produktion findet sich ein Anstieg von Tag 2 bis Tag 8. Dieser ist mit Faktor 2,7 in der Leerprobe etwas niedriger als der HBV-Gesamt-mRNA Anstieg. Unter dem HCV-Core-Protein steigt die HBV-pg-mRNA-Produktion um Faktor 2,46, unter den HCV-Nicht-Struktur Proteinen um 1,84 und unter den Nicht-Struktur Proteinen und dem Core-Protein des HCV um Faktor 2,2.

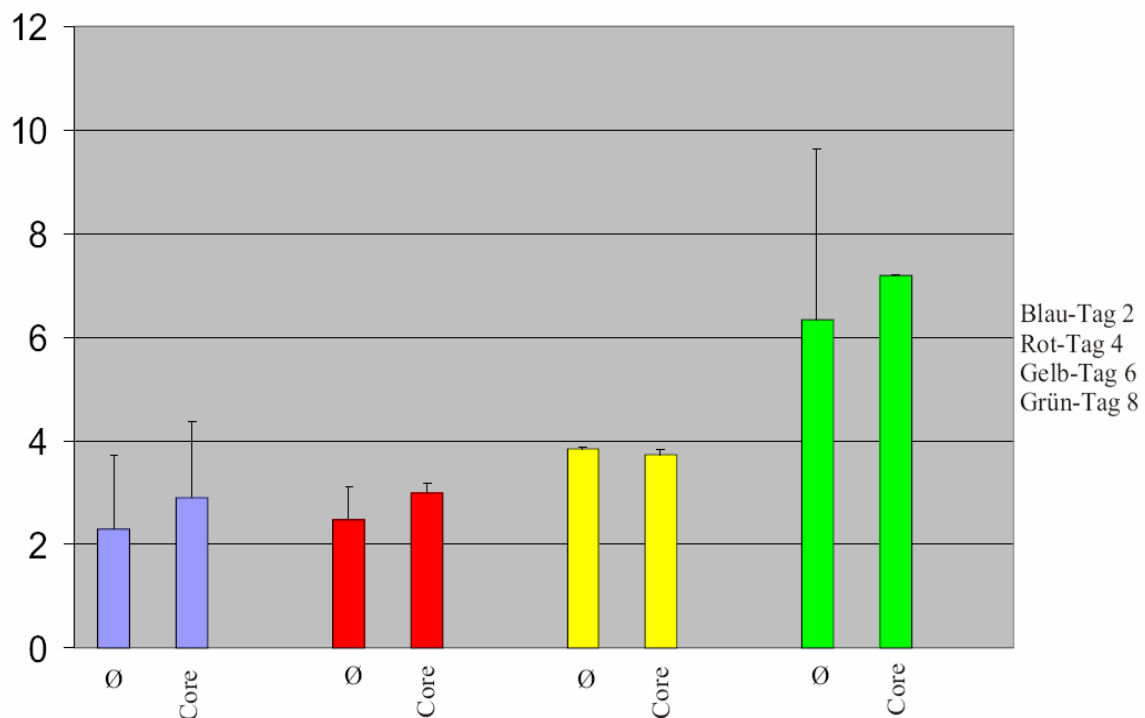


Abb. 46 HBV-pgRNA Gehalt in  $10^4$  Kopien/ 2000 Zellen unter dem Einfluss von HCV-Core-Protein.

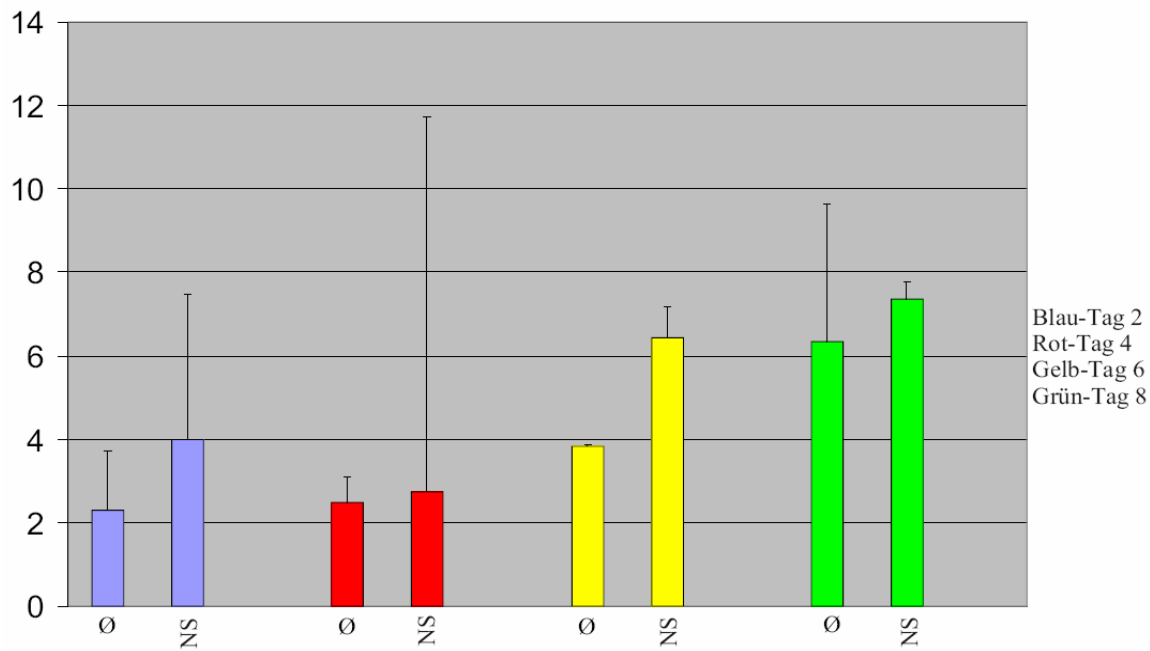


Abb. 47 HBV-pgRNA Gehalt in 10<sup>4</sup> Kopien/ 2000 Zellen unter dem Einfluss von HCV-NS-Protein.

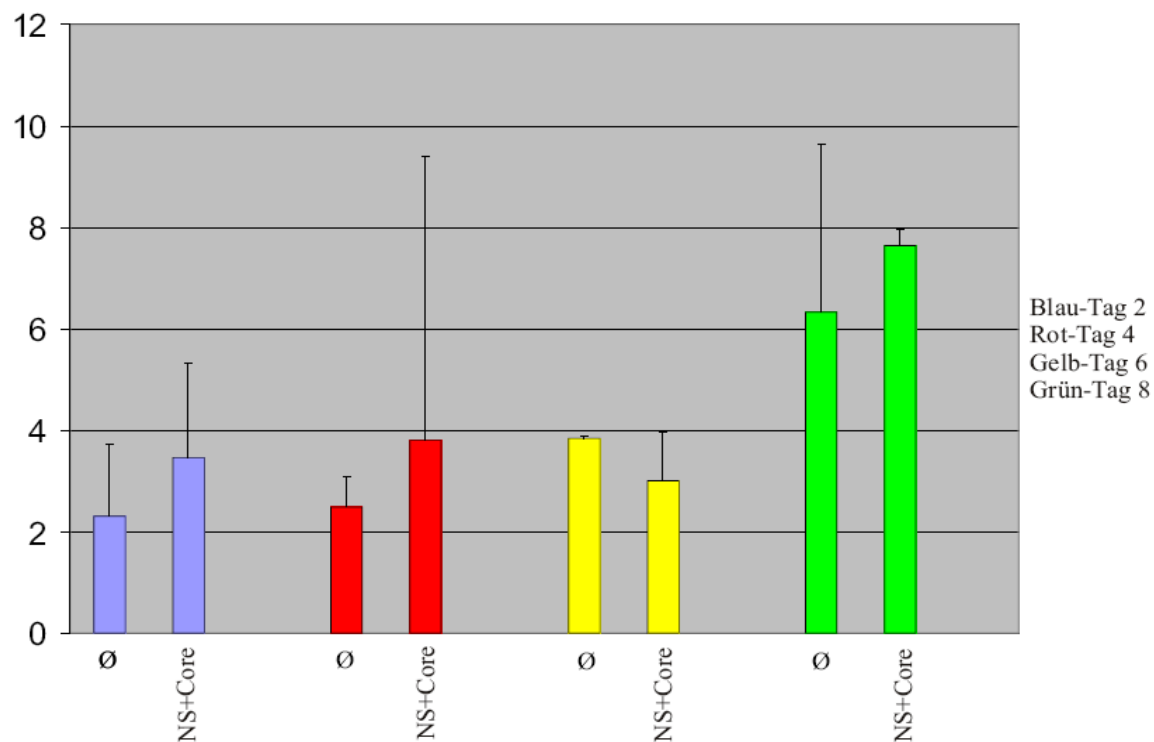


Abb. 48 HBV-pgRNA Gehalt in 10<sup>4</sup> Kopien/ 2000 Zellen unter dem Einfluss von HCV-Core- und HCV-NS-Protein.



Wie bei der HBV-Gesamt RNA-Produktion finden sich auch bei der HBV-pgRNA-Produktion keine signifikanten Unterschiede unter dem Einfluss von HCV-Proteinen.

Betrachtet man das Verhältnis von HBV pg- zu Gesamt-mRNA (Abb. 49), so finden sich Werte zwischen 0,104 und 0,174. Das Verhältnis aus HBV pg- zu HBV Gesamt-RNA unterscheidet sich nicht signifikant.

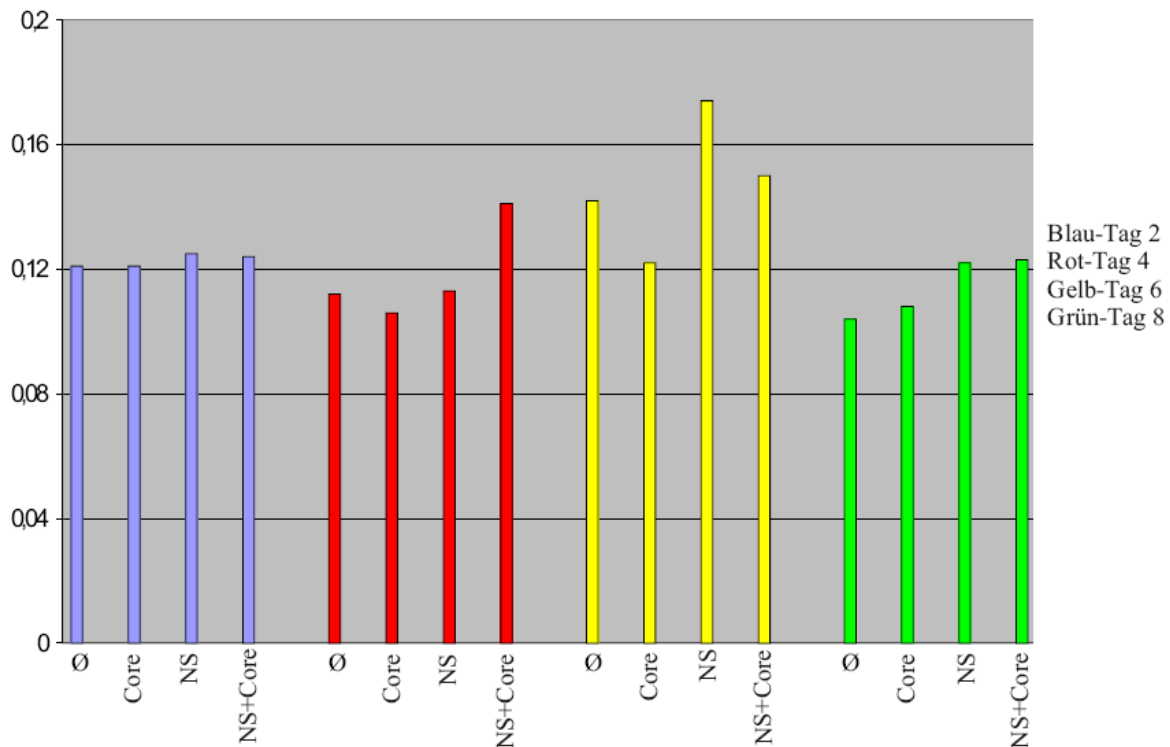


Abb. 49 Verhältnis von HBV pgRNA zu HBV-Gesamt mRNA Produktion unter dem Einfluss von HCV-Proteinen

### 8.9 Effekte des HCV-Core Protein und der HCV Nicht-Struktur Proteine NS3 bis NS5B auf die HBsAg Produktion des HBV

Neben der Quantifizierung der HBV-mRNA Menge im letzten Versuch wurden auch die Zellüberstände im 2 Tage-Abstand konserviert und die HBsAg-Konzentration in ng/ml mittels ELISA bestimmt (Methoden, Seite 48, Abschnitt 7.13 sowie Ergebnisse, Seite 56, Abschnitt 8.3). In den folgenden Diagrammen (Abb. 50-52) sind die entsprechenden Ergebnisse aufgeführt. Die Messwerte der HBsAg-Konzentration sind mit dem im letzten Abschnitt vorge-

stellten Korrekturfaktor, der mittels Expressionsaktivitätsmessung über die Renilla-Luciferase berechnet wurde, korrigiert (siehe Abb. 41 und 42).

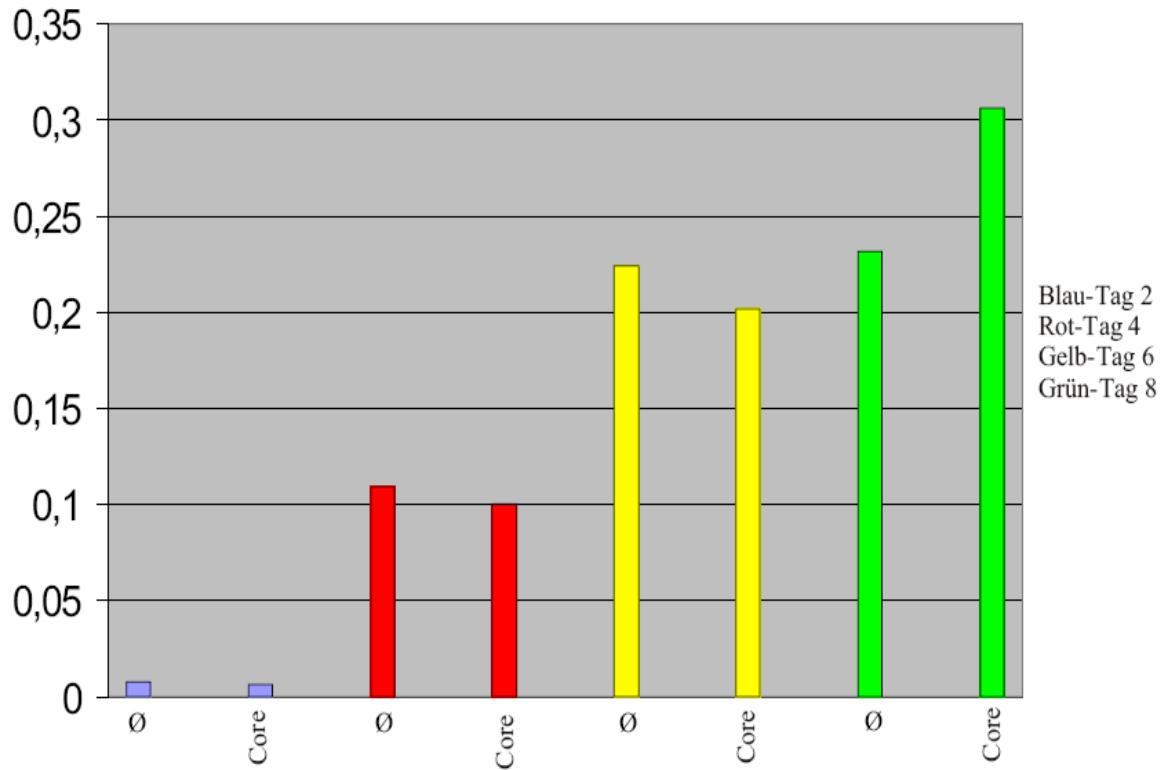


Abb. 50 HBsAg-Produktion in ng/ ml in Abhängigkeit des HCV-Core-Proteins.

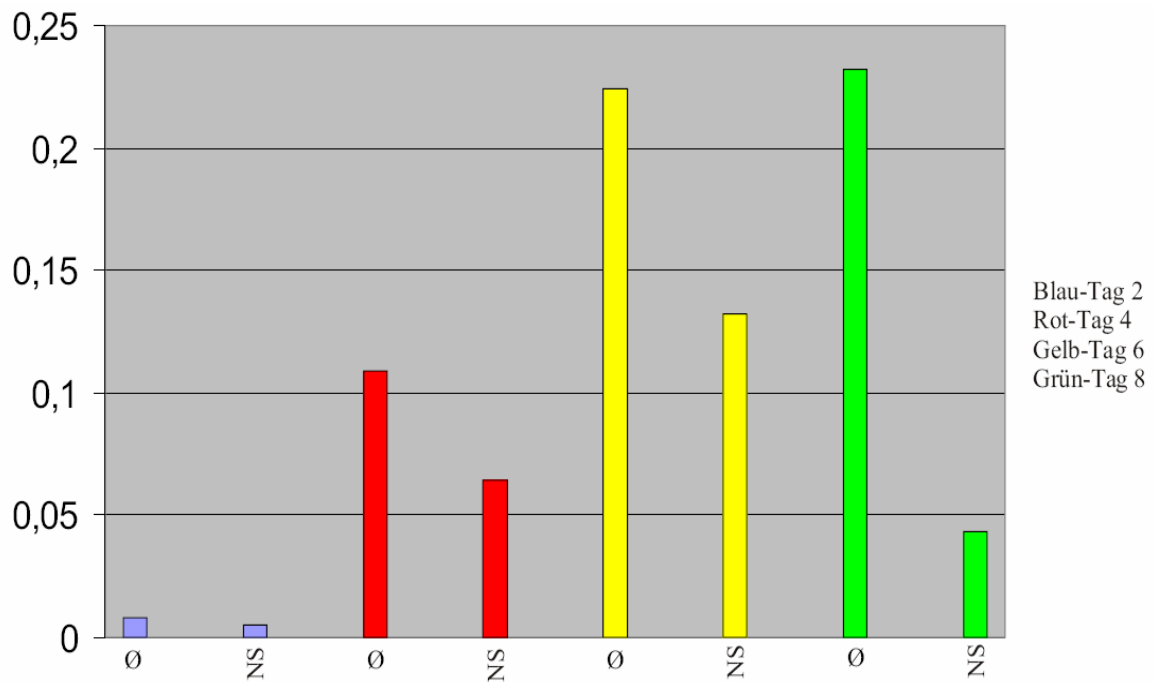


Abb. 51 HBsAg-Produktion in ng/ ml in Abhängigkeit der HCV-NS3-NS5B-Proteine.

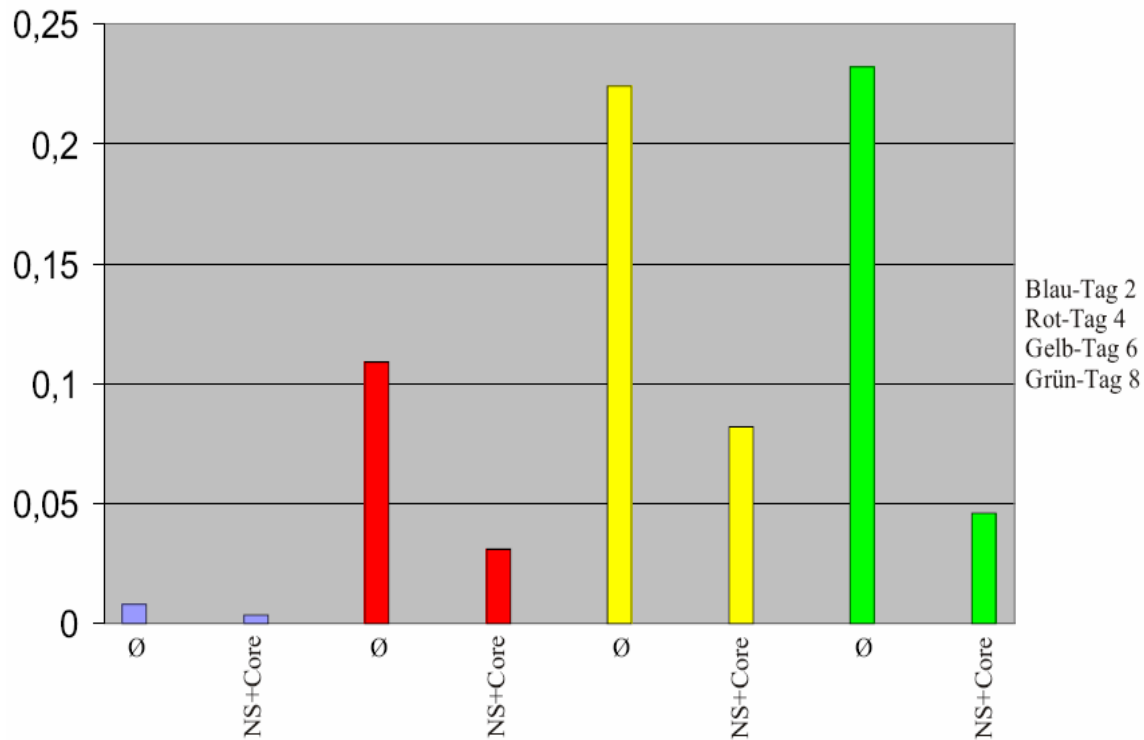


Abb. 52 HBsAg-Produktion in ng/ ml in Abhängigkeit der HCV-Core und NS3-NS5B-Proteine.

Es zeigt sich ohne Einfluss von HCV-Proteinen eine Zunahme der HBsAg-Konzentration im Zellüberstand zwischen Tag 2 und Tag 8 von Faktor 29. Auch unter HCV-Core zeigt sich ein starker und kontinuierlicher Zuwachs von Faktor 51. Betrachtet man die HBsAg-Konzentrationen an den einzelnen Tagen separat, so erkennt man leicht, dass das HCV-Core Protein keinen bzw. einen nur sehr geringen Effekt auf die HBsAg-Produktion hat (Abb. 50). Abb. 51 zeigt eine auffällige Inhibition der HBsAg-Konzentration im Zellüberstand unter Einfluss von HCV NS3-NS5B. Dieser Effekt ist am Tag 8 mit Faktor 5,4 am deutlichsten ausgeprägt. Aber auch am Tag 2 (Faktor 1,6), am Tag 4 (Faktor 1,7) und am Tag 6 (Faktor 1,7) ist er zu erkennen. Der inhibitorische Effekt der HCV-Nicht-Struktur Proteine bleibt auch unter zusätzlicher Transfektion von HCV-Core Protein produzierendem pHc2-5/1b erhalten (Faktor 2,2 Tag 2, Faktor 3,5 Tag 4, Faktor 2,7 Tag 6 und Faktor 5,04 Tag 8).

## 9. Diskussion

### 9.1 Einflussnahme von Transfektionsart und verschiedener Zellkulturparameter auf die mRNA- und Oberflächenproteinproduktion des HBV

Zusammenfassend seien die Ergebnisse der HBV-mRNA Produktion und der HBsAg-Expression und Sekretion von transient und stabil transfizierten Zellen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen nochmals tabellarisch dargestellt (Abb. 53 und 54).

	<b>FKS/Koll.</b>	<b>FKS/DMSO</b>	<b>FKS</b>	<b>Koll</b>	<b>DMSO</b>	<b>Koll/DMSO</b>	<b>Ø</b>
<b>Gesamt-mRNA</b>	12,7	11,7	6,7	6,7	10,2	11,4	6,7
<b>pg-mRNA</b>	6,5	6,6	4,0	3,8	6,4	7,0	3,8
<b>Anteil pg-RNA</b>	5,1	5,6	5,9	5,6	6,2	6,1	5,6
<b>HBsAg-Produktion</b>	0,106	0,057	0,090	0,152	0,139	0,142	0,127

Abb. 53 HBV-mRNA und HBsAg Expression in stabil transfizierten Zellen in Abhängigkeit von Zellkulturbedingungen (Messwerte Gesamt RNA in  $10^5/2000$  Zellen, pg-RNA in  $10^4/2000$  Zellen, Anteil an prägenomischer RNA in %, HBsAg in ng/ ml, Ø =Leerprobe)

	<b>FKS/Koll.</b>	<b>FKS/DMSO</b>	<b>FKS</b>	<b>Koll</b>	<b>DMSO</b>	<b>Koll/DMSO</b>	<b>Ø</b>
<b>Gesamt-mRNA</b>	12,3	20,5	8,3	5,9	2,1	1,1	6,1
<b>pg-mRNA</b>	27,8	33,2	16,5	10,4	4,9	5,8	8,7
<b>Anteil pg-RNA</b>	21,5	16,8	19,8	17,6	23,1	27,9	14,1
<b>HBsAg-Produktion</b>	0,302	0,167	0,323	0,239	0,119	0,066	0,19

Abb. 54 HBV-mRNA und HBsAg Expression in transient transfizierten Zellen in Abhängigkeit von Zellkulturbedingungen (Messwerte Gesamt RNA in  $10^5/2000$  Zellen, pg-RNA in  $10^4/2000$  Zellen, Anteil an prägenomischer RNA in %, HBsAg in ng/ ml, Ø =Leerprobe)

Vergleicht man zunächst die unterschiedlichen Transfektionswege, so zeigt sich eine größere Variation der HBV mRNA-Expression in der transient transfizierten HepG2-Zelllinie im Vergleich zu der stabil transfizierten HepG2.2.15-Zelllinie. Dies mag mit der Tatsache zu begründen sein, dass das HBV-Genom der HepG2.2.15-Zelllinie über die LTR (long terminal repeats) des MMLV (moloney murine leukemia virus) in die chromosomale zelluläre DNA integriert ist und damit auch zellulären bzw. fremdviralen Regulationsmechanismen unterliegt, wohingegen die nicht integrierte Plasmid-DNA der transient transfizierten Zellen unter Kontrolle der HBV-Promotoren steht. Möglicherweise binden an die zellulären Promotoren andere Transkriptionsfaktoren als an die HBV-Promotoren des pBs991T7-Dimer Plasmids oder gleiche Transkriptionsfaktoren haben an den zellulären bzw. viralen Promotoren unterschiedliche Effekte. Des weiteren könnten diese Unterschiede auch in den verschiedenen Genotypen der beiden Transfektionsschemata begründet sein (Genotyp A bei transienter Transfektion, Genotyp D bei stabiler Transfektion). Es bestehen Sequenzunterschiede zwischen Genotyp A und D von bis zu 9,2%.

Zunächst unabhängig vom Einfluss von verschiedenen Zellkulturparametern zeigen die transient transfizierten Zellen im Vergleich zu den stabil transfizierten HepG2.2.15 Zellen grundsätzlich eine höhere absolute pg-RNA Produktion bzw. einen höheren prozentualen Anteil an pg-RNA im Verhältnis zur Gesamt-mRNA Produktion des HBV. Parallel hierzu liegen höhere HBsAg-Konzentrationen vor. Die Gesamt mRNA-Expression des HBV bei transienter Transfektion unterscheidet sich signifikant unter dem Einfluss von DMSO bzw. DMSO/Kollagen. Hier zeigt sich eine 4,8- bzw. 10,3-fach niedrigere Gesamt mRNA Produktion.

Da der Differenzierungsstatus der Zelle Einfluss auf die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren hat (Cereghini et al., 1996 sowie Kymizi et al., 2006), erfolgte die differenzierte Untersuchung hinsichtlich der Auswirkungen verschiedener Zellkulturparameter auf die HBV-mRNA- und HBsAg-Produktion. Mit dem Einfluss von fötalem Kälberserum als Zellkulturparameter zeigt sich zum einen ausgeprägtes Zellwachstum, zum anderen bleibt die Differenzierung der Zelle aus. Zu den Zellparametern, die die Differenzierung fördern, zählen DMSO, Kollagen und der Entzug von fötalem Kälberserum als Wachstumsstimulus. Eine gesteigerte Zelldifferenzierung führt nach Ozer et al. (1996) zu einer höheren Produktionsrate an HBV-DNA und HBV-mRNA.

Hier zeigte sich in stabil transfizierten Zellen durch den Zusatz oder die alleinige Verwendung von Zelldifferenzierung fördernden Faktoren keine signifikanten Unterschiede in der HBV-Gesamt-mRNA-, pg-mRNA- und HBsAg-Produktion im Vergleich zum Standardzellmedium mit 10% FKS. In stabil transfizierten Zellen stellte sich der prozentuale Anteil an prägenomischer HBV-mRNA als fast unabhängig von verschiedenen Zellkulturparametern dar. In transient transfizierten Zellen zeigte sich eine signifikante Suppression der HBsAg-Produktion unter Zellparametern, die die Zelldifferenzierung fördern (Faktor maximal 4,9). In transient transfizierten Zellen änderte sich weiterhin der prozentuale Anteil von prägenomischer HBV-RNA in Abhängigkeit von DMSO signifikant. Es zeigte sich eine Suppression um maximal Faktor 3,4. Dies kann möglicherweise Folge einer indirekten oder direkten Inhibition der preS1-, preS2- und X-Promotoren sein. So zeigt sich unter DMSO bzw. DMSO/Kollagen eine deutliche Suppression der Gesamt mRNA-Produktion bei gleichzeitig hohem prozentualen Anteil an prägenomischer mRNA. Dies kann man als selektive Suppression der Bildung von LHBs-, MHBs/SHBs- und X-mRNA interpretieren. Diese Hypothese wird durch die geringere Syntheserate von HBsAg im Zellüberstand untermauert.

In einem 2001 veröffentlichten Artikel untersuchten Glebe et al. u.a. den Einfluss von DMSO, FKS und Kollagen auf die intrazelluläre HBV-Virusproduktion in der stabil mit HBV transfizierten HepG2.2.15 Zelllinie sowie in der transient transfizierten HepG2-Zelllinie. Es wurde ebenfalls der Vektor pBs991T7-Dimer transfiziert, so dass grundsätzlich sehr ähnliche Versuchsbedingungen bestanden. Sowohl in stabil als auch in transient transfizierten Zellen konnten im Zellüberstand unter 10% FKS nach sieben Tagen Inkubation  $1-5 \times 10^6$  GE/ml HBV DNA nachgewiesen werden. In den hier dargestellten Ergebnissen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der HBV-Gesamt mRNA-Produktion zwischen stabil und transient transfizierten Zellen. Allerdings zeigten sich wie oben schon erwähnt deutliche Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteils an prägenomischer HBV-mRNA zwischen transient und stabil transfizierten Zellen. Unabhängig von den verschiedenen Zellkulturparametern fand sich ein mittlerer Unterschied von Faktor 3,6. Glebe et al. fanden eine Steigerung der HBV-Virusproduktion unter Kollagen, unter DMSO und in serumfreiem Zellmedium. Die untersuchten Faktoren wiesen bei Glebe et al. einen additiven Effekt auf. Mit steigendem Differenzierungsstatus der Zellen durch Kollagenisierung der Zellplatten und DMSO-Zugabe zum Zellmedium konnte eine gesteigerte HBV-Virusproduktion nachgewiesen werden. Hier

konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des prozentualen Anteils an prägenomischer mRNA in der HepG2.2.15- und transient transfizierten HepG2-Zelllinie unter Einfluss von unterschiedlichen Zellkulturparametern nachgewiesen werden. Stattdessen stellte sich das Verhältnis von prägenomischer- und Gesamt-mRNA des HBV v.a. in stabil transfizierten Zellen mit Schwankungen von maximal 1,1 % als sehr konstant dar. Bei einer Schwankungsbreite von 9% in transient transfizierten Zellen zeigte sich unter DMSO eine signifikante, unter Entzug von Kälberserum eine tendenzielle Zunahme der pg-mRNA Produktion. Gleichzeitig zeigt sich unter DMSO ein tendenzielle Abnahme der HBsAg Produktion des HBV (Faktor 2,7).

Glebe et al. verglichen in diesem Zusammenhang auch die HBV-Virusproduktion bei transienter Transfektion zwischen einen HBV-Dimer und einem Prägenom-Konstrukt (1,1 mer, Genotyp A2, EMBL Access No. AJ012207, bp 1820-3221/1-1984). Die HBV-Virusproduktion war nach Transfektion mit dem Prägenomkonstrukt um den Faktor 3-5 niedriger als bei Transfektion des HBV-Dimers pBs991T7 (EcoR1 Dimer, Genotyp A1, EMBL Access No X51970). So scheint ein höherer relativer Anteil an prägenomischer-mRNA nicht unmittelbar mit einer höheren HBV-Virusproduktion einherzugehen. Vielmehr scheint ein adäquates Verhältnis von prägenomischer-RNA, HBcAg und HBsAg notwendig zu sein, um eine höhere HBV-Virusproduktion zu gewährleisten.

Huang et al. untersuchten 2004 den Einfluss des Zellzyklus auf die HBV-Replikation in stabil transfizierten HepG2.2.15-Zellen. Ähnlich wie bei Glebe et al. versuchte man, eine Differenzierung bzw. ein Arrest in der G1/G0-Phase des Zellzyklus unter anderem durch Zugabe von DMSO zum Zellmedium sowie durch Kultivierung der Hepatozyten ohne Zusatz von Kälberserum zu erreichen. Nach Zugabe von DMSO lag der prozentuale Anteil an Hepatozyten in der G1/G0-Phase bei 71,9% bzw. bei 65,2% in serumfreiem Medium. Unter 10% FKS zeigte sich ein Anteil von 43,1%. Der Menge an produzierter HBV-DNA lag unter DMSO bei  $4,8 \times 10^6$  Kopien/ ml Zellüberstand, unter serumfreiem Medium bei  $5,1 \times 10^6$ , unter 10% FKS bei  $1,2 \times 10^6$ . Die HBsAg-Produktion lag unter 10% FKS bei 1,3 P/N, unter DMSO und unter serumfreiem Medium jeweils bei 3,7 P/N. Wie bei Glebe et al. konnte auch hier gezeigt werden, dass die Virusproduktion des HBV sowie seiner Oberflächenproteine unter größerer Zelldifferenzierung zunimmt. In dem hier durchgeführten Versuch zeigte sich gegenüber dem Standardzellmedium mit 10%igem FKS-Zusatz in stabil transfizierten Zellen eine Steigerung der HBsAg-Produktion unter DMSO von Faktor 1,5. Die HBV-Gesamt mRNA

Produktion stieg ebenfalls um Faktor 1,5, die Produktion von prägenomischer HBV-mRNA um Faktor 1,6. Hier zeigt sich erneut, dass die Bildung von prägenomischer HBV-mRNA (Steigerung von Faktor 1,6 unter DMSO) nicht direkt mit der HBV-Produktion (Steigerung von Faktor 4 unter DMSO, Gong et al., 2004) korreliert. Bei Huang et al. zeigte sich mit einem Faktor von 2,8 eine höhere Steigerungsrate der HBsAg-Produktion unter DMSO. Dies mag mit dem unterschiedlichen Vorgehen bei der Zellkultivierung zusammenhängen. In diesem Versuchsaufbau wurden die HepG2.2.15 Zellen direkt nach Aussäen den unterschiedlichen Zellparametern ausgesetzt, während bei Huang et al. erst nach Erreichen einer fast vollständigen Konfluenz unter 10% FKS die entsprechenden Zellparameter durch Mediumwechsel Anwendung fanden. Ohne Zusatz von Kälberserum zum Medium konnten hier keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der HBV-mRNA Produktion und HBsAg-Produktion im Vergleich zum Standardmedium in stabil transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Es fand sich keine unmittelbare Erklärung für die letztgenannten Differenzen zwischen den Ergebnissen von Huang et al. und den hier gewonnenen Befunden.

Bei Huang et al. fand eine Differenzierung zwischen stabil und transient transfizierten Zellen nur insofern statt, als dass die Rate der Telomerase-Inhibition zwischen der HepG2.2.15-Zelllinie und der untransfizierten HepG2-Zelllinie unter o.g. Zellparametern verglichen wurden. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen stabil und transient transfizierten Zellen. Die Höhe der Telomeraseinhibition korrelierte dabei mit der Höhe der HBV-DNA Produktion im Zellüberstand. Dies legt zunächst nahe, dass transient transfizierte Zellen eine ähnliche HBV-DNA-Produktion unter den verschiedenen Zellkulturparametern zeigen wie die stabil transfizierten Zellen. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass die von Huang et al. nachgewiesene Telomeraseinhibition im Gegensatz zu stabil transfizierten Zellen nicht mit einer Steigerung der HBV-mRNA Produktion und HBsAg-Produktion in transient transfizierten Zellen einhergeht. Stattdessen zeigt sich unter DMSO eine Inhibition der Gesamt-mRNA-Produktion um Faktor 3,9, der prägenomischen mRNA-Produktion um Faktor 3,3 und der HBsAg-Produktion um Faktor 2,7. Unter Entzug von Kälberserum zeigten sich im Vergleich zum Standardmedium mit 10% FKS keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der HBV-mRNA Produktion bzw. HBsAg-Produktion.

Eine mögliche Erklärung für die veränderte Aktivität der HBV-Replikation, -Transkription und -Produktion sind am ehesten unterschiedliche Expressionsmuster verschiedener Transkriptionsfaktoren. Kyrmizi et al. untersuchten 2006 die mRNA-Raten verschiedener Trans-



kriptionsfaktoren in Abhängigkeit von dem Differenzierungsgrad der Zelle. Es fanden sich bei zunehmender Ausdifferenzierung der Zellen unter anderem höhere Raten an mRNA von HNF-1, HNF-3, HNF-4, HNF-6, C/EBP und COUP-TFII. Wie in der Einleitung dargestellt binden diese Faktoren in unterschiedlicher Weise an die beiden Enhancerelemente des HBV (Abb. 7, Seite 10 und Abb. 8, Seite 11), was die Einflussnahme der verschiedenen Zellkulturparameter auf die HBV-Regulationselemente aufzeigt.

## 9.2 HBV-mRNA Produktion in infizierten Leber-Biopsien

Die unter 8.6 in Abb. 34 und 35 aufgeführten Proben 1, 5 und 6 stammten von HBeAg positiven Patienten und zeigen histopathologisch allesamt das Bild einer chronisch aktiven Hepatitis mit den höchsten GPT-Serumspiegeln. Vergleicht man die Viruslast im Patientenserum mit dem HBV-RNA Gehalt in der Leber, so fällt auf, dass offensichtlich keine Korrelation besteht. Während in Probe 1 bei einer Viruslast von  $4 \times 10^7$  Kopien/ ml nur ein Gesamt RNA-Gehalt von  $1,67 \times 10^3$  zu finden war, stellt sich dies bei den Proben 3, 6 und 7 anders dar. Hier findet sich eine Viruslast von ca.  $3 \times 10^6$  und eine Gesamt RNA-Menge von ca.  $3 \times 10^4$ . Einer hohen Viruslast liegt also nicht immer eine hohe mRNA-Synthese innerhalb der infizierten Leberzellen zugrunde.

Untersucht man das Verhältnis zwischen aufgereinigter prägenomischer- und Gesamt-RNA des HBV, so fallen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proben auf. Während die Proben 1, 3 und 6 eine höhere pg/Gesamt-RNA Ratio zeigen, findet sich im Gegensatz hierzu bei Probe 7 ein sehr niedriges Verhältnis (0,005). Im Gegensatz zur Probe 1 und 6 ist Probe 7 zudem HBeAg negativ. Dies kann die gesteigerte Produktion der prägenomischen mRNA erklären. Man muss also in Probe 1 und 6 von einer höheren Aktivität des Core-Promotors ausgehen. Warum in Probe 3 ein fast ebenso hoher prozentualer Anteil an prägenomischer RNA vorliegt, kann nicht erklärt werden. Auffällig ist in Probe 3 eine relativ hohe Konzentration an ccc-DNA in der Leber trotz fehlendem HBeAg Nachweis im Serum. Demgegenüber steht Probe 5 mit HBeAg-Nachweis im Serum und einer ccc-DNA Konzentration am unteren Bereich der Nachweisgrenze. Ausgehend von den vorliegenden Proben kann man also nicht von einem positivem HBeAg-Nachweis im Serum auf hohe ccc-DNA Konzentrationen in den Hepatozyten schließen. Vergleicht man aber den prozentualen Anteil an prägenomischer mRNA mit den gemessenen ccc-DNA Werten in den Leberproben

(M. Aliakbari, Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Gießen, 2006), so fällt eine gute Korrelation zwischen detektierter pg-RNA und ccc-DNA auf.

Insgesamt kann man also sagen, dass sowohl der Nachweis von ccc-DNA als auch der prozentuale Anteil an prägenomischer mRNA in infizierten Leberproben besser mit dem Vorhandensein einer chronisch aktiven Hepatitis korreliert, als der HBeAg-Nachweis im Patientenserum. Leider ist die histopathologische Befundung und der Nachweis von ccc-DNA und prägenomischer RNA jeweils nur mit einer Leberbiopsie möglich und damit für den Patienten ungleich belastender und risikobehafteter als die perkutane Blutentnahme.

Vergleicht man die in den Leberproben 1, 3 und 6 detektierten prozentualen Anteile von prägenomischer mRNA am Gesamt-HBV mRNA-Gehalt mit den Messwerten der stabil bzw. transient transfizierten Zellen (Ergebnisse Seite 62 und 63, Abb. 30 und 31) so fällt auf, dass die Messwerte der transient transfizierten Zellen den o.g. Proben am ähnlichsten waren. Für Probe 7 fand sich kein vergleichbares experimentelles Modell. Es bestehen ausgeprägte interindividuelle Unterschiede bezüglich Genexpression und Oberflächenproteinproduktion. In vitro Modelle können also nicht ohne weiteres auf in vivo Proben übertragen werden.

### **9.3 HBV-Enhanceraktivität unter dem Einfluss von HCV-Proteinen**

Insgesamt ähnelt der Versuchsaufbau zur Wirkung der HCV-Proteine auf die HBV-Enhancerelemente dem von Schüttler et al. (2002). Diese fanden unter dem Einfluss des HCV-Core eine Suppression des HBV Enhancers 1 von Faktor 11, sowie eine 3-4fache Suppression von Enhancer 2. Es wurden dabei die gleichen Plasmide wie in diesem Versuchsaufbau verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch kein Effekt des HCV-Core Proteins auf die HBV-Enhanceraktivität festgestellt. Es bestanden jedoch einige Unterschiede. Schüttler et al. arbeiteten mit murinen AML 12- und humanen HepG2-Zellen, die Enhanceraktivitätsmessung erfolgte nur am Tag 2 nach Transfektion. In dieser Arbeit wurden die Effekte der HCV-Proteine in humanen Huh7-Zellen untersucht und die Enhanceraktivitäten im Verlauf von 2, 4, 6 und 8 Tagen gemessen. Auch die Methode der Standardisierung war eine andere. Während Schüttler et al. die Luciferase-Messwerte auf die Gesamtproteinmenge nach Zelllyse bezogen, erfolgte hier die Normierung über das Renilla-Plasmid, welches zum einen die Transkriptions- und Translationseffizienz, zum anderen die Lysatmenge angleichen soll. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Normierung ist vorzuziehen. Während Schüttler et al.

die Suppressionswirkung des HCV-Core auf die HBV-Enhanceraktivität in AML 12- und HepG2- Zellen untersuchten, benutzte die Arbeitsgruppe um Shih die auch hier verwendete Huh7-Zelllinie. Sie untersuchten die Auswirkungen des HCV-Core Proteins auf die HBV-Expression (Northern Blot von 3,5kb und 2,1kb-RNA/ Suppression um Faktor 2-4), sowie die Sekretion von HBs-, HBe- und HBcAg (Suppression um Faktor 2-4) und die Bildung reifer Virionen (Suppression um Faktor 20). Es wurde auch eine Inhibition von kapsidverpackter prägenomischer RNA um Faktor 14 nachgewiesen. Diese Effekte des HCV-Core traten allerdings erst am Tag 6 post transfectionem auf, nachdem das HCV-Core-Protein in den Nukleus transloziert war (Shih et al, 1993). In einer Folgearbeit dieser Gruppe im Jahr 1995 konnten am HCV-Core-Protein spezifische von den Proteinkinasen A und C phosphorylierte Serinreste nachgewiesen werden, die diesen inhibitorischen Effekt des Core-Proteins regulieren. Dabei sind die phosphorylierten Serine 99 (PKC) und 116 (PKA) essenziell für die trans-Suppression des Core-Proteins. Aufgrund der Nukleinsäurebindungsfähigkeit des Core-Proteins (Santolini et al., 1994) sowie der im Core-Protein vorhandenen NLS (nuclear localization site, Shih et al., 1993), geht diese Arbeitsgruppe von einer genregulatorischen Funktion des HCV Core-Proteins aus.

Die genannte genregulatorische Funktion des Cores-Proteins postulieren auch Schüttler et al.. Sie fanden eine bZIP-Domäne im HCV-Core Protein, über die eine direkte Bindung an nukleäre Rezeptoren möglich sein soll. Dafür spricht z.B. die HBV-Suppression durch E4BP4, welches ebenfalls ein Leucin-Zipper Domäne aufweist und als Dimer aktiv ist (Lai et al., 1998). Das E4BP4 bindet dabei an die  $\alpha$ -Box des HBV-CURS bzw. Enhancers 2 von ca. 1646B bis 1668B. An genau der gleichen Stelle wie E4BP4 bindet auch HLF (human leukemia factor), ebenfalls ein Transkriptionsfaktor vom bZIP-Typ, welcher die Expression von prägenomischer RNA in HepG2- und Huh7-Zellen steigert (Ishida 2000). Schüttler et al. postulieren eine Bindung des HCV-Core an 1684B bis 1704B und 1755B bis 1768B im Enhancer 2. Inwieweit diese von Schüttler et al. postulierten Bindungsstellen für das Core-Protein der Realität entsprechen, lässt sich nicht eindeutig klären. In der hier durchgeführten Wiederholung des Experiments, allerdings in abgewandelter Form, konnte kein suppressiver Effekt von HCV-Core Protein im zeitlichen Verlauf von 8 Tagen auf Enhancer 1 oder 2 nachgewiesen werden.

Neben den transaktivierenden bzw. supprimierenden Eigenschaften des HCV-Core Proteins sind noch weitere Eigenschaften in diesem Zusammenhang zu diskutieren. Es gibt ver-

schiedene Berichte über eine suppressive aber auch aktivierende Wirkung des HCV-Cores auf den NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg (Yoshida et al., 2001), wobei das NF- $\kappa$ B auf Stimulation durch TNF $\alpha$ , Il-1 und LPS in den Nukleus transloziert und durch Bindung an DNA die Transkription verschiedener Gene, v.a. die der zellulären Immunantwort sowie der Suppression der Apoptose moduliert (Baldwin et al., 2001). Ebenfalls aktivierend auf das NF- $\kappa$ B wirkt das HBxAg (Siddiqui et al., 2001) und das HCV-NS5A (s.u.).

Das NF- $\kappa$ B erhöht u.a. die Menge des Cyclin D1 (Baldwin et al., 2001). Die Cyclin D1 Menge wird ebenso durch STAT3 erhöht, welches wiederum von HCV-Core Protein (Yoshida et al., 2002), aber auch von NS5A hochreguliert wird (Gong et al., 2001).

Neben diesen mannigfaltigen Effekten des HCV-Core Proteins spielen auch die Nicht-Struktur Proteine des HCV, v. a. das NS3 und das NS5A eine große Rolle hinsichtlich verschiedenster virozellulärer Wechselwirkungen. So inhibiert das NS3 die Proteinkinasen A und C (Borowski et al., 1997 und 1999) und verhindert somit prinzipiell die Phosphorylierung von HCV-Core, die für dessen Inhibitoreffekt notwendig sein soll (Shih et al., 1995). In dieser Arbeit konnte weder auf Enhancer 1 noch auf Enhancer 2 ein solcher Effekt des NS3 bzw. des HCV-Core nachgewiesen werden. Allerdings steigerte NS3 bis NS5B und HCV-Core die Enhancer 1 Aktivität am Tag 8 post transfectionem um Faktor 2,3 gegenüber der Leerprobe. Dieser Effekt ist wohl nur auf NS3–NS5B zurückzuführen, da die Nicht-Struktur-Proteine schon alleine eine Aktivierung der Enhancer 1 Aktivität von Faktor 2,0 bewirken. Interessanterweise führt NS3-NS5B zu einer 1,6fachen Repression der Enhancer 2 Aktivität am Tag 8, die auch unter zusätzlichem Einfluss von HCV-Core mit einem Faktor von 1,4 noch teilweise erhalten bleibt. Offensichtlich besteht ein differenzierter Effekt der Nicht-Struktur-Proteine auf die verschiedenen Enhancer Elemente des HBV. Die von Shih et al. (1993 und 1995), Schüttler et al. (1999) bzw. Borowski et al. (1997 und 1999) gefundenen Ergebnisse konnten nicht bestätigt werden. Eine bedeutende Rolle unter den HCV-Nicht-Struktur-Proteinen spielt wohl NS5A, welches vielfältige Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen und Signalkaskaden aufweist. Als Zusammenfassung soll die folgende Tabelle dienen.

Inhibition von	Aktivierung von	Effekt
	STAT3	Transkriptionssteigerung
	NF- $\kappa$ B	Transkriptionssteigerung
CDK 1 und 2		verhindert Übergang in S-Phase

Inhibition von	Aktivierung von	Effekt
Cyclin D 1		verhindert Übergang in S-Phase
I $\beta$ n 2 $\alpha$ ind. PKR		Translationssteigerung

Abb. 55 Einflussnahme von NS5A auf zelleigene Regulationsfaktoren

Inwieweit und in welchem Ausmaß sich die dargestellten Einflussmöglichkeiten des NS5A tatsächlich auf die Enhancer-Aktivität auswirken, kann nur vermutet werden. Unter Vernachlässigung einer möglichen Einflussnahme der anderen HCV-Nicht-Struktur Proteine, ist nach den Ergebnissen der obigen Versuche von einer noch feststellbaren geringen transaktivierenden Wirkung der NS auf den Enhancer 1 auszugehen (Faktor 2,1 am Tag 8) sowie einem grenzwertigem inhibitorischen Effekt auf Enhancer 2 (Faktor 1,7 am Tag 8). Ob dieser Effekt allein durch das NS5A erklärt werden kann, ist aus den Versuchen nicht ableitbar. Allerdings ist davon auszugehen, dass aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen das NS5A zumindest hieran beteiligt ist.

Im folgenden sei noch auf einige Eigenschaften des NS5A in Bezug auf die hier durchgeführten Versuche gesondert eingegangen. NS5A steigert wie oben dargestellt die STAT 3 Konzentration in der Zelle (Reyes et al., 2002). Den Grund für diesen Anstieg lieferte Waris et al. 2003. Durch Bildung von O<sub>2</sub>-Radikalen als Folge von oxidativem Stress steigt die Konzentration von STAT 3 und NF- $\kappa$ B an. Als Folge des erhöhten STAT 3 zeigte sich eine gesteigerte Aktivität des HBV-Enhancers 1, die durch eine Bindung von STAT 3 an den Enhancer 1 begründet wird (Waris et al., 2002). Ein weiteres Erklärungsmodell für die Aktivitätssteigerung von STAT 3 liefert MacDonald und Harris 2003. Sie wiesen nach, dass STAT 3 die Menge an Cyclin D1 erhöht, welches wiederum die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Wie schon oben erwähnt kann dieser steady state Zustand mit einer höheren Syntheserate von viralen Partikeln einhergehen, dem die gesteigerte Enhancer 1 Aktivität Rechnung trägt (Glebe et al., 2001). Neben den indirekten Effekten des NS5A über Mediatoren gibt es auch Diskussionen über eine eventuelle Transaktivatoreigenschaft von NS5A aufgrund einer NLS (nuclear localisation site) (Reyes et al., 2002). Beim Dengue Virus, ebenfalls aus der Familie der Flaviviridae, transloziert das entsprechende NS5A Korrelat in den Nukleus (Kato et al., 1997). Einem gekürztem NS5A spricht man eine Transaktivator-Rolle zu (Tanimoto et al., 1997). Reyes et al. fanden 2002 allerdings heraus, dass

das Volllängen-NS5A nicht in den Nukleus transloziert. Somit bleibt eine direkte Wirkung von NS5A auf die im Nukleus lokalisierten Enhancer-Elemente des HBV fraglich.

#### **9.4 HBV-mRNA-Produktion unter dem Einfluss von HCV-Proteinen**

Die HCV-Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine (hier Core-Protein und NS3-NS5B) zeigen keinen Effekt auf die HBV-mRNA Produktion. Weder die Gesamt-RNA- noch präC/pg mRNA-Konzentration zeigen signifikante Änderungen. Man findet einen allenfalls leichten Anstieg des pg/Gesamt mRNA-Quotienten unter Einfluss der HCV-Nicht-Struktur Proteine verglichen zur Leerprobe.

Dies deckt sich mit Ergebnissen von Chulanov und Gerlich (2003). In deren Arbeit wurden u.a. die Effekte einer HCV-Koinfektion auf die HBV-DNA und HBsAg-Kinetiken bei sieben Patienten mit einer akuten Hepatitis B untersucht. Hier zeigte sich keine Einflussnahme des HCV auf die akute HBV-Infektion. Ähnliche Ergebnisse lieferten Shkurko/ Cheshik (2000). Demgegenüber ist das HCV in chronisch HBV-HCV Koinfizierten meist dominant gegenüber dem HBV (Sagnelli et al., 2000, Jardi et al., 2001). 2003 stellten Sagnelli et al. drei klinische Fälle mit akuter HBV-HCV Koinfektion vor, bei denen jeweils nach ca. 10 Tagen die HBV-Infektion abgeklungen war (HBsAg neg., HBV-DNA erniedrigt, HBs-AK erhöht) und gleichzeitig die HCV-Viruslast anstieg.

Die von Shih et al. 1993 beschriebene Suppression prägenomischer mRNA um Faktor 2-4 durch das HCV-Core Protein wäre mit den hier verwendeten Techniken nachweisbar gewesen, konnte aber nicht gefunden werden.

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Ergebnisse zeigen sich keine Auswirkungen der geänderten Enhanceraktivität unter den HCV-Proteinen auf die HBV-Transkription. Insbesondere die Transaktivierung von Enhancer 1 durch die HCV-Nicht-Struktur Proteine spiegelt sich nicht in einer gesteigerten präC/pg mRNA-Produktion wider.

#### **9.5 HBsAg-Produktion unter dem Einfluss von HCV-Proteinen**

Über die Effekte des HCV-Core Proteins auf die HBV-Transkription und Translation wurde schon oben eingegangen. So sprechen Shih et al. 1993 dem HCV-Core-Protein eine Hemmung der HBsAg Produktion um Faktor 2-4 zu. In den hier aufgeführten Versuchen konnte

dieser Effekt widerlegt werden. Das Core-Protein hat keine Auswirkung auf die HBsAg-Produktion.

In der schon oben angesprochen Arbeit von Chulanov und Gerlich (2003) konnte ebenfalls kein Effekt des HCV auf die HBsAg-Verläufe bei akut HBV-Infizierten nachgewiesen werden. Neben dem grundsätzlichen Unterschied in vivo und in vitro, lässt sich feststellen, dass die von Chulanov und Gerlich dargestellten HBsAg-Konzentrationen frühestens am Tag 5 nach dem ersten Krankheitstag erstmals bestimmt wurden und die HBsAg-Elimination im Verlauf als Basis für die oben gemachte Feststellung diene.

Wie oben nachgewiesen führen die HCV-NS3-NS5B zu einer Steigerung der Enhancer 1- und einer Inhibition der Enhancer 2-Aktivität. Dem steht gegenüber, dass die mRNA-Produktion unter Einwirkung der HCV-NS3-NS5B unbeeinflusst bleibt. Somit liegt ein Effekt der HCV Nicht-Struktur Proteine auf Ebene der Translation nahe.

Im folgenden sei eine mögliche Erklärung für den suppressiven Effekt der NS3-NS5B auf die HBsAg-Produktion dargestellt. Überlebensstrategie des HCV ist die Viruspersistenz in der Wirtszelle bei einer gleichzeitig möglichst hohen Replikationsrate. Wie schon in der Einleitung dargestellt, besitzt das HCV besondere Eigenschaften hinsichtlich der Initiation der Translation seiner RNA-Moleküle. Dabei spielt die IRES (internal ribosomal entry site) des HCV eine Schlüsselrolle. Es handelt sich hierbei um einen cap- und Translationsfaktor unabhängigen Mechanismus der Translationsinitiation. In der Abb.56 ist die Struktur der HCV-IRES dargestellt. Das Startcodon AUG liegt in der Domäne IV. Für die Translationsinitiation wird lediglich das eIF-2, eIF-3 und eIF-5 benötigt (Kieft et al., 2001). Das eIF-4, welches die cap-Gruppe der zellulären mRNA bindet, ist nicht notwendig für eine erfolgreiche Translationsinitiation. Das eIF-3 bindet dabei über die Domänen III b, III a und J III abc an die IRES. Die 40S Ribosomen-Untereinheit bindet von III a, III c, J III abc, III d bis III e. Es liegt also eine Überschneidung in der Domäne III a und J III abc vor. Dieser Komplex ist offensichtlich für die korrekte Positionierung des Startcodons an den Ribosomen verantwortlich. Das eIF-2 transferiert die Starter-tRNA auf die kleine ribosomale Untereinheit, das eIF-5B ist für die Assoziation des 48 S Komplexes und der 60 S Ribosomen Untereinheit verantwortlich. Vor dem Hintergrund dieser speziellen Molekularbiologie supprimiert NS5A die Produktion von eIF-4 über Hemmung des p38 Signalweges (He et al., 2001) und stimuliert über Hemmung der PKR (Proteinkinase R) die Bildung von eIF-2 (Reyes et al., 2002). Dies führt somit zu einer Herabregulation der cap-abhängigen Translation und erlaubt gleichzeitig

die effiziente IRES abhängige Translation. Dies wäre ein sinnvoller Mechanismus im Lebenszyklus des HCV und liefert eine mögliche Erklärung für den inhibierenden Effekt der NS3-NS5B auf die HBsAg-Produktion des HBV, da hier die Initiation der Translation cap-abhängig ist.

Alternativ könnten die HCV-NS-Proteine ko- oder posttranslational die HBsAg-Morphogenese und Sekretion hemmen. Die Translation findet am rauen endoplasmatischen Retikulum statt, wo auch HBsAg synthetisiert wird. Die HCV-Replikation findet an einem von HCV induzierten „membranous web“ statt, das sich wohl indirekt vom endoplasmatischem Retikulum ableitet. Damit wäre der starke Effekt auf die HBsAg-Produktion zu erklären, obwohl die mRNA-Menge nur wenig verringert ist.

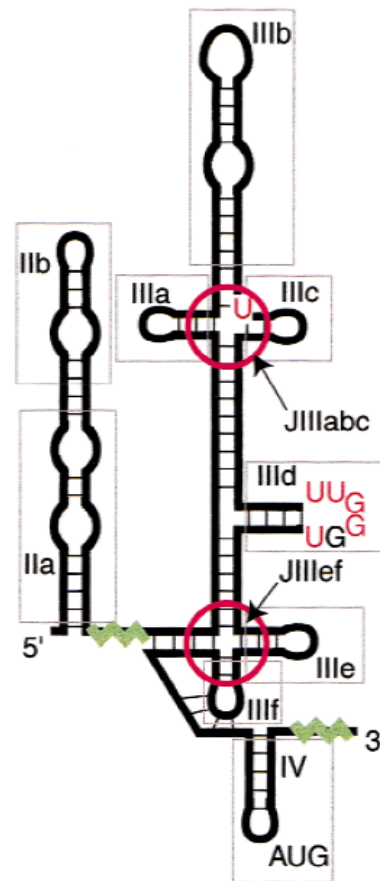


Abb. 56 Schematische Darstellung der HCV-IRES nach Kieft et al., 2001.



## 10 Zusammenfassung

Als bedeutendes humanpathogenes Agens ist das Hepatitis B Virus Gegenstand zahlreicher aktueller experimenteller Untersuchungen. Dabei unterscheiden sich häufig die angewendeten Rahmenbedingungen des Versuches. Dazu zählen häufig verschiedene Zellsysteme sowie unterschiedliche und nicht standardisierte Kulturbedingungen. Hier zeigten sich je nach Zellsystem und Zellzusatz große Unterschiede in der HBV-Expression. Insbesondere die transient transfizierte HepG2-Zelllinie mit dem episomal gelegenen HBV-Plasmid zeigte in Abhängigkeit der Kulturbedingung eine stärkere Varianz in der HBV-Expression als die stabil transfizierte HepG2.2.15 Zelllinie. Es konnte damit gezeigt werden, dass die Darstellung der angewendeten Untersuchungsbedingungen zur Einordnung der Ergebnisse von HBV-Transfektionsuntersuchungen in Zellsystemen essenziell ist.

Die Untersuchung der HBV-Expression in Leberproben sollte zusätzlich einen Vergleich zu in vitro Daten ermöglichen. Es zeigte sich, dass insbesondere die transient transfizierten HepG2-Zellen hinsichtlich der HBV-Expression eher Parallelen zur natürlichen HBV-Infektion aufweisen als stabil transfizierte HepG2.2.15-Zellen. Weiterhin liegen große interindividuelle Unterschiede in der HBV-Expression bei verschiedenen Patienten vor, so dass das in vitro Model trotz aller Ähnlichkeiten zum transient transfizierten HepG2-Zellsystem nicht kritiklos auf eine natürliche Infektion übertragen werden sollte.

Im Rahmen der natürlichen HBV-Infektion ist zudem an Koinfektionen mit anderen hepatotropen Viren zu denken. Diese können die HBV-Expression in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Hier wurde der Effekt des HCV-Core Proteins sowie der HCV-NS3-NS5B untersucht. Letztere wiesen einen deutlich inhibitorischen Effekt auf die HBs-Ag Produktion auf, ohne jedoch die mRNA-Produktion des HBV zu beeinflussen. Stattdessen zeigten sie sogar transaktivierende Effekt auf den HBV-Enhancer 1. Aufgrund der Nutzung einer gemeinsamen Zelle als Wirt sind bei jedem koinfizierten Virus gegenseitige Wechselwirkungen anzunehmen bzw. zu vermuten. Da häufig eines der infizierten Viren hinsichtlich seiner Aktivität dominant ist, hat dies auch eine unmittelbare Konsequenz in der Behandlung von koinfizierten Patienten.

---

## 11 Literaturverzeichnis

**Abraham P.** GB virus C / hepatitis G virus - its role in human disease redefined? *Indian J Med Res*, 2007; 125: 717-719

**Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov, Knowles BB.** Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282: 615-618

**Aizaki H, Harada T, Otsuka M, Seki N, Matsuda M, Li YW, Kawakami H, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T.** Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology*, 2002; 36: 1431-1438

**Alberti A, Benvegnu` L.** Management of hepatitis C. *Hepatology*, 2003;38: 104–118

**Alberts B, Bray D, Lewis J.** The molecular biology of the Cell, *Taylor & Francis; 4. Auflage* 2002

**Alcantara F, Tang Hong und McLachlan A.** Functional characterization of the interferon regulatory element in the enhancer I region of the hepatitis B virus genome. *Nucleic acid Research*, 2002; 30: 2057-2068

**Ali N, Siddiqui A.** The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 2249–2254

**Aliakbari M.** Genom- und Expressionsanalyse des Hepatitis-B-Virus in Hepatozytenkulturen von Tupaia belangeri. *Inauguraldissertation, Fachbereich Humanmedizin, Gießen, 2007*

**Alter MJ.** Epidemiology of Hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*, 2003;39: 64-69

**Antonucci TK und Rutter WJ.** Hepatitis B Virus (HBV) promoters regulated by the HBV enhancer in a tissue-specific manner. *J Virol*, 1989; 63: 579-583

**Appel N, Schaller T, Penin F und Bartenschlager R.** From Structure to Function: New Insights into Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Biol Chem*, 2006; 281: 9833-9836

**Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R.** Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*, 2005; 79: 3187-3194

**Baldwin AS.** Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest*, 2001; 107: 241-246

**Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Zs, Chapman MJ, Miyamura T und Bréchet C.** Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 1200-1205

**Bartenschlager R, Lohmann V.** Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 2000; 81: 1631-1648

**Bartenschlager R, Pietschmann T.** Efficient hepatitis C virus cell culture system: What a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 9739-9740

**Beck J, Nassal M.** Hepatitis B Virus replication. *World J Gastroenterol*, 2007; 13: 48-64

**Beck J, Nassal M.** Hepatitis B Virus replication: novel roles for virus- host interactions. *Intervirology*, 1999; 42: 100-118

**Berting, A., C. Fischer, S. Schaefer, W. Garten, H. D. Klenk, and W. H. Gerlich.** Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res*, 2000; 68: 35-49

**Biermer M, Puro R, Schneider RJ.** Tumor Necrosis Factor Alpha Inhibition of Hepatitis B Virus Replication Involves Disruption of Capsid Integrity through Activation of NF- $\kappa$ B. *J Virol*, 2003; 77: 4033-4042

**Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM.** Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, 2000; 290: 1972-1974

**Blight KJ, McKeating JA, Rice CM.** Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol*, 2002; 76: 13001-13014

**Bock CT, Malek NP, Tillmann HL, Manns MP, Trautwein C.** The Enhancer I Core Region Contributes to the Replication Level of Hepatitis B Virus In Vivo and In Vitro. *J Virol*, 2000; 74: 2193-2202

**Borowski P, Oehlmann K, Heiland M, Laufs R.** Nonstructural Protein 3 of Hepatitis C Virus Blocks the Distribution of the Free Catalytic Subunit of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *J Virol*, 1997; 71: 2838-2843

**Borowski P, Schulze zur Wiesch J, Resch K, Feucht H, Laufs R, Schmitz H.** Protein Kinase C recognizes the Protein Kinase A-binding Motif of Nonstructural Protein 3 of Hepatitis C Virus. *J Biol Chem*, 1999; 274: 30722-30728

**Bost AG, Venable D, Liu L, Heinz BA.** Cytoskeletal requirements for hepatitis C virus (HCV) RNA synthesis in the HCV replicon cell culture system. *J Virol*, 2003; 77: 4401-4408

**Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G.** Occult hepatitis B Virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *New Engl J Med*, 1999; 341: 22-26

**Cai Yan Ning, Zho Qing, Kong Yu Ying, Li Mei, Viollet Benoit, Xie You Hua, Wang Yuan.** LRH-1/hB1F and HNF1 synergistically up-regulate hepatitis B virus gene transcription and DNA replication. *Cell Research*, 2003; 13: 451-458

---

**Cereghini S.** Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J*, 1996; 10: 267-282

**Cerny A, Heim MH, Blum HE.** Hepatitis C: an update. *Swiss Med Wkly*, 2001; 131: 291-298

**Chen Shiow-Yi, Kao Chih-Fei, Chen Chun-Ming, Shih Chwen-Ming, Hsu Ming-Jen, Chao Chi-Hong, Wang Shao-Hung, You Li-Ru, Wu Lee Yan-Hwa.** Mechanisms for inhibition of Hepatitis B Virus gene expression and replication by Hepatitis C Virus core protein. *J Biol Chem*, 2003; 278: 591-607

**Chen M, Ou JH.** Cell Type-Dependent Regulation of the Activity of the Negative Regulatory Element of the Hepatitis B Virus Core Promoter. *Virology*, 1995; 214: 198-206

**Choi Byung Hyune, Park Geon Tae, Rho Hyune Mo.** Interaction of Hepatitis B Viral X Protein and CCAAT/ Enhancer-binding Protein synergistically activates the Hepatitis B Viral Enhancer II/Pregenomic Promoter. *J Biol Chem*, 1999; 274: 2858-2865

**Chojnacki J, Anderson DA, Grgacic EV.** A hydrophobic domain in the large envelope protein is essential for fusion of duck hepatitis B virus at the late endosome. *J Virol*, 2005; 79: 14945-14955

**Chu CM, Yeh CT, Sheen IS, Liaw YF.** Acute hepatitis C virus (HCV) infection in chronic carriers of hepatitis B virus (HBV): the impact of underlying active HBV replication on persistence of HCV infection and antibody response to HCV. *Gut*, 2002; 51: 95-99

**Chu CM, Yeh CT, Liaw YF.** Low-Level Viremia and Intracellular Expression of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) in HBsAg Carriers with Concurrent Hepatitis C Virus Infection. *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 2084-2086

**Chu CM, Sheen IS, Liaw YF.** The role of hepatitis C virus in fulminant viral hepatitis in an area with endemic hepatitis A and B. *Gastroenterology*, 1994; 107: 189-195

---

**Chulanov VP, Shipulin GA, Schaefer S, Gerlich WH.** Kinetics of HBV DNA and HBsAg in acute Hepatitis B patients with and without coinfection by other hepatitis viruses. *J Med Virol*, 2003; 69: 313-323

**Chwla Y.** Hepatitis B Virus: Inactive carriers. *J Virol*, 2005; 2: 82

**Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J.** Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol*, 2006; 87: 1075-1084

**Coppola N, Marrocco C, Di Caprio D, Coviello G, Scolastico C, Filippini P, Sagnelli E.** Acute Hepatitis B and C virus Coinfection: a virological and clinical study of 3 cases. *Clin Infect Dis*, 2003; 36: 528-532

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

**Desmet VJ.** Liver tissue examination. *J Hepatol*, 2003; 39: 43-49

**Doitsh G, Shaul Y.** Enhancer I Predominance in Hepatitis B Virus Gene Expression. *Mol Cell Biol*, 2004; 24: 1799-1808

**Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Doudna JA.** Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA*, 2001; 7: 194-206

**Dumoulin FL, von dem Busche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, Spengler U.** Hepatitis C Virus NS 2 Protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*, 2003; 305: 260-266

**Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM.** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 2007; 446: 801-805

- Fattovich G.** Natural history of hepatitis B. *J Hepatol*, 2003; 39: 50-58
- Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S.** Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol*, 2003; 39: 36-42
- Fiedler N.** Einfluss exogener Faktoren auf die Transkriptionsregulation des Hepatitis B Virus. *Inauguraldissertation, Fachbereich Biologie, Gießen, 2001*
- Fischer, S.** Veränderte Transkriptionsregulation des Hepatitis B Virus bei einer Variante mit einer 8-Basenpaar-Deletion im Core-Promotor. *Inauguraldissertation, Fachbereich Humanmedizin, Gießen, 2007*
- Fong TL, Di Bisceglie AM, Waggoner JG, Banks SM, Hoofnagle JH.** The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 1991; 14: 64-67
- Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R.** Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol*, 2001; 75: 12047-12057
- Fukai K, Takada S, Yokosuka O, Saisho H, Omata M, Koike K.** Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell. *Virology*, 1997; 236: 279-287
- Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K.** Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk 1, in Response to mitogenic stimuli. *Hepatology*, 2001, 33: 159-165
- Gerberding JL.** Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. *J Infect Dis*, 1994; 170: 1410-1417
- Gerlich WH, Schaefer S.** Hepadnaviren: Hepatitis B Virus: Doerr HW und Gerlich WH Hrsg, Medizinische Virologie, *Thieme Verlag, Stuttgart, 2002, 191-210*

**Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB.** Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates Transcription through a Novel Cellular Transcription Factor SRCAP. *J Biol Chem*, 2002; 275: 7184-7188

**Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB.** Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol*, 1999; 80: 1179-1183

**Giannini C, Br  chot C.** Hepatitis C virus biology. *Cell Death and Differentiation*, 2003; 10: 27-38

**Glebe D, Urban S.** Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, 2007; 13: 22-38

**Glebe D, Berting A, Broehl S, Naumann H, Schuster R, Fiedler N, Tolle T, Nitsche S, Seifer M, Gerlich WH, Schaefer S.** Optimised conditions for the Production of Hepatitis B Virus from Cell Culture. *Intervirolog*, 2001; 44: 370-378

**Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A.** Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 9599-9604

**Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D.** Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *J Virol*, 2003; 77: 5487-5492

**Gu B, Gates AT, Isken O, Behrens SE, Sarisky RT.** Replication Studies Using Genotype 1a Subgenomic Hepatitis C Virus Replicons. *J Virol*, 2003; 77: 5352-5359

**Guo JT, Bichko VV, Seeger C.** Effect of Alpha Interferon on the Hepatitis C Virus Replicon. *J Virol*, 2001; 75: 8516-8523



---

**Guo W, Bell KD, Ou JH.** Characterization of the Hepatitis B Virus EnhI Enhancer and X Promoter Complex. *J Virol*, 1991; 65: 6686-6692

**He Y, Yan W, Coito C, Li Y, Gale M Jr, Katze MG.** The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome- entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins. *J Gen Virol*, 2003; 84: 535-543

**Honigwachs J, Faktor O, Dikstein R, Shaul Y, Laub O.** Liver-Specific Expression of Hepatitis B Virus Is Determined by the Combined Action of the Core Gene Promoter and the Enhancer. *J Virol*, 1989; 63: 919-924

**Huang YQ, Wang LW, Yan SN, Gong ZJ.** Effects of cell cycle on telomerase activity and on hepatitis B virus replication in HepG2 2.2.15 cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004; 3: 543-547

**Hyunsook L, Kim HT, Yungdae Y.** Liver-specific Enhancer II Is the Target for the p53-mediated Inhibition of Hepatitis B Viral Gene Expression. *J Biol Chem*, 1998; 273: 19786-19791

**Ishida H, Ueda K, Ohkawa K, Kanazawa Y, Hosui A, Nakanishi F, Mita E, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N.** Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II. *J Virol*, 2000; 74: 1241-1251

**Isken O, Baroth M, Grassmann CW, Weinlich S, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Behrens SE.** Nuclear factor are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA*, 2007; 13: 1675-1692

**Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Esteban R, Guardia J.** Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology*, 2001; 34: 404-410

---

**Ji H, Fraser CS, Yu Y, Leary J, Doudna JA.** Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 16987-16989

**Jin DY, Wang HL, Zhou Y, Chun Abel CS, Kibler KV, Hou YD, Kung HF, Jeang KT.** Hepatitis C virus core protein- induced loss of LZip function correlates with cellular transformation. *EMBO J*, 2000; 19: 729-740

**Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau Johnson YN, Baroudy Bahige M.** Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site (IRES) Stem Loop III<sub>d</sub> Contains a Phylogenetically Conserved GGG Triplet Essential for Translation and IRES Folding. *J Virol*, 2000; 74: 10430-10437

**Jursch CA, Gerlich WH, Glebe D, Schaefer S, Marie O, Thraenhart O.** Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus. *Med Microbiol Immunol*, 2002; 190: 189-197

**Kane, Lloyed J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M.** Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999; 77

**Kann M, Gerlich WH.** Hepatitis B Virus and the hepadnaviridae, Structure and molecular virology. In Thomas HC, Lemon S, Zuckermann AJ, *Viral Hepatitis 3<sup>rd</sup> ed*, Blackwell, Malden Ma., 149-180

**Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A.** Phosphorylation-dependent Binding of Hepatitis B Virus Core Particles to the Nuclear Pore Complex. *J Cell Biol*, 1999; 145: 45-55

**Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M.** Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology*, 2000; 32: 405-412

**Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M.** Hepatitis C Virus Nonstructural Region 5A Protein Is a Potent Transcriptional Activator. *J Virol*, 1997; 71: 8856-8859

**Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM.** Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*, 2000; 74:2046-2051

**Kidd-Ljunggren K, Zuker M, Hofacker IL, Kidd AH.** The hepatitis B virus pregenome: prediction of RNA structure and implications for the emergence of deletions. *Intervirology*, 2000; 43: 154-164

**Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Doudna JA.** Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA*, 2001; 7: 194-206

**Koschel, M., R. Thomssen, and V. Bruss.** Extensive mutagenesis of the hepatitis B virus core gene and mapping of mutations that allow capsid formation. *J Virol*, 1999; 73: 2153-2160

**Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R.** Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *J Virol*, 2001; 75: 4614-4624

**Kumar D, Gupta RK, Anand R, Pasha ST, Rai A, Das BC.** Occurrence and nucleotide sequence analysis of hepatitis G virus in the patients with acute viral hepatitis and fulminant hepatitis. *Indian J Med Res*, 2007; 125: 752-755

**Kyrmizi I, Hatzis P, Katrakili N, Tronche F, Gonzalez FJ, Talianidis I.** Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev*, 2006; 20: 2293-2305

**Lai CK, Ting LP.** Transcriptional Repression of Human Hepatitis B Virus Genes by a bZIP Family Member, E4BP4. *J Virol*, 1999; 73: 3197-3209

---

**Lavanchy D.** Global surveillance and control of Hepatitis C. *J Viral Hepatitis*, 1999; 6: 35-47

**Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG.** Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol*, 1999; 5: 289-295

**Li D, Taghi T, Lott WB, Gowans EJ.** Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES- dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol*, 2003; 84: 815-825

**Liaw YF.** Hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol*, 2002; 37: 65-68

**Lin WJ, Li J, Lee YF, Yeh SD, Altuwaijri S, Ou JH, Chang C.** Suppression of Hepatitis B Virus Core Promoter by the Nuclear Orphan Receptor TR4. *J Biol Chem*, 2003; 278: 9353-9360

**Liu JK, DiPersio CM, Zaret KS.** Extracellular signals that regulate liver transcription factors during hepatic differentiation in vitro. *Mol Cell Biol*, 1991; 11: 773-784

**Liu M, Liu Y, Cheng J, Zhang SL, Wang L, Shao Q, Zhang J, Yang Q.** Transactivating effect of hepatitis C virus core protein: A suppression subtractive hybridization study. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1746-1749

**Lohmann V, Körner F, Koch JO, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R.** Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science*, 1999; 285: 110-113

**Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R.** Viral and Cellular Determinants of Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *J Virol*, 2003; 77: 3007-3019

---

**Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R.** Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *J Virol*, 2001; 75: 1437-1449

**Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Saksela K, Harris M.** The Hepatitis C Virus Non-structural NS5A Protein Inhibits Activating Protein-1 Function by Perturbing Ras-ERK Pathway Signaling. *J Biol Chem*, 2003; 278: 17775-17784

**Malcolm BA, Liu R, Lahser F, Agrawal S, Belanger B, Butkiewicz N, Chase R, Gheyas F, Hart A, Hesk D, Ingravallo P, Jiang C, Kong R, Lu J, Pichardo J, Prongay A, Skelton A, Tong X, Venkatraman S, Xia E, Girijavallabhan V, Njoroge FG.** SCH 503034, a mechanism based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50: 1013-1020

**Matsui T, Kinoshita T, Hirano T, Yokota T, Miyajima A.** STAT3 Down-regulates the Expression of Cyclin D during Liver Development. *J Biol Chem*, 2002; 277: 36167-36173

**Moolla N, Kew M, Arbuthnot P.** Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Viral Hepatitis*, 2002; 9: 323-331

**Moradpour D., Penin F, Rice CM.** Replication of Hepatitis C Virus. *Nat Rev Microbiol*, 2007; 5: 453-463

**Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Mortelli GP, Mayo MA, Summers MD.** Virus Taxonomy, *Springer Verlag, New-York/Wien*, 1995

**Naganuma A, Nozaki A, Tanaka T, Sugiyama K, Takagi H, Mori M, Shimotohno K, Kato N.** Activation of the Interferon-Inducible 29-59-Oligoadenylate Synthetase Gene by Hepatitis C Virus Core Protein. *J Virol*, 2000; 74: 8744-8750

**Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J.** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 1982; 42: 3858-3863

**Neddermann P, Clementi A, Francesco R.** Hyperphosphorylation of the Hepatitis C Virus NS5A Protein Requires an Active NS3 Protease, NS4A, NS4B, and NS5A Encoded on the Same Polyprotein. *J Virol*, 1999; 73: 9984-9991

**Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS.** Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, 1998; 282: 103-107

**Nobuyuki A, Chien-Yuan K, Lichti T, Padmanabhan R, Sasaguri Y und Padmanabhan R.** Modulation of Cell Growth by the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS5A. *J Biol Chem* 2001; 276: 12675-12684

**Offergeld R, Faensen D, Ritter S, Hamouda O Human.** Immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blond donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveill*, 2005; 10: 8-11

**Ois CF, Duverlie G, Rebouillat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignol A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF.** Expression of Hepatitis C Virus proteins interferes with the antiviral action of Interferon independently of PKR-Mediated control of protein pynthesis. *J Virol*, 2000; 74: 5587-5596

**Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, Seki N.** Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 300: 443-447

---

**Ozer A, Khaoustov VI, Mearns M, Lewis DE, Genta RM, Darlington GJ, Yoffe B.** Effect of hepatocyte proliferation and cellular DNA synthesis on hepatitis B virus replication. *Gastroenterology*, 1996; 110: 1519-1528

**Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D.** Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol*, 1998; 72: 2795-2805

**Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R Jr, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M Jr:** Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 4650-4655

**Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R.** Persistent and Transient Replication of Full-Length Hepatitis C Virus Genomes in Cell Culture. *J Virol*, 2002; 76: 4008-4021

**Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R.** Characterization of Cell Lines Carrying Self-Replicating Hepatitis C Virus RNAs. *J Virol*, 2001; 75: 1252-1264

**Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S.** Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998; 282: 938-941

**Pöhlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA.** Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*, 2003; 77: 4070-4080

**Power SC, Cereghini S.** Positive regulation of the vHNF1 promotor by the orphan receptors COUP-TF1/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 778-791

**Prince AM.** An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968; 60: 814-821

**Rabe B, Glebe D, Kann M.** Lipid mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol*, 2006; 80: 5465-5473

**Raimondo G, Pollicino T, Squadrito G.** Clinical virology of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2003; 39: 26-30

**Ren S, Nassal M.** Hepatitis B Virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication- defective adenovirus vectors. *J Virol*, 2001; 75: 1104-1116

**Reyes GR.** The Nonstructural NS5A Protein of Hepatitis C Virus: An Expanding, Multifunctional Role in Enhancing Hepatitis C Virus Pathogenesis. *J Biomed Sci*, 2002; 9: 187-197

**Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, Kieft JS, Spaan WJM, Lemon SM.** The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA*, 2001; 7: 585-597

**Roggendorf M.** Hepatitis C Virus. In Doerr HW und Gerlich WH Hrsg Medizinische Virologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2002, 216-225

**Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, Chisari FV.** Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 1743-1750

**Romano M, Di Napoli M, Pesce M.** HCV superinfection in a chronic carrier of HBV. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 1995; 41: 303-305



---

**Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Mogavero AR, Filippini P, Piccinino F.** HCV genotype and "silent" HBV coinfection: two main risk factors for a more severe liver disease. *J Med Virol*, 2001; 64: 350-355

**Santolini E, Migliaccio G, La Monica N.** Bioynthesis and Biochemical Properties of the Hepatitis C Virus Core Protein. *J Virol*, 1994; 96: 3631-3641

**Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A.** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*, 2002; 21: 5017-5025

**Schaefer, S., Glebe, D., Wend, U.C., Oyunbileg, J., Gerlich, W.H.** Universal primers for real time amplification of DNA from all known orthohepadnavirus species. *J Clin Virol*, 2003; 27: 30-37

**Schüttler CG, Fiedler N, Schmidt K, Repp R, Gerlich WH, Schaefer S.** Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein. *J Hepatol*, 2002; 37: 855-862

**Schüttler CG.** Einfluss des Hepatitis-C-Virus Core-Proteins auf Transkriptionselemente des Hepatitis-B-Virus– Ein Modell zur viralen Koinfektion. *Inauguraldissertation, Fachbereich Humanmedizin, Gießen, 2002*

**Seeger C, Mason WS.** Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000;64: 51-68

**Sells MA, Chen ML, Acs G.** Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 1005-1009

**Shih CM, Chen CM, Chen SY, Wu Lee YH.** Modulation of the trans-Suppression Activity of Hepatitis C Virus Core Protein by Phosphorylation. *J Virol*, 1995; 69: 1160-1171

---

**Shih CM, Lo Szecheng J, Miyamura T, Chen SY, Wiu Lee YH.** Suppression of Hepatitis B Virus Expression and Replication by Hepatitis C Virus Core Protein in HuH-7 Cells. *J Virol*, 1993; 67: 5823-5832

**Shimazu T, Takada S, Ueno Y, Hayashi Y, Koike K.** Post-transcriptional control of the level of mRNA by hepatitis B virus X gene in the transient expression system using human hepatic cells. *Genes to Cells*, 1998; 3: 477-484

**Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T.** Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein with Viral Sense RNA and Suppression of Its Translation. *J Virol*, 1999; 73: 9718-9725

**Shkurko TV, Cheshik SG.** Acute hepatitis B in anti-HCV-positiv patients. *Vopr. Virusol*, 2000; 45: 32-35

**Shouval D.** Hepatitis B vaccines. *J Hepatol*, 2003; 39: 70-76

**Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS.** Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS 5 region. *J Gen Virol*, 1993; 74: 2391-2399

**Song J, Fujii M, Wang F, Itoh M, Hotta H.** The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J Gen Virol*, 1999; 80: 879-886

**Spangberg K, Wiklund L, Schwartz S.** Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3 untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J Gen Virol*, 2001; 82: 113-120

**Srinivas RV, Ray RB, Meyer K, Ray R.** Hepatitis C virus core protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virus Res*, 1996; 45: 87-92

---

**Stoeckl L, Funk A, Kopitzki A, Brandenburg B, Oess S, Will H, Sirma H, Hildt E.**

Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 6730-6734

**Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F, Gerlich**

**WH.** Transcription of Hepatitis B Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Persistently Infected Patients. *J Virol*, 1997; 71: 5399-5407

**Su H, Yee JK.** Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 2708-2712

**Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr.**

Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*, 2005;79: 2689-2699

**Sun CT, Lo WY, Wang IH, Lo YH, Shiou SR, Lai CK, Ting LP.** Transcription Repression of Human Hepatitis B Virus Genes by Negative Regulatory Element-binding Protein/SON. *J Biol Chem*, 2001; 276: 24059-24067

**Takeuchi K, Kubo Y, Boonmar S, Watanabe Y, Katayama T, Choo QL, Kuo G,**

**Houghton M, Saito I, Miyamura T.** Nucleotide sequence of core and envelope genes of the hepatitis C virus genome derived directly from human healthy carriers. *Nucleic Acids Res*, 1990; 18: 4626

**Tang H, McLachlan A.** Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc Natl Acad Soc USA*, 2001; 98: 1841-1846

**Tanimoto A, Ide Y, Arima N, Sasaguri Y, Padmanabhan R.** The amino terminal deletion mutants of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A function as transcriptional activators in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 236: 360-364

**Tardif KD, Mori K, Siddiqui A.** Hepatitis C Virus Subgenomic Replicons Induce Endoplasmic Reticulum Stress Activating an Intracellular Signaling Pathway. *J Virol*, 2002; 76: 7453-7459

**Tellinghuisen TL, Rice CM.** Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol*, 2002; 5: 419-427

**Thomas H, Foster G, Platis D.** Mechanisms of action of interferon and nucleoside analogues. *J Hepatol*, 2003; 39: 93-98

**Uprichard SL, Wieland SF, Althage A, Chisari FV.** Transcriptional and posttranscriptional control of hepatitis B virus gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 1310-1315

**Villanueva RA, Rouille Y, Dubuisson J.** Interactions between virus proteins and host cell membranes during the viral life cycle. *Int Rev Cytol*, 2005; 245: 171-244

**Vyas J, Elia A, Clemens MJ.** Inhibition of the protein kinase PKR by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genomic RNA. *RNA*, 2003; 9: 858-870

**Wang TH, Rijnbrand R, Lemon SM.** Core Protein-Coding Sequence, but Not Core Protein, Modulates the Efficiency of Cap-Independent Translation Directed by the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus. *J Virol*, 2000; 74: 11347-11358

**Wang C, Sarnow P, Siddiqui A.** Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol*, 1993; 67: 3338-3344

**Waris G, Siddiqui A.** Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci Vol*, 2003; 28: 311-321

**Waris G, Siddiqui A.** Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol*, 2002; 76: 2721-2729

---

**Waris G, Huh KW, Siddiqui A.** Mitochondrially Associated Hepatitis B Virus X Protein Constitutively Activates Transcription Factors STAT-3 and NF- $\kappa$ B via Oxidative Stress. *Mol Cell Biol*, 2001; 21: 7721-7730

**Watashi K, Shimotohno K.** The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci*, 2003; 94:937-943

**WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium:** Global surveillance and control of hepatitis C. *J Viral Hepatitis*, 1999; 6: 35-47

**WHO:** Hepatitis B. Epidemic and Pandemic Alert and Response. *WHO/CDS /CSR/ LYO*. 2002; 2: *Hepatitis B*

**Wietzke P, Schott P, Braun F, Mihm S, Ramadori G.** Clearance of HCV RNA in a chronic hepatitis C virus-infected patient during acute hepatitis B virus superinfection. *Liver*, 1999; 19: 348-353

**Wünschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT.** Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol*, 2000; 74: 10055-10062

**Xie Y, Li M, Wang Y, Hofschneider PH, Weiss L.** Site-specific mutation of the hepatitis B virus enhancer II B1 element: effect on virus transcription and replication. *J Gen Virol*, 2001; 82: 531-535

**Xu Z, Yen TS B, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou J.** Enhancement of Hepatitis B Virus Replication by Its X Protein in Transgenic Mice. *J Virol*, 2002; 76: 2579-2584

---

**Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J.** In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96: 2291-2295

**Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M.** The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol*, 1998; 72: 6048-6055

**Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M.** Hepatitis C Virus Core Protein Activates Nuclear Factor  $\kappa$ B-dependent Signaling through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor. *J Biol Chem*, 2001; 276: 16399-16405

**Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A.** Activation of STAT3 by the Hepatitis C Virus Core Protein leads to Cellular Transformation. *J Exp Med*, 2002; 196: 641-653

**Yu X, Mertz JE.** Differential Regulation of the Pre-C and Pregenomic Promoters of Human Hepatitis B Virus by Members of the Nuclear Receptor Superfamily. *J Virol*, 1997; 71: 9366-9374

**Yu X, Mertz JE.** Distinct Modes of Regulation of Transcription of Hepatitis B Virus by the Nuclear Receptors HNF4 and COUP-TF1. *J Virol*, 2003; 77: 2489-2499

**Yu X, Mertz JE.** Promoters for Synthesis of the Pre-C and Pregenomic mRNA's of human Hepatitis B Virus are genetically distinct and differentially regulated. *J Virol*, 1996, 70: 8719-8726

**Yuh CH, Chang YL, Ting LP.** Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol*, 1992; 66: 4073-4084

**Zaret KS, DiPersio CM, Jackson DA, Montigny WJ, Weinstat DL.** Conditional enhancement of liver specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 9076-9080

**Zhang P, Raney AK, McLachlan A.** Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*, 1993; 67: 1472-1481

**Zheng Y, Li J, Johnson DL, Ou J.** Regulation of Hepatitis B Virus Replication by the Ras–Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *J Virol*, 2003; 77: 7707-7712

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

**Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai M MC.** Hepatitis C Virus Core Protein Binds to the Cytoplasmic Domain of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 1 and Enhances TNF-Induced Apoptosis. *J Virol*, 1998; 72: 3691-3697

## **12 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.“

---

**Daniel Bock**



### **13 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. phil. nat. Wolfram H. Gerlich möchte ich herzlich für die guten Ratschläge und die konstruktive Kritik danken, die selbst in verwickeltesten Situationen der Schlüssel zum Erfolg waren.

Im besonderen ist PD Dr. Dieter Glebe für die dauerhaft freundschaftliche, gute und erfolgsversprechende Betreuung meiner Doktorarbeit zu danken. Das Thema war ursprünglich von PD Dr. Schaefer konzipiert worden, der jedoch bald danach an die Universität Rostock wechselte.

Für die Hilfestellung bei der *in vitro* Transkription möchte ich mich bei Klaus Grassmann bedanken.

Für das Überlassen verschiedener Plasmide bei Dr. Christian Schüttler und Herrn Prof. Dr. Thiel.

Für die prompte und schnelle Bestimmung von HBV Proteinen aus Zellüberständen bedanke ich mich bei der diagnostischen Abteilung des Instituts für Medizinische Virologie.

Ich möchte weiterhin Siggie Bröhl sowie Katja Schmidt für die Beantwortung vieler spezifischer und unspezifischer Fragen und die ständige Hilfsbereitschaft in technischen und auch in privaten Situationen danken.

Des Weiteren gilt mein Dank dem gesamten Team der Medizinischen Virologie Gießen. Ich habe hier viel Freude und Spaß gehabt, viel hinzugelernt und viele Freunde gefunden:

Mehriar Aliakbari, Katja Schmidt, Eva Knoop, Siggie Bröhl, Dieter Glebe, Ulli Wend, Aris Haryonto, Carolin Austermann Busch.

Bei ihnen allen möchte ich mich für meine unter Stress auftretende Ungeduld entschuldigen. Weiterhin hoffe ich, in den Laborgängen nicht von einer Radarfalle erfasst worden zu sein.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mir stets und in jeder Situation den Rücken freigehalten haben und mir so die Möglichkeit gaben, mich vollständig auf Dissertation und Studium zu konzentrieren. Vielen Dank.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meiner mittlerweile Verlobten Désirée Jung für den starken privaten Rückhalt, ohne den diese Dissertationsarbeit wohl kaum zustande gekommen wäre. Semper fidelis!

---

## 14 Curriculum Vitae

### Kontaktdaten

Daniel Bock  
Sainte-Foy Strasse 15  
65549 Limburg  
e-Mail: daniel.bock@viro.med.uni-giessen.de

### Familienstand

ledig

### Berufspraxis

seit Feb. 2008	Assistenzarzt an der Dr. Horst Schmidt Klinik Wiesbaden, Med. Klinik I, Kardiologie, Prof. Dr. Sigmund
Jul. 2005 – Jan. 2008	Assistenzarzt im Städtischen Klinikum Ludwigshafen, Med. Klinik B, Herzzentrum, Prof. Dr. Senges

### Studium

Gesamtnote Ärztliche Prüfung	<b>1.83</b>
2005 Drittes Staatsexamen	Endnote 1.0
2004 – 2005 Praktisches Jahr	St.Vincenz Krankenhaus Limburg
2004 Zweites Staatsexamen	Endnote 2.3

---

2001 Erstes Staatsexamen	Endnote 2.0
2000 Ärztliche Vorprüfung	Endnote 2.0
1998 – 2005	Justus Liebig Universität Gießen

### **Famulaturen**

2002	Klinik für Neurologie, Weilmünster
2002	Thorax- und Abdominalchirurgie, Florence Nightingale Krankenhaus, Düsseldorf
2001	Schwerpunktpraxis Kardiologie, Gießen
2001	Institut für Pathologie, Justus Liebig Universität Gießen

### **Zivildienst**

1997 – 1998	Caritas Sozialstation Limburg Alten- und Krankenpflege
-------------	---

### **Schulische Ausbildung**

Gesamtnote Abitur	<b>1.5</b>
1988 – 1997	Gymnasium Tilemannschule Limburg
1984-1988	Grundschule Beselich